



Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Departamento de Apoio à Pesquisa
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica



**Doença de Chagas na região Barcelos (Médio Rio Negro):
sorologia e citometria.**

Bolsista: Juliana Leal Danilow, CNPq

Manaus

2011



Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Departamento de Apoio à Pesquisa
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica



RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0026/2010

**Doença de Chagas na região Barcelos (Médio Rio Negro):
sorologia e citometria.**

Bolsista: Juliana Leal Danilow

Orientador: Prof. Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Malheiro

Manaus

2011

RESUMO

A doença de Chagas é endêmica em toda América Latina e seu quadro crônico pode provocar limitação funcional intensa e morte. Existem relatos da doença de Chagas no estado do Amazonas, mas até agora, o problema tem sido negligenciado. Recentemente, a região de Barcelos tem chamado a atenção pelo expressivo número de casos dessa doença. Apesar de estudos sobre o conhecimento da ocorrência dessa doença na região ser limitado, algumas observações e evidências mostram que o problema pode ser mais grave do que se pensa. Neste estudo, foram coletadas amostras de sangue venoso de 154 indivíduos autóctones e residentes no município de Barcelos, Estado do Amazonas. Essas amostras foram transportadas para Manaus. No Hemocentro Estado do Amazonas (HEMOAM) foi realizada a sorologia das amostras pelo método *ELISA* para doença de Chagas, a citometria de fluxo para linfócitos, linfócitos CD69+, linfócitos CD3CD4+, linfócitos CD3CD8+, monócitos, monócitos CD69+, neutrófilos e neutrófilos CD69+, além das interleucinas IL-6 e IL-12. O resultado da sorologia identificou 8 amostras preliminarmente soropositivas, ou seja, 5.19% dos indivíduos estavam infectados com o *Tripanossoma cruzi*. Os resultados não mostraram nenhuma relação entre a imunofenotipagem e a sorologia. Similarmente, não foram encontradas relações entre as citocinas IL-6 e IL-12 e a sorologia. Embora nossos dados não mostrem nenhum padrão imunológico relacionado à doença de Chagas, os resultados epidemiológicos permitem-nos caracterizar esta doença na região de Barcelos (Médio Rio Negro) como: alta prevalência de infecção nos homens com faixa etária entre 51 a 60 anos e com atividades laborais relacionadas ao extrativismo da piaçava.

Palavras-chave: Barcelos. Doença de Chagas. Sorologia. Imunologia. Extração da piaçava.

ABSTRACT

Chagas disease is endemic all throughout Latin America and its chronic phase may provoke intense limited function and death. There are reports of Chagas disease in the State of Amazonas, but so far, the problem has been neglected. Recently, the Barcelos region has been drawing attention due to its expressive number of cases related to this disease. The studies of the occurrence of this disease in this region is limited, however, some observations and studies show that the problem may be more serious than we thought. So far, 154 samples of venous blood were collected from autochthones residents of Barcelos, State of Amazonas. These samples were transported to Manaus and they were tested for serology using the ELISA method for Chagas disease, flow cytometry for the lymphocytes, CD 69+ lymphocytes, CD3CD4+ lymphocytes, CD3CD8+ lymphocytes, monocytes, CD69+ monocytes, neutrophils, CD 69+ neutrophils and IL-6 and IL-12 cytokines studies. The serology results showed 8 positive samples, which means that 5,19% of the individuals tested were infected with *T.cruzi*. The pattern of IL-6 and IL-12 were different for positive and negative samples, however, not statistically significant. The Flow cytometry didn't show, statistically, significant differences between positive and negative cell patterns. The results allowed the conclusion that there is a distinct pattern epidemiologically for Chagas disease in the Amazon region, with high prevalence of infected men, between the ages of 51 and 60, and who is related to the piaçava's extractivism.

Key-words: Chagas disease. Barcelos. State of Amazonas. Serology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A doença de Chagas: fisiopatogenia e formas clínicas	1
1.2 A doença de Chagas na região Amazônica	2
1.3 Aspectos imunológicos da doença de Chagas	3
2. OBJETIVOS	5
3. HIPÓTESES	6
4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	7
4.1 Determinação do número de amostras	7
4.2 Coleta e armazenamento das amostras	7
4.3 Sorologia para detecção do anticorpo anti <i>T.cruzi</i>	10
4.4 Dosagem de citocinas	12
4.5 Imunofenotipagem das Células por Citometria de Fluxo	13
4.6 Sorologia confirmatória pelo Western Blot	14
4.7 Análise dos dados	14
5. RESULTADOS	15
5.1 Dados epidemiológicos	15
5.2 Citocinas sorológicas	17
5.3 Citometria de fluxo	18
5.4 Linfócitos	18
5.5 Monócitos	20
5.6 Neutrófilos	20
5.7 Epidemiologia e Imunologia	21
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÕES	28
8. RECOMENDAÇÕES	29
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
10. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das amostras em relação à faixa etária e sexo dos voluntários	16
Tabela 2. Distribuição da soropositividade para doença de Chagas pelo <i>ELISA</i> e a faixa etária dos voluntários.	16
Tabela 3. Relação entre as amostras soropositivas para doença de Chagas pelo <i>ELISA</i> e a profissão dos indivíduos estudados.	17
Tabela 4. Relação entre os indivíduos soropositivos para doença de Chagas pelo <i>ELISA</i> e os indivíduos que relataram terem sido picados pelo barbeiro	17
Tabela 5. Média±desvio padrão das IL-6 e IL-12 dos indivíduos soropositivos e soronegativos para o teste Elisa	18
Tabela 6. Média±desvio padrão de linfócitos, linfócitos CD69+, linfócitos CD3CD4+ e linfócitos CD3CD8+	19
Tabela 7. Média±desvio padrão de monócitos, monócitos CD69+, neutrófilos e neutrófilos CD69+	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização do município de Barcelos-AM	8
Figura 2. Abordagem aos moradores de Barcelos	9
Figura 3. Hospital Geral de Barcelos onde as amostras foram centrifugadas.	9
Figura 4. Procedimentos para a análise sorológica pelo <i>ELISA</i>	11
Figura 5. Variação nos valores de Elisa para sorologia da doença de Chagas	15
Figura 6. Distribuição da concentração de citocinas Il-6 e IL-12	17
Figura 7. Ocorrência dos subtipos de linfócitos	19
Figura 8. Ocorrência da proporção de monócitos e monócitos CD69+	20
Figura 9. Ocorrência da proporção de neutrófilos e neutrófilos CD69+	21
Figura10. Análise de redundância (RDA) relacionando os dados de epidemiologia, sorologia e imunologia de todas as amostras coletadas no município de Barcelos. Foi demonstrado pelo teste de simulação de Monte Carlo que os dados de sorologia (incluindo as amostras soropositivas para o teste Elisa) estão significativamente ($p < 0,05$) relacionados à idade	22
Figura 11. Chegada da piaçava no porto de Barcelos	23

LEGENDAS

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* .

FMT-AM - Fundação de Medicina Tropical – Amazonas.

HEMOAM - Hemocentro do Amazonas.

IL-6 - Interleucina-6.

IL-12 - Interleucina-12.

LCD3CD4+ - Linfócito CD3CD4+

LCD3CD8+ - Linfócito CD3CD8+

LCD69+ - Linfócito CD69+

RDA - Análise de Redundância.

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Grupo de Pesquisa em Microscopia Quantitativa da UFAM/CNPq e aos seus autores e coordenadores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Este trabalho foi financiado pelo Programa CNPq/Edital Casadinho, coordenado pela Dra. Adriana Malheiro e pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas – PIBIC/UFAM de 2010-2011.

Agradeço aos colaboradores do HEMOAM, Dra. Kátia Luz, Nesiane Siqueira, Allyson Guimarães, João Paulo Pimentel, Walter Luiz e ao Dr. Jorge Guerra da FMT-AM, ao Secretário de Saúde de Barcelos (na pessoa do Sr. Marcos Lima) e Hospital Municipal deste município, aos colaboradores durante as coletas: Juliana L. V. Lameiras, Ílan Rodrigues e Lucas Nobre.

A identidade e as informações pessoais de todos os participantes (conforme TCLE) foram (e serão) preservadas durante toda a fase de execução deste estudo.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas: fisiopatogenia e formas clínicas

A doença de Chagas é endêmica em toda a América Latina, com formas congênita ou adquirida, fases aguda, subaguda ou crônica e que pode evoluir de maneira assintomática ou desenvolver quadros graves, podendo provocar limitação funcional intensa e a morte (PEDROSO e OLIVEIRA, 2009).

O *Trypanossoma cruzi* é o protozoário causador da doença de Chagas, e alterna ciclos vitais entre hospedeiros vertebrados e dezenas de espécies silvestres de insetos hematófagos da família Reduviidae conhecidos como barbeiros. Ao picar o homem, o barbeiro ingere formas tripomastígotas que, em seu tubo digestivo, diferenciam-se e multiplicam-se em tripomastígotas metacíclicos infectantes. Estas são eliminadas com as fezes no momento de uma nova picada, contaminando outro homem, quando esse se coça. O sistema imunológico do indivíduo infectado impede o aumento da infecção, mas não o cura, e torna-se crônico. Além disso, processos inflamatórios, fibróticos e autoimunes promovem lesões estruturais e funcionais progressivas nos tecidos e na microvasculatura, e destruição dos neurônios dos sistemas nervosos autônomo cardíaco e gastrointestinal (PEDROSO e OLIVEIRA 2009).

