



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): um estudo da resposta imune

Bolsista: Juliana Leal Danilow, CNPq

Manaus

2013



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/0013/2011

**Doença de Chagas na região Barcelos (Médio Rio Negro): um
estudo da resposta imune**

Bolsista: Juliana Leal Danilow

Orientador: Prof. Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Malheiro

Manaus
2013

RESUMO

Recentemente, a região de Barcelos tem chamado a atenção pelo expressivo número de casos dessa doença, mas até agora, o problema tem sido negligenciado pelos órgãos de saúde pública. Para tanto, foi realizada a sorologia para doença de Chagas das amostras de sangue venoso de 154 indivíduos autóctones e residentes no município de Barcelos (Estado do Amazonas) pelo método *ELISA* e a confirmatória pelo método de imunofluorescência indireta. Nessas amostras foram realizadas as análises de linfócitos, linfócitos CD69+, linfócitos CD3CD4+, linfócitos CD3CD8+, monócitos, monócitos CD69+, neutrófilos e neutrófilos CD69+ através da citometria de fluxo, além disso, foram analisadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, TNF- α e IFN- γ por meio de kits comerciais. Em conjunto com a obtenção das amostras foram realizados levantamentos de dados sócio-econômicos. O resultado da sorologia pelo Elisa identificou 8 amostras soropositivas; no entanto, apenas 4 foram confirmadas pela imunofluorescência indireta. Com isso, observou-se que apenas 2.6% dos indivíduos estavam infectados com o *Trypanosoma cruzi*. Os resultados não mostraram nenhuma relação entre os dados de citocinas, imunofenotipagem e a sorologia, exceto uma clara associação entre soropositividade e elevados níveis de IL-12. Embora nossos dados não apresentem nenhum padrão imunológico relacionado à doença de Chagas, os resultados epidemiológicos permitem-nos caracterizar a doença na região de Barcelos (Médio Rio Negro) como: alta prevalência de infecção nos homens com faixa etária acima de 60 anos e com atividades laborais relacionadas ao extrativismo da piaçava.

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

ABSTRACT

To date, the Barcelos region has been drawing attention due to its expressive number of cases of Chagas' disease; however, the problem has been neglected by government agency public health. The aim of this study was to investigate the relationship between epidemiology and immune responses in autochthonous case for Chagas' disease from Barcelos municipality. 154 samples of venous blood were collected from autochthones residents of Barcelos, State of Amazonas. The serology was performed by ELISA and confirmed through indirect immunofluorescence methods for Chagas disease. The samples were analyzed for the lymphocytes, CD 69+ lymphocytes, CD3CD4+ lymphocytes, CD3CD8+ lymphocytes, monocytes, CD69+ monocytes, neutrophils, CD 69+ neutrophils by flow cytometry and IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, TNF- α , IFN- γ cytokines were performed by use of commercial kit. In addition, were recorded data on status socio-economics from these residents. The serology results showed 8 positive samples, however, only 4 samples were positive to indirect immunofluorescence methods for Chagas disease, which means that 2,6% of the individuals tested were infected with *T.cruzi*. There are no relationship between cytokines and serology, except a clear association between serology and high levels of IL-12. 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 with the ages of 60 and higher, and who are related to the piaçava's extractivism.

Keywords: 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. MATERIAL E MÉTODOS	7
4.1 Estimativa do universo amostral	7
4.2 Coleta e armazenamento das amostras	7
4.3 Sorologia para detecção do anticorpo anti <i>T.cruzi</i>	9
4.4 Sorologia confirmatória por Imunofluorescência Indireta	10
4.5 Análises das citocinas	11
4.6 Imunofenotipagem das Células por Citometria de Fluxo	12
4.7 Análises das citocinas por citometria de fluxo (<i>Cytometric Bead Array</i> - CBA)	13
4.8 Análises dos dados	13
5. RESULTADOS	14
5.1 Dados epidemiológicos	14
5.2 Citocinas sorológicas	16
5.3 Citometria de fluxo	17
5.3.1 Linfócitos	17
5.3.2 Monócitos	18
5.3.3 Neutrófilos	19
5.4 Estudo de citocinas por CBA	20
5.5 Epidemiologia e Imunologia	20
6. DISCUSSÃO	22
7. CONCLUSÕES	26
8. RECOMENDAÇÕES	27
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das amostras soropositivas para doença de Chagas pela IFI em função da faixa etária dos voluntários.	15
Tabela 2. Proporção e número de indivíduos soropositivos para doença de Chagas pela IFI relacionados à atividade extrativista da piaçaba.	15
Tabela 3. Relação entre número de indivíduos soropositivos para doença de Chagas pela IFI que relataram terem sido picados pelo barbeiro.	15
Tabela 4. Média±desvio padrão das IL-6 e IL-12 dos indivíduos soropositivos e soronegativos para o teste de IFI para doença de Chagas na região de Barcelos.	16
Tabela 5. Média±desvio padrão da proporção de linfócitos, linfócitos CD69+, linfócitos CD3CD4+ e linfócitos CD3CD8+ entre as amostras soropositivas e soronegativas para o teste de imunofluorescência indireta (IFI).	18
Tabela 6. Média±desvio padrão do percentual de monócitos, monócitos CD69+, neutrófilos e neutrófilos entre as amostras soropositivas e soronegativas.	19
Tabela 7. Média±desvio padrão das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 (pg/dL) entre as amostras soropositivas e soronegativas para o teste de IFI.	20
Tabela 8. Média±desvio padrão de TNF- α e IFN- γ (pg/dL) entre as amostras soropositivas e soronegativas para o teste de IFI.	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização do município de Barcelos-AM, no Médio Rio Negro.	8
Figura 2. Abordagem aos moradores de Barcelos.	8
Figura 3. Hospital Geral de Barcelos onde as amostras foram centrifugadas.	9
Figura 4. Distribuição da concentração de citocinas Il-6 (a) e IL-12 (b) nas amostras coletadas de 154 residentes da cidade de Barcelos, AM.	16
Figura 5. Ocorrência dos subtipos de linfócitos nas amostras coletadas de 154 residentes da cidade de Barcelos, AM.	17
Figura 6. Ocorrência da proporção de monócitos e monócitos CD69+ nas amostras coletadas de 154 residentes da cidade de Barcelos, AM.	18
Figura 7. Ocorrência da proporção de neutrófilos e neutrófilos CD69+ nas amostras coletadas de 154 residentes da cidade de Barcelos, AM.	19
Figura 8. Análise de redundância 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 de IFI) foram significativamente ($p < 0,05$) relacionados à idade mais avançada e à atividade laboral de extração de piaçava na região do Médio Rio Negro.	21
Figura 9. Desembarque da piaçava no porto de Barcelos.	21

LEGENDAS

CBA – *Cytometric BeadsArray*

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* .

IFI – Imunofluorescência Indireta.

IFN- γ - Interferon gama

IL-2 - Interleucina-2.

IL-4 - Interleucina-4.

IL-6 - Interleucina-6.

IL-10 - Interleucina-10.

IL-12 - Interleucina-12.

IL-17 - Interleucina-17.

LCD3CD4+ - Linfócito CD3CD4+

LCD3CD8+ - Linfócito CD3CD8+

LCD69+ - Linfócito CD69+

RDA - Análise de Redundância.

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

APRESENTAÇÃO

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, CNPq-Edital Universal 14/2011 (Processo #484374/2011-7) coordenado pelo Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan e pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas – PIBIC/UFAM de 2010-2011 e PIBIC/UFAM de 2011-2012.

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, 2007).

O *Trypanosoma 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 nos sistemas nervosos autônomos cardíaco e gastrointestinal (PEDROSO e OLIVEIRA 2007).

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, clinicamente estão 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

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). 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* (piaçaba).

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 resposta imunológica do indivíduo infectado muda conforme a doença progride da fase aguda para a crônica estando relacionada a grandes mudanças na produção de citocinas (MORATO et al. 1998). IL-2, INF- γ e TNF- α provavelmente

contribuem para o controle do crescimento parasitário através da ativação do sistema fagocítico celular e inflamatório, por outro lado, os danos mecânicos relacionados à presença do parasita estão relacionados à produção de citocinas pró-inflamatórias no próprio miocárdio (WARD et al. 1999).

A ativação dos macrófagos representa um evento relevante da imunidade inata na resistência à 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). O IFN- γ induzido pelo parasita e os produtos dos parasitas são os principais responsáveis pelo recrutamento de citocinas e inflamação tecidual durante infecção pelo *T. cruzi* (BARBOSA, 2008).

Na região Amazônica, o município de Barcelos é uma área de extrativismo da piaçava, assim como produção e o consumo de açaí; ambas as atividades relacionadas com surtos da doença de Chagas. 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 açáí.