De acordo com Pedroso e Oliveira (2009) a fase aguda de Chagas dura de 2 a 12 semanas, período na qual a maioria dos infectados são assintomáticos. Nessa fase estão clinicamente presentes o chagoma de inoculação, febre prolongada e hepatoesplenomegalia. A fase crônica indeterminada pode durar dezenas de anos e os pacientes são assintomáticos. A cada ano 3% desses pacientes evoluem para a fase crônica sintomática que inclui sintomas como; insuficiência cardíaca progressiva, cardiomegalia, arritmias, esofagopatia e colopatia.

1.2. A doença de Chagas na região Amazônica

Apesar de a presença da parasitose de *T.cruzi* já ter sido descrita na Amazônia por Carlos Chagas, até agora o problema tem recebido pouca atenção e não é relatado habitualmente pelos serviços de saúde. O conhecimento da ocorrência da doença é limitado, mas algumas observações e evidências mostram que o problema pode ser mais grave do que se pensa (ROJAS et al. 2004).

O primeiro caso de doença de Chagas na Amazônia brasileira foi documentado em 1969 no Pará (SHAW et al. 1969). Em 1977, foram registrados seis casos autóctones soropositivos em Barcelos (COURA et al. 2002).

Durante muito tempo a Amazônia brasileira tem sido considerada como área não endêmica para a doença de Chagas, porém há um número crescente de casos agudos, a maioria em microepidemias e casos isolados (ALBAJAR et al. 2003). No inquérito sorológico Nacional realizado pelo Ministério da Saúde (1975/1980) descobriu-se que a soroprevalência da infecção chagásica era maior em alguns municípios da região norte do que a média nacional, sendo Japurá (AM) 6,9%, Novo Airão (AM) 6,8%, Barcelos (AM) 6,3%, Colares (PA) 5,1% e a média nacional de 4,2% (CAMARGO et al. 1984).

Vários inquéritos sorológicos foram feitos na área de Barcelos, Santa Isabel do Rio Negro e em populações ribeirinhas e piaçabais do próprio Rio Negro, Estado do Amazonas (ALBAJAR et al. 2003 e COURA et al. 2002). Os estudos demonstraram uma importante prevalência sorológica da infecção chagásica, o que levou a considerar a doença de Chagas como emergente nas áreas citadas.

De acordo com Rocha et al. (2004) os fatores desencadeadores da doença de Chagas na Amazônia são as migrações humanas e o crescente desmatamento. As modificações climáticas na região com o surgimento de climas mais secos favorecem a adaptação dos triatomíneos (VALENTE et al. 1999).

Foram registradas 18 espécies de triatomíneos na região Amazônica, sendo que a *Rhodnius brethesi* é a espécie envolvida em um foco de transmissão silvestre da doença de Chagas em coletores de piaçaba no Alto Rio Negro, Amazonas (DIAS et al. 2002). Estudos realizados por Coura et al. (1999) demonstraram que indivíduos soropositivos para anticorpos de *T. cruzi*, relataram a presença de triatomíneos em seus locais de trabalho (piaçabais), mencionando também a ocorrência de picadas nas cabanas utilizadas como abrigo nestas áreas. De acordo com Mallet et al. (2005), estudos conduzidos nos municípios de Santa Isabel do Rio Negro e Barcelos comprovaram a presença da espécie *R. brethesi* nas árvores *Leopoldinia piassaba*. Por viverem entre as fibras dessas árvores esses insetos são conhecidos popularmente como “piolho da piaçaba” (MOURA et al. , 2005).

O mecanismo de transmissão na Amazônia não é típico ao de áreas endêmicas no qual o vetor instala-se e permanece na residência. Na Amazônia são três possibilidades; transmissão oral (ingestão das fezes do vetor), vetorial nas residências, mas sem colonização, e vetorial fora de casa como no caso dos piaçabais (SILVEIRA, 2007).

1.3. Aspectos imunológicos da doença de Chagas

Estima-se que dos infectados pelo *T. cruzi* cerca de 30% desenvolvem a forma clássica da doença. Os indivíduos assintomáticos são denominados como portadores da doença indeterminado e podem ou não desenvolver doenças cardíacas. Hoje, sabe-se que no caso da doença de Chagas o dano cardíaco ocorre pela resposta imunológica do hospedeiro (SCHRIEFER e CARVALHO, 2008).

A primeira reação ao *T. cruzi* durante a fase aguda implica na migração de células mononucleares para o foco da lesão onde há ruptura das células parasitadas liberando, então, citocinas que desencadeiam o processo inflamatório. A queda da

parasitemia ocorre em decorrência da resposta imune efetora do hospedeiro, dando início à fase crônica (MOLICA, 2007). Baseado nos aspectos imunológicos, a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* pode ser caracterizada pelo balanço entre o acúmulo de uma eficiente resposta imune (inata e adaptativa) e a presença de poucos parasitos no tecido do hospedeiro. Este balanço pode levar a um longo período assintomático da doença, mas em uma porção significativa dos pacientes, por razões desconhecidas, ocorre um distúrbio nessa regulação favorecendo o aparecimento das manifestações clínicas graves da doença na fase crônica (MOLICA, 2007).

A ativação dos macrófagos representa um evento relevante da imunidade inata na resistência a infecção pelo *T. cruzi*. O processo de fagocitose mediado por macrófagos é capaz de ativar a produção de uma série de citocinas inflamatórias, tais como IL-12 e TNF- α , que contribuem para produção de IFN- γ a qual leva a redução da parasitemia e a mortalidade de animais infectados, promovendo a estimulação de macrófagos e a produção de metabólitos tóxicos para o parasito (MOLICA, 2007).

Na região Amazônica, o município de Barcelos representa uma área onde é praticado o extrativismo da piaçava assim como a produção e o consumo de açaí, ambas atividades relacionadas com surtos da doença. Por esse motivo, é importante que se realizem pesquisas na região, com o intuito de se conhecer mais o padrão dessa doença, quem são os indivíduos mais expostos e como prevenir uma epidemia nos próximos anos.

2. OBJETIVOS

Este estudo descreve um perfil epidemiológico e da resposta imune da doença de Chagas no município de Barcelos através de exames sorológicos, citometria e dosagem de citocinas. A região do Médio Rio Negro, onde se encontra a cidade de Barcelos, é uma das áreas na Amazônia onde há relatos de microsurtos e de casos da doença de Chagas. As atividades praticadas na região envolvidas com a doença de Chagas são o extrativismo da piaçava, produção e consumo do suco de açaí.

Os protocolos metodológicos para análise da epidemiologia foram:

- a) Aplicação de um questionário com os fatores de risco para cada voluntário doador de sangue;
- b) Realização da sorologia pelo método *ELISA*;
- c) Elaboração de um quadro epidemiológico da situação atual no município de Barcelos-AM.

Os protocolos metodológicos para análise imunológica foram:

- a) Realizar a citometria de fluxo para as células: linfócitos, linfócitos CD69+, linfócitos CD3CD4+, linfócitos CD3CD8+, monócitos, monócitos CD69+, neutrófilos e neutrófilos CD69+ no plasma das 154 amostras coletadas;
- b) Realizar a dosagem de citocinas IL-6 e IL-12 pelo método de *ELISA* da mesma amostra;
- c) Fazer um estudo imunológico comparando-se os resultados da citometria e dosagem de citocinas de indivíduos soropositivos e soronegativos.

3. HIPÓTESES

3.1 Hipótese 1:

Hipótese nula (H_0):

- Os resultados de sorologia para o teste Elisa da doença de Chagas em Barcelos-AM **não** possuem um perfil epidemiológico característico;

Hipótese alternativa (H_a):

- Os resultados de sorologia para o teste Elisa da doença de Chagas em Barcelos-AM **possuem** um perfil epidemiológico característico.

3.2 Hipótese 2:

Hipótese nula (H_0):

- Os resultados de sorologia para o teste Elisa da doença de Chagas em Barcelos-AM **não possuem** um perfil imunológico específico;

Hipótese alternativa (H_a):

- Os resultados de sorologia para o teste Elisa da doença de Chagas em Barcelos-AM **possuem** um perfil imunológico específico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Determinação do número de amostras

O número de amostras do estudo foi achado usando-se a fórmula do tamanho da amostra:

$$D^2 \cdot (N-1) + Z^2 \cdot P(1-P)$$

Onde, N= tamanho da população do estudo (886, baseado no estudo de COURA et. al. 2002)

P= prevalência = 0,105

D= erro amostral

Z= 1,96.

Portanto, para obtenção de um erro amostral de 4%, precisa-se de 186 amostras.

Apesar da necessidade de 186 amostras, neste estudo obtivemos 154 amostras. É importante relatar a extrema dificuldade para obter o consentimento assinado no TCLE dos moradores daquele município. O município de Barcelos, localiza-se à 450 km em linha reta de Manaus (fig. 1). O transporte da capital a este município é feito principalmente por via fluvial nos barcos tipo “recreios”. Em alguns casos, a população desse município fica isolada no período da seca dos rios. Apesar de todas as outras dificuldades, este trabalho obteve 83% da suficiência amostral necessária, conforme equação supracitada.