Os objetivos específicos foram:

- a) Identificar indivíduos soropositivos pelo método *ELISA* e a confirmatória por imunofluorescência indireta (IFI);
- b) Descrever um quadro epidemiológico da situação atual no município de Barcelos-AM.
- c) Quantificar os linfócitos, linfócitos CD69+, linfócitos CD3CD4+, linfócitos CD3CD8+, monócitos, monócitos CD69+, neutrófilos e neutrófilos CD69+ no plasma por meio da citometria de fluxo;
- d) Realizar a dosagem de citocinas IL-6 e IL-12 pelo método de *ELISA*;
- e) Realizar o estudo das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* – CBA) das amostras soropositivas confirmadas pela IFI e em 12 soronegativas;
- f) 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 de Imunofluorescência indireta para doença de Chagas em Barcelos-AM **não** possuem um perfil epidemiológico característico;

Hipótese alternativa (H_a):

- Os resultados de sorologia para o teste de Imunofluorescência indireta para 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 de Imunofluorescência indireta para doença de Chagas em Barcelos-AM combinado com os estudos de citocinas e citometria de fluxo **não possuem** um perfil imunológico específico;

Hipótese alternativa (H_a):

- Os resultados de sorologia para o teste de Imunofluorescência indireta para doença de Chagas em Barcelos-AM combinado com os estudos de citocinas e citometria de fluxo **possuem** um perfil imunológico específico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estimativa do universo amostral

O número de amostras do estudo foi encontrado utilizando-se a fórmula do tamanho da amostra:
$$\frac{NZ^2 \cdot P(1-P)}{D^2 \cdot (N-1) + Z^2 \cdot P(1-P)}$$

Onde, N= tamanho da população do estudo (886, baseando-se nos trabalhos de COURA et. al. 2002)

P= prevalência = 0,105

D= erro amostral

Z= 1,96.

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

Apesar da necessidade de 186 amostras, neste estudo obtivemos apenas 154 amostras. É importante relatar a extrema dificuldade para se obter o consentimento assinado no termo de consentimento livremente esclarecido (TCLE) dos moradores daquele município. O município de Barcelos localiza-se a 450 km em linha reta de Manaus (Fig. 1). O deslocamento de Manaus à Barcelos foi realizado por via fluvial em embarcações regionais conhecidos como “recreios”. Nos períodos de seca dos rios, a população desse município fica isolada. O transporte aéreo também é limitado para a região. Apesar de todas as adversidades, esse trabalho obteve 83% da suficiência amostral necessária, conforme equação supracitada.

4.2 Coleta e armazenamento das amostras

Como critério de exclusão, nesse estudo foi considerado apenas os moradores residentes há mais de 5 anos na cidade de Barcelos ou comunidades vizinhas. No município de Barcelos foram realizadas visitas em 154 residências em total de seis bairros desse município (Fig. 2). Em cada residência foi aplicado um questionário por residência. Após o TCLE, o formulário foi aplicado ao residente que apresentou maior

fator de risco para exposição da doença de Chagas. Desse indivíduo foi feita a coleta de 10 mL de sangue por punção venosa periférica.

As amostras foram armazenadas em baixa temperatura e enviadas por transporte aéreo para Manaus onde foram imediatamente analisadas e/ou armazenadas em -80°C .

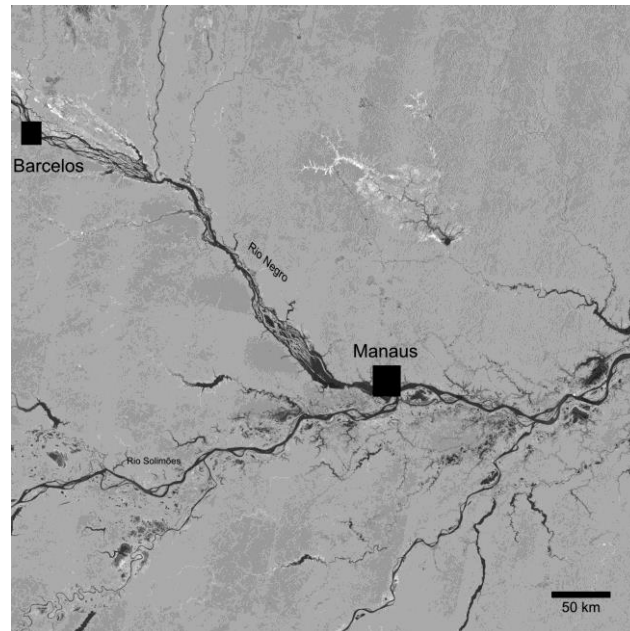


Figura 1. Localização do município de Barcelos-AM, no Médio Rio Negro.