4.2 Coleta e armazenamento das amostras

Foram visitadas residências no município de Barcelos (fig. 2) por uma equipe de colaboradores do projeto da UFAM e técnicos de enfermagem do município de Barcelos, onde foi aplicado um questionário (ANEXO 01) por residência verificando os fatores de risco de cada residente. Daquele que se obteve o maior fator de risco para exposição da doença de Chagas e assinou o formulário de consentimento-TCLE

(ANEXO 02), foi feita a coleta de 10 mL de sangue por punção venosa periférica, o qual foi colocado em um tubo de ensaio. Essa quantidade de sangue é exigida pelos colaboradores do HEMOAM para realização dos testes. Coletou-se um total de 154 amostras.

As residências visitadas foram distribuídas entre todos os bairros do Centro, São Francisco, São Lázaro, São Sebastião, Aparecida e Nazaré, para que o estudo tivesse uma cobertura total da cidade.

As amostras coletadas foram centrifugadas no próprio Hospital Municipal (fig. 3) e somente o soro foi utilizado para as análises. Em seguida, foram armazenadas em recipientes térmicos apropriados tipo “cooler” com gelo seco e, no prazo de 24 horas, enviadas por transporte aéreo para o Hemocentro do Amazonas HEMOAM em Manaus onde foram imediatamente analisadas e/ou armazenadas em -40°C .

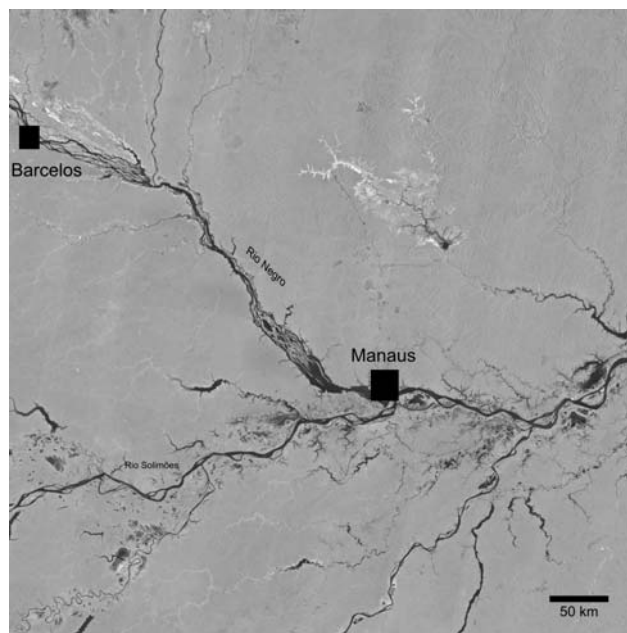


Figura 1. Localização do município de Barcelos-AM, no Médio Rio Negro.



Figura 2. Abordagem aos moradores de Barcelos.



Figura 3. Hospital Geral de Barcelos onde as amostras foram centrifugadas.

4.3 Sorologia para detecção do anticorpo anti *Trypanossoma cruzi*

O método utilizado para a sorologia foi o *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) tendo por objetivo a detecção qualitativa de anticorpos da classe IgG para o *Trypanosoma cruzi* nas amostras de soro ou plasma humano de acordo com as especificações do fabricante. O kit utilizado foi o CHAGAS TEST ELISA III[®] da Abbot Laboratórios do Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil.

Antes de iniciar o ensaio, esperou-se que os reativos atingissem a temperatura ambiente, então, diluiu-se a solução de lavagem 25X com água destilada ou deionizada. Colocou-se no suporte os poços correspondentes aos números das amostras a serem analisadas, incluiu-se dois poços para o controle positivo e dois para o controle negativo (fig. 4).

A cada poço adicionou-se 200 µL de diluente da amostra. Adicionou-se 20 µL de cada amostra ou controle. Ao adicionar as amostras, o diluente da amostra mudou de cor sendo que o poço no qual não houve amostra a cor era violeta, na amostra de soro ou plasma a cor era azul, no controle positivo a cor era turquesa e no controle negativo era verde.

Em seguida, fechou-se a placa com o selo adesivo fornecido, para impedir a evaporação do reagente, e incubou-se por 30 minutos a 37 °C. Retirou-se o adesivo e lavou-se a placa, para isso, eliminando-se o conteúdo e adicionando-se a cada poço 350 µL de solução de lavagem diluída. Eliminou-se a solução e repetiu-se a operação mais 4 vezes. Após a lavagem, inverteu-se a placa e bateu-se suavemente sobre papel absorvente para eliminar qualquer excesso de líquido nos poços. Em seguida, retirou-se somente o volume conjugado que foi utilizado depositando-o num recipiente limpo.

Adicionou-se 100 µL de conjugado a cada poço. Fechou-se a placa com um selo adesivo novo e incubou-se por 30 minutos a 37 °C. Lavou-se de maneira similar ao

descrito anteriormente e adicionou-se 100 μL de substrato a cada poço e incubou-se a placa no escuro durante 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi parada adicionando 100 μL de Solução de Parada da Reação em cada poço.

Os resultados foram lidos em um leitor de microplacas utilizando-se um filtro de 450 nm. Logo após a leitura calculou-se o valor do *cutoff* a partir dos valores de absorbância dos poços correspondentes aos controles positivos e negativos. O valor *cutoff* foi determinado utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Valor } \textit{cutoff} = (\text{média controles positivos} + \text{média controles negativos}) \times 0,35.$$

Uma amostra é considerada positiva quando sua absorbância for maior que o valor *cutoff*.

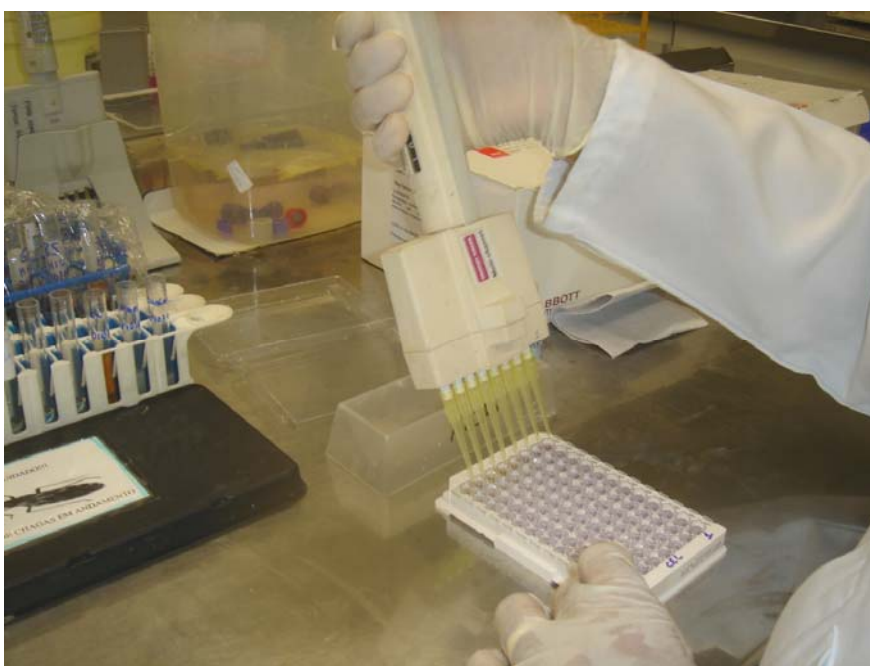


Figura 4. Procedimentos para a análise sorológica pelo *ELISA* realizada nas dependências do HEMOAM.

4.4 Dosagem de citocinas

As dosagens de citocinas das amostras foram feitas através do método *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA), utilizando-se anticorpos monoclonais e citocinas recombinantes de acordo com as especificações do fabricante. Foram quantificadas as citocinas inflamatória IL-6 e a do padrão Th1 IL-12, as demais inflamatórias (IL-1, TNF- α , IL-8, TGF- β), as do padrão Th2 (IL-4, IL-5), Th1 (IFN- γ e supressora (IL-10)) ainda serão analisadas, pois o produto final deste estudo será a publicação numa revista especializada na área. As técnicas seguiram os protocolos de cada kit das citocinas, para este procedimento foi utilizado o Kit BD OptEIA – BD Bioscience, San Diego, CA, USA.

As soluções que foram usadas no ELISA para dosagem sérica de citocinas circulantes foram: o tampão de cobertura (tampão de ligação), tampão fosfato salino concentrado (PBS), diluente de ensaio (PBS e soro fetal bovino), tampão de lavagem (PBS e Tween 20) e solução de bloqueio (preferencialmente, ácido sulfúrico 2M). O método utilizado para realizar o teste baseou-se na interação anticorpo-antígeno e seguiu as normas padrões definidas pelo *Kit* da citocina. Utilizou-se placas com 96 poços cada uma, contendo anticorpo de captura (Ac1) diluído em tampão de cobertura. Após esse procedimento, as placas foram envoltas por papel alumínio e incubadas em *overnight* à 4⁰C.

No dia seguinte, foi feita a lavagem da placa em lavadora automática ELISA Atlantis Microplate Washer (Asy HITECH, Eugendorf, Áustria). Os poços foram aspirados e lavados 3 vezes com 300 μ L de Tampão de Lavagem. As placas foram invertidas em papel absorvente para remoção de tampão residual. Foram adicionados 200 μ L de diluente de ensaio em cada poço e a placa foi envolvida com papel alumínio para incubação à temperatura ambiente por uma hora. Seguiu-se a aspiração e lavagem

dos poços 3 vezes com 300 μ L de Tampão de lavagem. Foi pipetado 100 μ L de cada padrão, amostras e controle dentro dos poços apropriados. A placa foi novamente envolvida em papel alumínio e incubada à temperatura ambiente por 2 horas. Foi realizada nova lavagem e aspiração 5 vezes com 300 μ L de Tampão de lavagem. Em cada poço foi adicionado 100 μ L de anticorpo marcado com estreptoavidina e enzima HRP (Dako, Carpinteira, CA, USA). Foi realizada nova incubação à temperatura ambiente por uma hora seguida de lavagem e aspiração 7 vezes com 300 μ L de Tampão de lavagem. Em seguida foi adicionado 100 μ L de solução de substrato (TMB) (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) em cada poço e a placa foi envolvida em papel laminado, incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Em cada poço foi adicionado 50 μ L de solução bloqueio de reação (ácido sulfúrico 2N). Foi realizada a leitura das placas em leitor ELISA marca ASYS EXPERT PLUS na absorvância 450nm por 30 minutos após o bloqueio da reação.

4.5 Imunofenotipagem das Células por Citometria de Fluxo

Para a citometria de fluxo foi utilizado 50 μ L de sangue venoso coletado com EDTA, sendo incubado com 01 μ L de anticorpos monoclonais por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os marcadores de superfície celulares avaliados foram: anti-CD8 marcado com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), anti-CD4 marcados com ficoeritrina (PE), anti-CD3 marcado com PerCP, anti-CD69 marcado com APC (Tubo/Programa 1); Anti-CD4 marcado com FITC, anti-CD25 marcado com APC e anti-FoxP3 (intracelular) marcado com PE (Tubo/Programa 2) os quais foram colocados no fundo dos tubos. Após a marcação dos glóbulos brancos, as hemácias presentes foram lisadas com 2 mL de solução de lise e incubadas por 10 min. Em seguida foram lavadas com 2mL de PBS (solução fisiológica tamponada com fosfato) e centrifugadas por 7 minutos, a 1300 rpm. Posteriormente o sobrenadante foi

desprezado por inversão, seguido de adição 300 μ L de PBS e 1% de formaldeído. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur com sistema de detecção de quatro cores (Becton Dickinson). A identificação das populações celulares de interesse foi realizada utilizando-se o programa *FlowJo*.

4.6. Sorologia confirmatória pelo Western Blot

As amostras selecionadas já foram encaminhadas ao FMT-AM e aguarda-se a realização do teste com proteínas do antígeno TESA do *T. cruzi*.

4.7. Análises dos dados

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade das variâncias (Kolmogorov-Smirnov). Em seguida foram separados em dois grupos soropositivos e soronegativos para o teste de Elisa, conforme valor *cutoff* (0,350). Os dados de citocinas e citometria para estes dois grupos foram comparados por meio do test U de Mann-Whitney. As relações entre os dados de epidemiologia, análise de Elisa, citocinas e citometria foram realizadas por meio da Análise de Redundância (RDA). Esta análise multivariada reduz os dados e os decompõe em dois eixos principais (eixo I e eixo II). Estes dois eixos explicam a maior parte da variabilidade dos dados de Elisa (relacionados à soropositividade) dos residentes do município de Barcelos. A significância foi avaliada a partir do teste simulação de Monte Carlo. Em todos os casos, o nível de significância aceito foi de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Dados epidemiológicos

A coleta foi realizada na cidade de Barcelos distribuída entre os bairros de Aparecida, São Lázaro, Santo Antônio, São Sebastião, centro e indivíduos oriundos de comunidades vizinhas. Foram coletadas 154 amostras, sendo que 66.23% dos voluntários eram do sexo masculino e 33.76% feminino. Em relação à faixa etária, a mais abrangida foi a de 21 a 30 anos com 23,38% e a menos foi a de 1 a 10 anos com 6,49% (tabela 1).

A primeira sorologia foi realizada pelo método *ELISA* obtendo-se 11 soropositivos, logo após a mesma metodologia foi repetida, obtendo-se 8 soropositivos (fig. 5). O teste confirmatório ainda está sendo realizado pelo método Western Blot. Quanto à sorologia, percebe-se que houve soropositividade para doença de Chagas em 5,19% e quanto à distribuição da faixa etária, a mais acometida foi a de 51 a 60 anos com 16,67% dos indivíduos soropositivos (tabela 2).

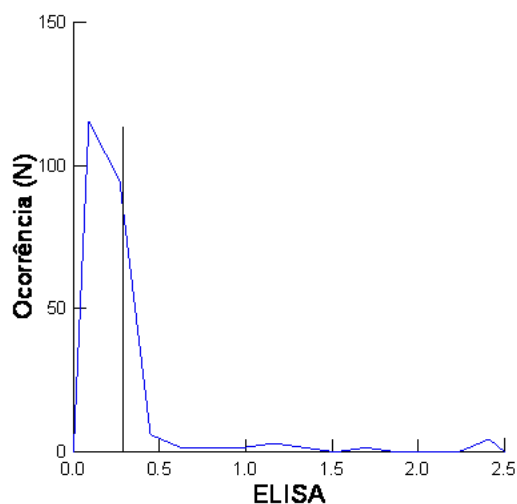


Figura 5. Variação nos valores de Elisa para sorologia da doença de Chagas para as amostras (N=154) analisadas provenientes do município de Barcelos, Amazonas. A linha indica o valor cut off do *ELISA* 0,350. Todos valores acima deste foram considerados como soropositivos para a doença de Chagas neste estudo.

Tabela 1. Distribuição das amostras em relação à faixa etária e sexo dos voluntários.

Idade	Sexo		Total	
	M	F	N	%
1 a 10	4	6	10	6,49
11 a 20	16	12	28	18,18
21 a 30	26	10	36	23,38
31 a 40	17	6	23	14,94
41 a 50	18	6	24	15,58
51 a 60	10	8	18	11,69
> 60	11	4	15	9,74
Total	102	52	154	100,00

Tabela 2. Distribuição da soropositividade para doença de Chagas pelo *ELISA* e a faixa etária dos voluntários.

Idade	N	%	ELISA	%
1 a 10	10	6,49	0	0,00
11 a 20	28	18,18	0	0,00
21 a 30	36	23,38	0	0,00
31 a 40	23	14,94	1	4,35
41 a 50	24	15,58	2	8,33
51 a 60	18	11,69	3	16,67
> 60	15	9,74	2	13,33
Total	154	100,00	8	5,19

Em relação à profissão, percebe-se uma alta proporção dos indivíduos que trabalham com extração de piaçava e a doença de Chagas, sendo que 29,41% desses indivíduos são soropositivos (tabela 3). A relação entre o conhecimento de ter sido picado pelo barbeiro e a soropositividade é alta, com 17,07% desses indivíduos soropositivos (tabela 4).

Tabela 3. Relação entre as amostras soropositivas para doença de Chagas pelo *ELISA* e a profissão dos indivíduos estudados.

Profissão	N	Soropositivos	%
Extração da Piaçava	17	5	29,41
Outros	137	3	2,19

Tabela 4. Relação entre os indivíduos soropositivos para doença de Chagas pelo *ELISA* e os indivíduos que relataram terem sido picados pelo barbeiro.

Picada	N	Soropositivos	%
Sim	41	7	17,07
Não	113	1	0,88
Total	154	8	

5.2. Citocinas sorológicas

Os valores para as citocinas IL-6 (fig. 6a) e IL-12 (fig. 6b) plasmáticas apresentaram um padrão de distribuição não-gaussiano (teste de Kolmogov-Smirnov, $p < 0,05$). Embora os valores médios de IL-6 e IL-12 para os indivíduos soropositivos sejam aparentemente menores que para os soronegativos para o Elisa (tabela 5), estas variações não foram estatisticamente significativas (teste U de Mann-Whitney, $p > 0,05$).

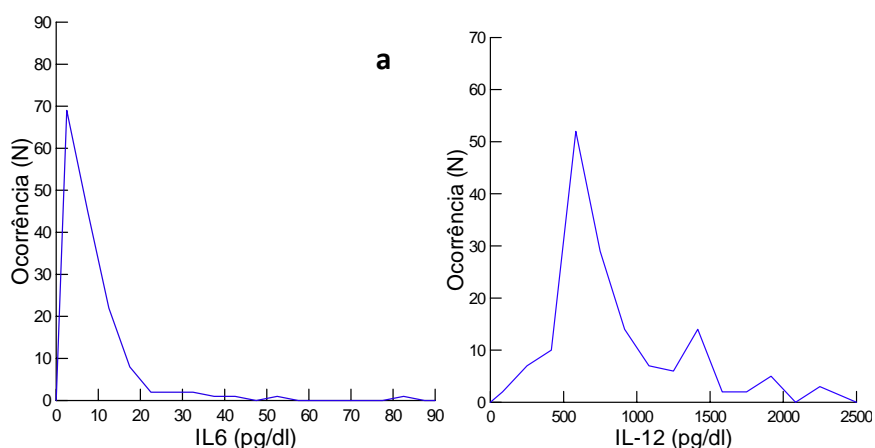


Figura 6. Distribuição da concentração de citocinas Il-6 (a) e IL-12 (b) nas amostras coletadas de 154 residentes da cidade de Barcelos, AM.