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 *Trypanosoma cruzi*

O método utilizado para a sorologia foi o *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) para a identificação 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.

Inicialmente, as amostras foram descongeladas. Em cada poço adicionou-se 200 μL de diluente da amostra, em seguida adicionou-se 20 μL de cada amostra ou do controle. As amostras foram incubadas 30 minutos a 37 °C. Após isso, adicionou-se 350 μL de solução de lavagem diluída e descartada em seguida. O processo foi repetido 4 vezes. Em seguida, adicionou-se 100 μL de conjugado a cada poço e o mesmo foi incubado por 30 minutos a 37 °C. Após a incubação, a microplaca foi lavada 4 vezes.

Com isso, adicionou-se 100 µL de substrato a cada poço e incubou-se a microplaca no escuro durante 30 minutos a temperatura ambiente e a reação foi interrompida. A leitura foi realizada em 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 foi considerada positiva quando a absorbância era maior que o valor *cutoff*.

4.4 Sorologia confirmatória por Imunofluorescência Indireta (IFI)

O Método utilizado para a sorologia confirmatória foi a imunofluorescência indireta (IFI), tendo como princípio a ligação de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* presentes no soro ao antígeno fixado na lâmina os quais são revelados por uma anti- γ -globulina marcada com isotiocianato de fluoresceína. O kit utilizado foi o Imuno-CON CHAGAS® da WAMA Diagnóstica, São Carlos – SP - Brasil.

Inicialmente, o plasma foi inativado durante 30 minutos à 56°C. Após isso, diluído a 1/40. As lâminas foram mantidas à temperatura ambiente por 15 minutos na câmara úmida. Após a adição dos controles positivos, negativos e plasma desconhecidos as amostras foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após isso, as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão salino (PBS) durante 5 minutos cada. Adicionou-se a anti- γ -globulina marcada com isotiocianato de fluoresceína e incubou-se por 30 minutos no escuro. Novamente, as amostras foram lavadas 3 vezes em PBS durante 5 minutos cada. Após isso, adicionou-se glicerina tamponada nas áreas reativas. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência e a interpretação da leitura foi feita em relação a ausência ou presença de fluorescência amarelo-esverdeada, sendo a

ausência da mesma indicativo de negatividade e a presença indicativo de positividade da amostra.

4.5 Análises das 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 inflamatórias IL-6 e a do padrão Th1 IL-12. 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 4°C.

Brevemente, foram adicionados 200 µL de diluente de ensaio em cada poço mantido à temperatura ambiente por uma hora. A placa foi lavada em lavadora automática ELISA Atlantis Microplate Washer (Asy HITECH, Eugendorf, Áustria) por 3 vezes com 300µL de tampão de lavagem. Foi pipetado 100µL de cada padrão, amostras e controle nos poços. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas e seguida 5 lavagens. Em cada poço foi adicionado 100 µL de anticorpo marcado com estreptoavidina e

enzima HRP (Dako, Carpinteira, CA, USA). Foi realizada nova incubação à temperatura ambiente por uma hora seguida de 7 lavagens com 300µL de tampão de lavagem. Em seguida foi adicionado 100µL de solução de substrato (TMB) (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) em cada poço e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Adicionou-se 50µL de solução bloqueio de reação (ácido sulfúrico 2N). As leituras das placas foram realizadas em leitor ELISA marca ASYS EXPERT PLUS em 450nm.

4.6 Imunofenotipagem das Células por Citometria de Fluxo

Para a citometria de fluxo foi utilizado 50 µL de sangue. As amostras foi incubada com anticorpos monoclonais por 20 minutos à temperatura ambiente. 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 e centrifugadas por 7 minutos, a 1300 rpm. Posteriormente, adicionou-se 300 µL de PBS e 1% de formaldeído nos sedimentos. 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*.

4.7 Análises das citocinas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* - CBA)

As dosagens de citocinas no soro das amostras soropositivas e do grupo controle foram realizadas pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA) utilizando-se o kit Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α) (BD, Pharmingen, CA, USA). Em resumo, o soro e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microsferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, foi acrescentado 1ml da solução de lavagem e centrifugado a 10 minutos por 1100 rpm. O sobrenadante foi desprezado e com 300 μ L da solução de lavagem, as amostras foram ressuspendidas e inseridas no citômetro de fluxo BD FACS CALIBUR (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados foram gerados utilizando-se o software BD CBA Analysis.