Tabela 5. Média±desvio padrão das IL-6 e IL-12 dos indivíduos soropositivos e soronegativos para o teste Elisa para doença de Chagas na região de Barcelos.

SOROLOGIA	IL-6 (pg/dl)	IL-12 (pg/dl)
Soropositivos	6,09±6,495	746,26±480,03
Soronegativos	10,57±10,354	862,89±460,86

5.3. Citometria de fluxo

5.3.1 Linfócitos

A distribuição dos dados de citometria de fluxo para os linfócitos, linfócitos CD69+, linfócitos CD3CD4+ e linfócitos CD3CD8+ das 154 amostras provenientes dos residentes do município de Barcelos estão apresentados na figura 7. Não houve diferenças significativas entre os grupos considerados soropositivos e soronegativos para nenhum dos subtipos de linfócitos estudados (tabela 6).

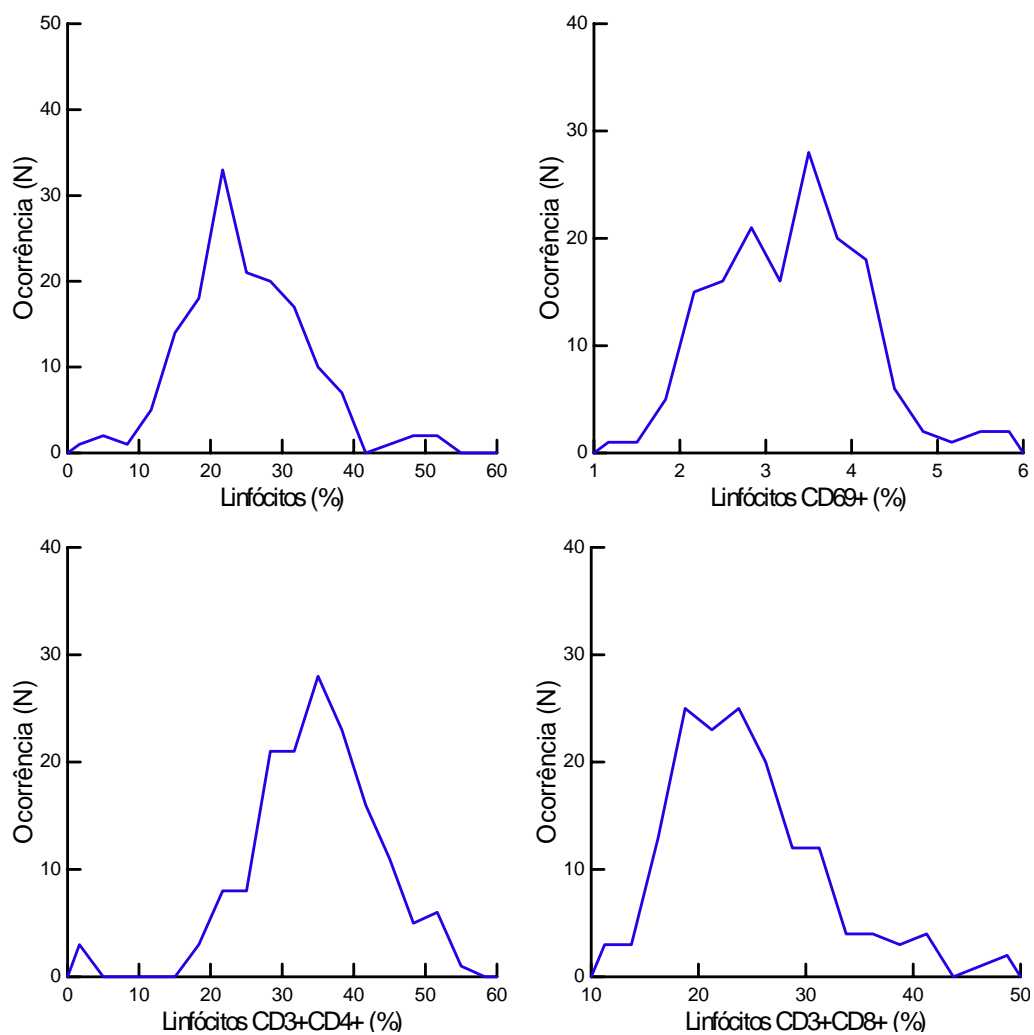


Figura 7. Ocorrência dos subtipos de linfócitos nas amostras coletadas de 154 residentes da cidade de Barcelos, AM.

Tabela 6. Média±desvio padrão de linfócitos, linfócitos CD69+, linfócitos CD3CD4+ e linfócitos CD3CD8+ entre as amostras soropositivas e soronegativas para o teste Elisa (*).

SOROLOGIA*	Linfócitos	LinCD69+	LCD3CD4+	LCD3CD8+
Soropositivos	24,5±7,5	3,4±0,8	30,5±6,5	21,6±4,0
Soronegativos	25,1±8,2	3,29±0,9	34,6±9,2	24,6±7,3

5.3.2 Monócitos

O histograma de frequência para mostrar a distribuição dos dados de citometria de fluxo para os monócitos e monócitos CD69+ (fig. 8). A média entre os valores destes tipos celulares não apresentou diferença significativa entre os grupos considerados soropositivos e soronegativos para o teste Elisa para a doença de Chagas (tabela 7).

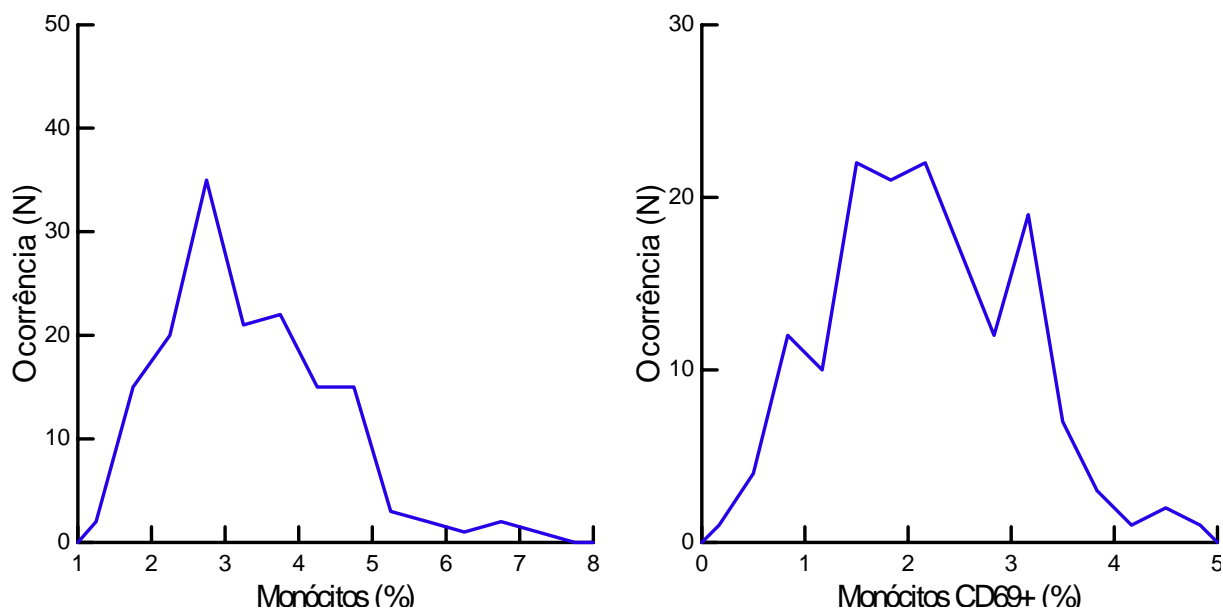


Figura 8. Ocorrência da proporção de monócitos e monócitos CD69+ nas amostras coletadas de 154 residentes da cidade de Barcelos, AM.

5.3.4 Neutrófilos

A distribuição dos dados de citometria de fluxo para os neutrófilos e neutrófilos CD69+ das 154 amostras provenientes dos residentes do município de Barcelos estão apresentados na figura 6. (Fig. 9). A análise estatística demonstra que não houve diferença significativa entre os valores médios de neutrófilos de acordo com os dados de sorologia (tabela 7).

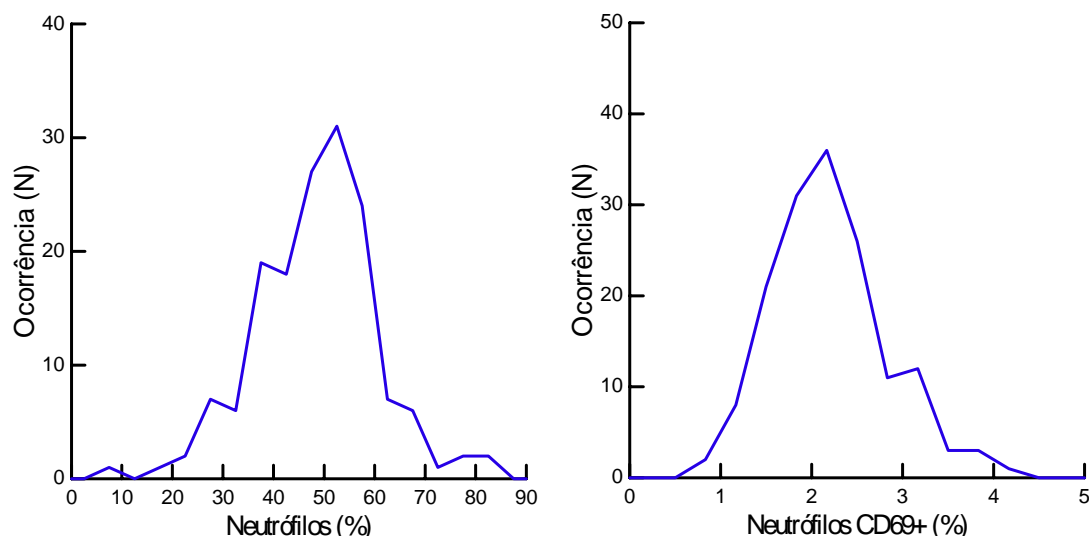


Figura 9. Ocorrência da proporção de neutrófilos e neutrófilos CD69+ nas amostras coletadas de 154 residentes da cidade de Barcelos, AM.

Tabela 7. Média±desvio padrão de monócitos, monócitos CD69+, neutrófilos e neutrófilos CD69+ entre as amostras soropositivas e soronegativas para o teste Elisa (*).

SOROLOGIA*	Monócitos	MonCD69+	Neutrófilos	NeuCD69+
Soropositivos	3,3±1,3	2,3±0,9	45,1±10,9	2,0±0,69
Soronegativos	3,3±1,1	2,2±0,9	48,4±12,1	2,2±0,6

5.4 Epidemiologia e imunologia

As análises de RDA foram realizadas com os dados de epidemiologia e imunologia onde os eixos I e II explicam 26,4% e 18,3% respectivamente da variância dos dados. O RDA mostrou uma relação proporcional entre os dados epidemiológicos e os dados de sorologia (fig. 10). Pode-se observar uma relação direta entre a soropositividade do teste *ELISA* e a idade (teste de simulação de Monte Carlo, $p < 0,05$), sendo que a maior parte dos soropositivos são os indivíduos mais velhos. Uma tendência semelhante,

porém não significativa, pode ser observada quando se relaciona o estado civil e a soropositividade, sendo essa considerada significativa nos indivíduos que possuem união estável, viúvos ou separados do que nos solteiros. Quanto ao sexo, percebe-se que os soropositivos são, em sua maioria, homens e que conheciam o barbeiro. Indivíduos que trabalham com a extração da piaçava (fig. 11) estão significativamente mais relacionados com os dados de *ELISA* (soropositividade para a doença de Chagas) do que os de outras profissões. Valores mais altos do *ELISA* também estão relacionados com os monócitos CD69+, linfócitos CD3CD8+, monócitos e linfócitos.

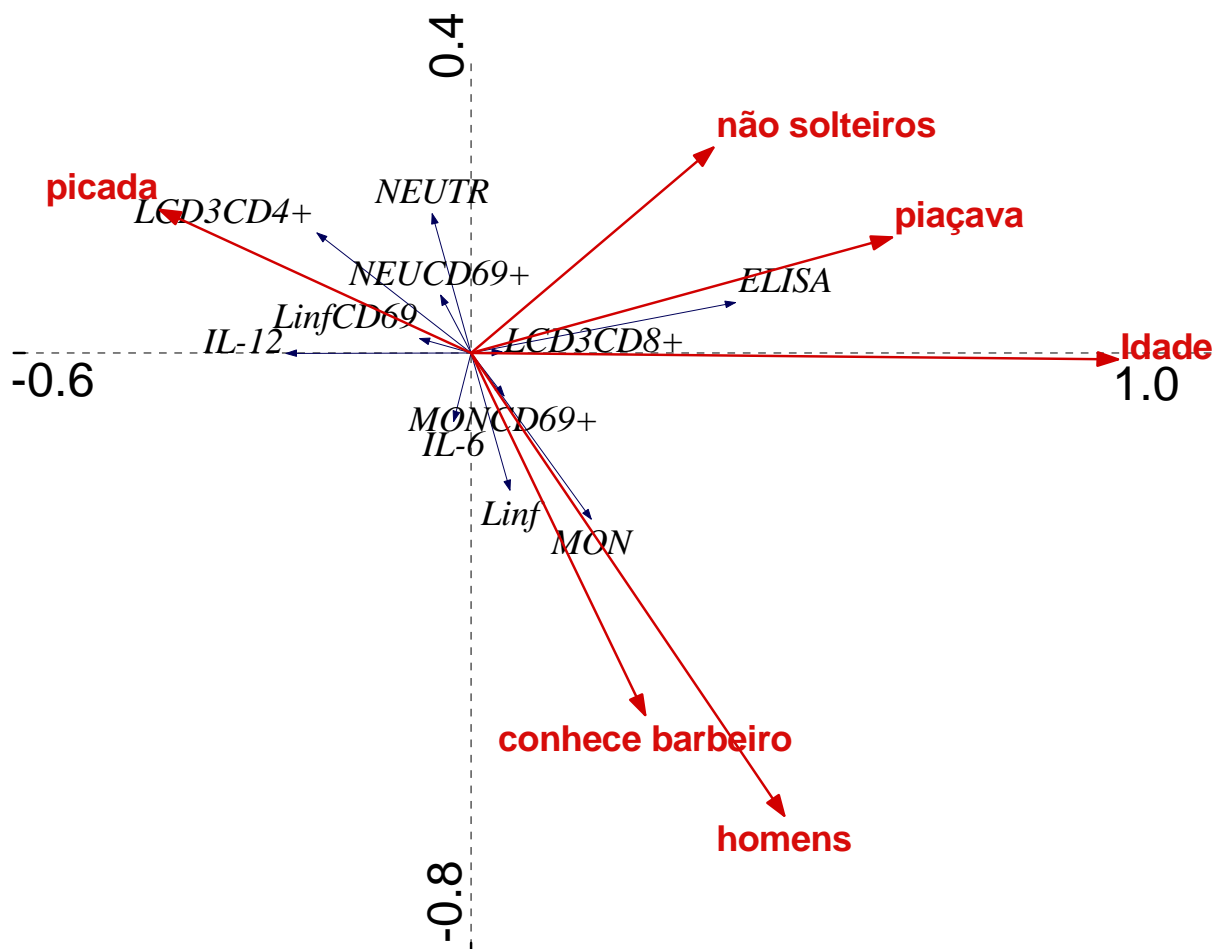


Figura 10. Análise de redundância (RDA) relacionando os dados de epidemiologia, sorologia e imunologia de todas as amostras coletadas no município de Barcelos. Foi demonstrado pelo teste de simulação de Monte Carlo que os dados de sorologia (incluindo as amostras soropositivas para o teste Elisa) estão significativamente ($p < 0,05$) relacionados à idade.



Figura 11. Chegada da piçava no porto de Barcelos.

6. DISCUSSÃO

A doença de Chagas é uma enfermidade na qual os pacientes tendem a desenvolver lesões teciduais que podem desencadear alterações funcionais de caráter debilitante, constituindo sério agravante da condição sócio-econômica do paciente (PINHEIRO, 2007). Acredita-se que o sistema imunológico exerça papel importante na evolução das lesões teciduais, induzidas pelo parasito, através da intensa resposta imune observada em modelo experimental principalmente na fase aguda da doença e que são relacionadas a alterações na fase crônica (MOLICA, 2007).

O aumento do processo de ocupação da floresta Amazônica tem gerado mudança no nicho ecológico que está rapidamente transformando a doença de Chagas na região de estado de enzootia em antropozoonose expressa pela emergência de centenas de casos agudos e crônicos. A endemia chagásica na região Amazônica apresentou-se com os mesmos determinantes da endemização ocorrida nas demais regiões do Brasil, nos

quais dominaram o modelo de colonização e produção agropecuária, aliados a ocupação desordenada do espaço (BRUM-SOARES, 2010).

Nos resultados epidemiológicos percebe-se que há uma alta associação entre a aquisição da infecção chagásica e a atividade laboral de extrativismo da piaçava com 29.41% desses indivíduos infectados. Essa atividade, desempenhada predominantemente por indivíduos masculinos, explica porque os mesmos tem um risco de infecção maior que as mulheres, no estudo, dos 8 indivíduos soropositivos, 7 eram masculinos. De acordo com Brum-Soares et al (2010), os indivíduos masculinos que trabalham com o extrativismo da piaçava tem chance 10 vezes maior de contrair infecção pelo *T. cruzi* do que aqueles que trabalham com o extrativismo de outros produtos. Esse risco indica que a doença de Chagas na região pode ser considerada como agravo do trabalho ou atividade profissional, diferente da maioria dos resultados observados em outras áreas endêmicas do Brasil, nos quais a soroprevalência é maior no grupo de mulheres, atribuída ao fato de hipoteticamente as mesmas permanecerem mais tempo no intradomicílio. Na Amazônia o maior responsável pela transmissão do *T. cruzi* é o *Rhodnius brethesi* que não é dependente de domiciliação e ataca o homem no ambiente de trabalho ou descanso, como evidenciado por Coura et. al (1994).