4.8. 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).

Inicialmente, uma prévia análise sorológica realizada pelo método *ELISA* observou-se 11 indivíduos soropositivos. O processo foi repetido e foram observados apenas 8 amostras soropositivas. O teste pelo método de imunofluorescência indireta (IFI) confirmou apenas 4 das 8 consideradas soropositivas pelo método *ELISA*. Portanto, percebe-se que apenas 2,6% das amostras foram soropositivas para doença de Chaga. Quanto à distribuição da faixa etária, a mais acometida foi a > 60 anos com 6,67% dos indivíduos soropositivos.

Tabela 1. Distribuição das amostras soropositivas para doença de Chagas pela IFI em função da faixa etária dos voluntários.

Idade	N	%	IFI	%
1 a 10	10	6,49	0	0,00
11 a 20	28	18,18	1	3,57
21 a 30	36	23,38	0	0,00
31 a 40	23	14,94	0	0,00
41 a 50	24	15,58	1	4,17
51 a 60	18	11,69	1	5,56
> 60	15	9,74	1	6,67
Total	154	100,00	4	2,60

Em relação à profissão, percebe-se uma alta proporção dos indivíduos que trabalham com extração de piaçava e a doença de Chagas, sendo que 17,65% desses indivíduos foram soropositivos (tabela 2). A relação entre o conhecimento de ter sido picado pelo barbeiro e a soropositividade foi alta, com 7,31% desses indivíduos soropositivos (tabela 3).

Tabela 2. Proporção e número de indivíduos soropositivos para doença de Chagas pela IFI relacionados à atividade extrativista da piaçaba.

Profissão	N	Soropositivos	%
Extração da Piaçava	17	3	17,65
Outros	137	1	0,73

Tabela 3. Relação entre número de indivíduos soropositivos para doença de Chagas pela IFI que relataram terem sido picados pelo barbeiro.

Picada	N	Soropositivos	%
Sim	41	3	7,31
Não	113	1	0,88
Total	154	4	

5.2. Citocinas sorológicas

Os valores para as citocinas IL-6 (Fig. 4a) e IL-12 (Fig. 4b) 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 a IFI (tabela 4), estas variações não foram estatisticamente significativas (teste U de Mann-Whitney, $p > 0,05$).

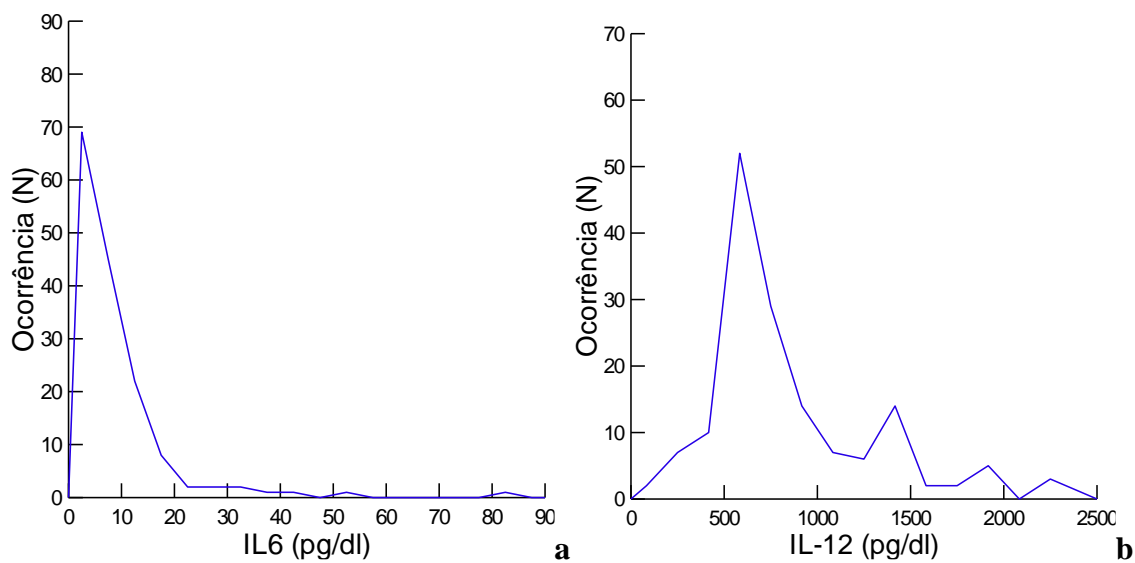


Figura 4. Distribuição da concentração de citocinas IL-6 (a) e IL-12 (b) nas amostras coletadas de 154 residentes da cidade de Barcelos, AM.