A faixa etária mais acometida, que foi a de 51 a 60 anos, com 16,67% dos voluntários infectados, também pode ser explicada pela relação com a atividade laboral, pois a maior parte dos indivíduos da região nessa faixa etária tem histórico de trabalho com o extrativismo da piaçava.

Há uma alta associação entre fato de ter sido picado pelo barbeiro e a infecção, 17% dos indivíduos que dizem terem sido picados pelo barbeiro são soropositivos e somente 0,88% dos indivíduos infectados disseram não ter sido picado pelo barbeiro,

isso demonstra que a transmissão vetorial típica da região parece ser superior a transmissão via oral, pelo consumo do suco de açaí. A transmissão via oral causa microsurtos de infecção aguda chagásica que dificilmente passam despercebidos pelas autoridades, ao contrário da transmissão vetorial.

No primeiro teste sorológico pelo *ELISA* obteve-se um número superior de soropositivos, 11 em comparação ao segundo quando se obteve 8. Esse fato pode ser explicado pela presença de reações cruzadas com anticorpos heterófilos que podem induzir a reações cruzadas com anticorpos naturais anti *T. cruzi*. Essas reações podem ser induzidas por diversas infecções, inclusive a causada por *Leishmania sp* (COURA et al. 2002).

Na doença de Chagas, dados da literatura, demonstram que citocinas inflamatórias são essenciais durante a fase aguda da infecção e são produzidas na fase crônica, possivelmente pela exposição crônica ao parasita. A fase aguda apresenta uma forte atividade pró-inflamatória, com a produção abundante de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 as quais apresentam papel na eliminação do parasita e sobrevivência do hospedeiro. Durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, a produção de $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ é induzida pela IL-12, levando a uma resposta imune protetora mediada por células (BARBOSA, 2008). No presente estudo, obtiveram-se valores discrepantes de IL-12 com diferença de até quatro vezes na média entre os indivíduos soropositivos e soronegativos, no entanto, a análise estatística revelou que essa relação não foi significativa ($p>0,05$). É interessante notar que dentro do grupo dos indivíduos soropositivos apenas 1 apresentava valores altíssimos de IL-12 (1920) e os outros 7 apresentavam valores baixos (média de 530), é provável que esse indivíduo estivesse numa fase aguda da doença enquanto os outros estariam numa fase crônica.

Estudos indicam que altos valores de IL-6, que também é uma citocina pró-inflamatória, estão relacionados com alterações função da célula endotelial humana como recrutamento de leucócitos, coagulação e proliferação da musculatura lisa, os quais podem ter importante implicações na patogênese da doença de Chagas (TANOWITZ et al. 1992). De acordo com Barbosa (2008) as células mononucleares do infiltrado inflamatório cardíaco na doença de Chagas produzem IL-6. No estudo foram observados alguns picos de IL-6, mas nenhum foi entre os soropositivos, isso demonstra que há uma grande diversidade de doenças infecciosas regionais que podem alterar valores dessa citocina. A análise estatística revelou que a diferença entre as médias dos soropositivos e soronegativos não foi uma relação significativa ($p > 0,05$).

No estudo imunológico, sabe-se que durante a infecção pelo *T. cruzi*, ocorre um padrão de resposta de linfócitos Th1 e linfócitos Th2 (MORATO et al. 1998). Sendo que um nível baixo de Th1 e está relacionado ao envolvimento cardíaco, e um alto nível a imunidade protetora e menor patogênese (WARD et al 1999). Valores altos de linfócitos CD3CD8+ estão relacionados a dano miocárdico e pacientes com a forma indeterminada apresentam altos valores de linfócitos CD3CD4+ (MOLICA, 2007). Os monócitos de pacientes com diferentes formas clínicas da doença apresentam perfis fenotípicos funcionais distintos, então os que possuem a forma cardíaca estão comprometidos com intensa resposta inflamatória devido a alta expressão de TNF- α , e os da forma indeterminada são moduladores com alta expressão de IL-10 (MOLICA, 2007). Os neutrófilos quando em altos valores sugerem infecção aguda, portanto, é difícil relacionar com a doença de Chagas sem o aumento de outras células concomitantes.

A análise dos resultados da citometria de fluxo mostrou que não houve diferença significativa entre os valores de linfócitos, linfócitos CD69+, monócitos, monócitos

CD69+ e neutrófilos CD69+ entre soronegativos e soropositivos. No caso de linfócitos CD3CD4+, linfócitos CD3CD8+ e neutrófilos os indivíduos soronegativos apresentavam em média, valores menores que os soropositivos em, 4.1, 3.1 e 3.3 respectivamente. No entanto, a análise estatística revelou que essas diferenças foram insignificantes ($p>0,05$) para todos os grupos celulares estudados na citometria de fluxo.

Como não foram realizados acompanhamentos e exames complementares nos indivíduos soropositivos do estudo, não há como dizer qual é a forma clínica dos mesmos, só que provavelmente possuem infecção crônica, uma vez que os valores de suas células imunológicas não são de valores estatisticamente significativos diferentes em relação aos indivíduos soronegativos.

A análise do RDA mostrou que apenas a idade dentre as variáveis pesquisadas é fortemente relacionada a soropositividade da doença de Chagas, os outros fatores epidemiológicos também tem relação significativa revelando um perfil do indivíduo com doença de Chagas na região Amazônica distinto, pelo menos em termos epidemiológicos, da doença em outras regiões do Brasil. Na região Amazônica, o indivíduo infectado com o *T. cruzi* é homem, morador rural que está em união estável, separado ou viúvo, na faixa etária entre 51 a 60 anos, em sua maioria procedente de comunidades ao redor dos municípios, trabalha com extração da piaçava, reconhece o barbeiro da espécie *Rhodnius brethesi* em seu ambiente de trabalho onde já fora picado várias vezes.

7. CONCLUSÕES

- 1 – A doença de Chagas no município de Barcelos-Am está altamente associada ao extrativismo da piaçava, a picada do barbeiro, sexo masculino e faixa etária entre 51 a 60 anos;
- 2 – A transmissão da doença ocorre por via vetorial extradomiciliar no local de trabalho;
- 3 – Não foi encontrada relação entre o consumo do suco de açaí com a infecção do *T.cruzi*, uma vez que 94,8% dos voluntários consumiam-no;
- 4 – Devido à existência de grande diversidade de doenças infecciosas na região, os resultados da primeira sorologia realizada pelo método *ELISA* mostraram um número significativo de falso-positivos por causa das reações cruzadas;
- 5 – O estudo da dosagem de citocinas não mostrou diferença significativa entre os grupos soropositivos e soronegativos;
- 6 – A citometria de fluxo não mostrou diferença significativa entre os grupos soropositivos e soronegativos.

8. RECOMENDAÇÕES

De acordo com o perfil epidemiológico descrito da doença de Chagas, seria necessário que se realizassem pesquisas de sorologia *in loco* nos trabalhadores dos piaçabais da região do Médio Rio Negro, dessa maneira seria encontrado um número maior de amostras soropositivas, além de se melhor descrever a situação epidemiológica na população de trabalhadores expostos a esse grave fator de risco de transmissão do *T. cruzi* na região. Este trabalho tem a finalidade de alertar as autoridades de saúde pública, para que medidas profiláticas pudessem ser tomadas a fim de evitar uma epidemia nos próximos anos, o que causaria grande impacto negativo na situação sócio-econômica da região. Além disso, recomendamos um monitoramento, um acompanhamento e um olhar diferenciado para esta endemia tanto na região de Barcelos, quanto nas demais localidades amazônicas com surtos de doenças de Chagas.

9. REFERÊNCIAS

- ALBAJAR, Pedro, Viñas. et. al. Miocardiopatia dilatada em pacientes com infecção chagásica crônica. Relato de dois casos fatais autóctones do Rio Negro, Estado do Amazonas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 36 n.3. Uberaba, maio-junho de 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037> acesso: 10/02/2010.
- BARBOSA, Luciana, Gabriel, Nogueira. Expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas no tecido cardíaco de pacientes com Cardiopatia Chagásica Crônica. Tese apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008.
- BRUM-SOARES, Lúcia, Maria. et. al. Morbidade da doença de Chagas em pacientes autóctones da microrregião do Rio Negro, estado do Amazonas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 43n.2. Uberaba, maio-abril de 2010.
- CAMARGO, M. E. et al. Inquérito sorológico da prevalência da infecção chagásica no Brasil, 1975- 1980. Rev Instit Med Trop São Paulo 1984; 26:192-204.
- COURA, José, Rodrigues, BARRET, T.V.; ARBOLEDA, M.N. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção de Chagas? Rev Soc Bras Med Trop 1994; 27: 251-253.
- COURA, José, Rodrigues. et. al. Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it a case of the Brazilian Amazon? Memórias do Instituto Oswaldo Cruz vol. 94. supp.1. Rio de Janeiro, setembro de 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S007402761999000700074&script=sci_arttext&tlng=en acesso: 22/02/2010.
- COURA, José, Rodrigues. et. al. Chagas disease in the Brazilian Amazon. IV. A new cross-sectional study. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. vol. 44 n.3. São Paulo, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S003646652002000300009&script=sci_arttext&tlng=en acesso: 25/02/2010.
- DIAS, João, Carlos, Pinto. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Vol. 28 n.2. 81-87 São José do Rio Preto, abril-junho de 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v28n2/v28n2a03.pdf> acesso: 01/03/2010.
- DIAS, João, Carlos, Pinto.; PRATA, Aluísio.; SCHOFIELD, Christopher, John. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol.35. n.6. Uberaba, novembro-dezembro de 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003786822002000600021&lng=en&nrm=iso&tlng=pt acesso: 10/03/2010.

- DIAS, João, Carlos, Pinto. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. Caderno de Saúde Pública. Vol. 23. supp. 1. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102311X2007001300003&script=sci_arttext&tlng=ES acesso: 07/03/2010.
- MALLET, Jacenir, Reis, Santos. et. al. Morphobiological aspects of *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) from the upper and middle Rio Negro River, Amazon Region of Brazil. I. Scanning electron microscopy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 100. n.8. Rio de Janeiro, dezembro de 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S007402762005000800015&script=sci_arttext&tlng=en acesso: 15/02/2010.
- MOLICA, Andreia, Maria. Associação entre apresentação de antígeno, imunorregulação e morbidade na doença de Chagas. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- MORATO, M. J. F.; COLLEY, D.G.; POWELL, M. R. Cytokine profiles during experimental Chagas' disease. Brazilian Journal of Medical and Biological Research (1998) 31: 123-125.
- MOURA, José, Francisco, Luitgards. et. al. Sobre a possibilidade da ocorrência da doença de Chagas autóctone em Roraima, Amazônia brasileira, 2000-2001. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Vol.47 n.1. São Paulo, janeiro-fevereiro de 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S003646652005000100008&tlng=en&nrm=iso&tlng=en acesso: 21/02/2010.
- PEDROSO, E.R.P.; OLIVEIRA, R.G. Doença de Chagas. In: Blackbook de Clínica Médica. 1 ed. Blackbook Editora. Belo Horizonte, 2007. (643-644p.)
- PINHEIRO, Vladimir, Martins. Respostas Imunes Primária e Secundária, de Células Mononucleares do Sangue Periférico, *in vitro*, de indivíduos Não Infectados e de Pacientes com Doença de Chagas, estimuladas com antígeno de *Trypanossoma cruzi*. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- ROCHA, Dayse, Silva. et. al. Ciclo Biológico em laboratório de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), potencial vetor silvestre da doença de Chagas na Amazônia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.99 n.6 Rio de Janeiro, outubro de 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S007402762004000600010&script=sci_arttext&tlng=pt acesso: 24/02/2010.
- ROJAS, Amadeo. et. al. Reunião Internacional sobre Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia. Implementação da Iniciativa Intergovernamental de Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38(1): 82-89, janeiro-fevereiro de 2005. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S003786822005000100022&script=sci_arttext&tlng=en acesso: 03/05/2010.

SCHRIEFER, Albert.; CARVALHO, Edgar, M. Biomarcadores em Medicina. *Gazeta Médica da Bahia*. N.78. suppl.1. (47-51 p.) 2008. Disponível em: <http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/259/250> acesso: 03/03/2010.

SHAW, J.; LAINSON, R.; FRAIHA, H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev Saude Publica* 1969; 3:153-157.

SILVEIRA, Antônio, Carlos. Group discussion: epidemiological and social determinants of Chagas disease and its control in the Amazon countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 102. suppl. 1. Rio de Janeiro, outubro de 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S007402762007000900012&script=sci_arttext&tlng=en acesso:25/02/2010.

TANOWITZ, Herbert, B. et al. Chagas' disease. *Clinical Microbiology Reviews*. Oct. 1992, p. 400-419. Vol. 5, n.4.

VALENTE, Sebastião, Aldo, Silva.; VALENTE, Vera, Costa.; NETO, Habib, Fraiha. Considerations on the Epidemiology and Transmission of Chagas Disease in the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol.94. s.1. Rio de Janeiro, setembro de 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S007402761999000700077&script=sci_arttext&tlng=en acesso: 03/03/2010.

WARD, LAURA, S. et al. Citocinas séricas na forma crônica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 32 (3): 285-289, maio-junho de 1999. Disponível em: acesso: 12/01/2011.

10. Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago
		2010	2010	2010	2010	2010	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011
1	Levantamento bibliográfico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
2	Preparo dos formulários de consentimento, questionários, materiais de coleta e armazenamento	R	R											
3	Coleta das amostras em Barcelos				R	R								
4	Transporte das amostras ao HEMOAM em Manaus				R	R								
5	Sorologia, citometria de fluxo e dosagem de citocinas das amostras					R	R	R	R					
6	Análise dos resultados da sorologia, citometria e citocinas							R	R	R				
7	Elaboração de quadro epidemiológico e imunológico de acordo com os resultados obtidos								R	R	R			
8	Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)										R	R	R	
9	Preparação da Apresentação Final para o Congresso (obrigatória)										R	R	R	
10	Apresentação Final para o Congresso (obrigatória)													X

R: realizado; X: andamento.

Questionário sobre fatores de risco da doença de Chagas

1. IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO:

- 1.1. NOME COMPLETO: _____
- 1.2. IDADE: _____ SEXO: _____
- 1.3. NATURALIDADE: _____
PROCEDÊNCIA: _____
- 1.4. BAIRRO: _____
- 1.5. PROFISSÃO: _____
- 1.6. ESTADO CIVIL: _____

2. VOCÊ JÁ PASSOU POR PROCEDIMENTO CIRÚRGICO?

SIM _____ NÃO _____

3. VOCÊ JÁ RECEBEU SANGUE?

SIM _____ NÃO _____

4. VOCÊ RECONHECE ESTE INSETO?



<http://en.wikipedia.org/wiki/Rhodnius>

SIM _____ NÃO _____

5. VOCÊ JÁ FOI PICADO POR ELE?

SIM _____ NÃO _____

6. VOCÊ CONSOME AÇAÍ?

SIM _____ NÃO _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

Prezado(a),

Convidamos o Sr.(a) para participar no projeto de pesquisa **“Doença de Chagas na região Barcelos (Médio Rio Negro): sorologia e citometria”**

que tem como objetivo caracterizar os aspectos epidemiológicos-laboratoriais de residentes voluntários da região de Barcelos submetidos a punção venosa para coleta de sangue. A participação neste estudo não é obrigatória, e mesmo tendo começado a participar desta pesquisa, o Sr.(a) poderá, por razões de caráter pessoal, interrompê-lo, sem que com isto venha a ter qualquer problema.

A pesquisa será conduzida por profissionais da saúde e alunos de medicina, e incluirá responder um questionário e coleta de sangue por punção venosa. Tais dados subsidiarão a amostra necessária para os objetivos do presente estudo. O Sr.(a) não terá nenhum custo ao participar deste estudo. Além disso, não há riscos relacionados à participação no estudo, uma vez que a punção será realizada por profissionais de saúde e o sangue coletado será submetido a exames laboratoriais.

A participação neste estudo será confidencial (seus dados pessoais não serão apresentados ao público) e os registros ou resultados dos testes relacionados ao estudo serão mostrados aos responsáveis pela avaliação do projeto e em eventos de natureza científica.

Qualquer dúvida antes, durante ou após o estudo que guarde relação com este, será esclarecida pela pesquisadora co-orientadora da pesquisa.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____

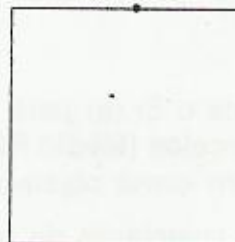
declaro que concordei em participar pesquisa **“Doença de Chagas na região Barcelos**
Av. do Contorno 3000. Mini-campus Bloco C sala 08. Departamento de Morfologia – UFAM Aleixo –
Manaus –AM.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

(Médio Rio Negro): sorologia e citometria", de acordo com os esclarecimentos que me foram dados acima.

Assinatura ou do(a) paciente ou representante legal ou



Impressão digital

Agradecemos sua participação neste estudo, e informamos que, em caso de dúvidas ou esclarecimentos em relação a esse documento, favor entrar em contato com o Orientador Prof. Dr. Wallace Luiz Paxiúba Duncan (wduncan@ufam.edu.br / (92) 3305-4231) ou com acadêmica responsável pela pesquisa Juliana Leal Danilow (judanilow@yahoo.com.br / (92)8120-6811).

WALLICE LUIZ PAXIÚBA DUNCAN

Orientador

ADRIANA MALHEIROS

Co-orientadora – Professora Doutora

JULIANA LEAL DANILOW

Acadêmica Responsável

Manaus, 16 de Abril de 2010