Tabela 4. Média±desvio padrão das IL-6 e IL-12 dos indivíduos soropositivos e soronegativos para o teste de IFI para doença de Chagas na região de Barcelos.

SOROLOGIA	IL-6 (pg/dl)	IL-12 (pg/dl)
Soropositivos	7,02±8,53	1061,2±644,10
Soronegativos	7,78±10,25	851,37±456,83

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 5. Não houve diferenças significativas entre os grupos considerados soropositivos e soronegativos para nenhum dos subtipos de linfócitos estudados (tabela 5).

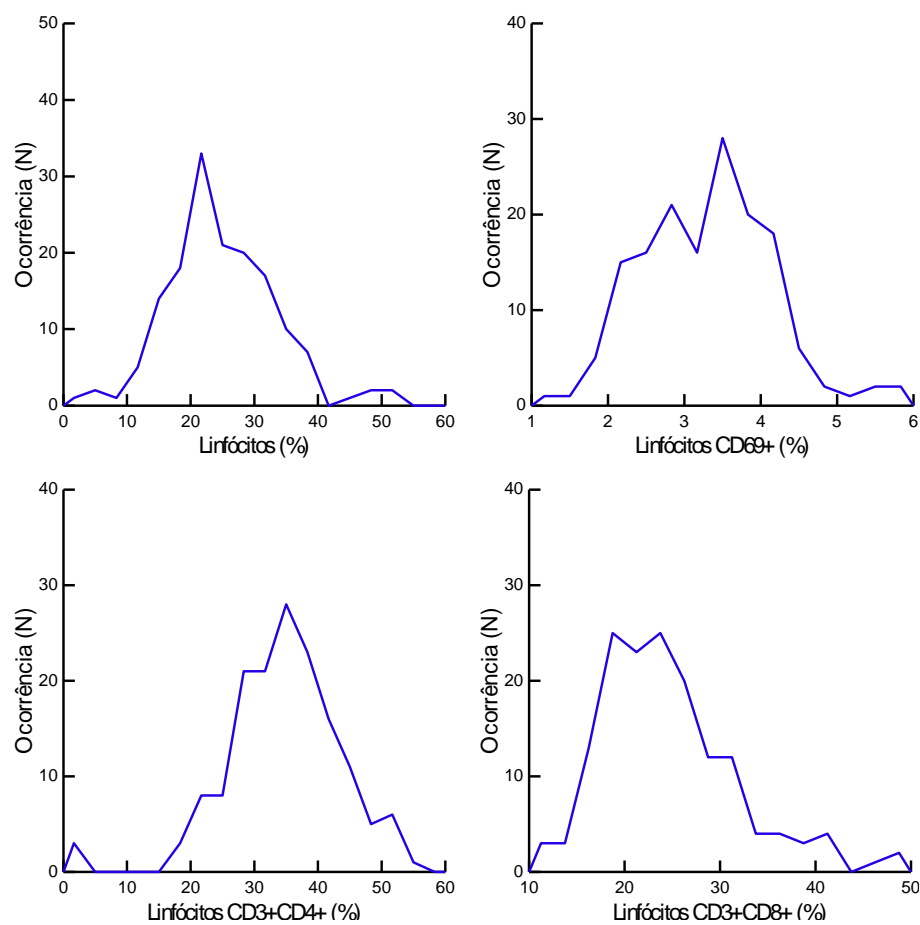


Figura 5. Ocorrência dos subtipos de linfócitos nas amostras coletadas de 154 residentes da cidade de Barcelos, AM.

Tabela 5. Média±desvio padrão da proporção de linfócitos, linfócitos CD69+, linfócitos CD3CD4+ e linfócitos CD3CD8+ entre as amostras soropositivas e soronegativas para o teste de imunofluorescência indireta (IFI).

SOROLOGIA	Linfócitos	LinCD69+	LCD3CD4+	LCD3CD8+
Soropositivos	29,6±6,7	3,4±1,0	31,4±5,7	24,6±3,1
Soronegativos	24,9±8,1	3,2±0,8	34,5±9,1	24,6±7,2

5.3.2 Monócitos

O histograma de frequência para mostrar a distribuição dos dados de citometria de fluxo para os monócitos e monócitos CD69+ está na Fig. 6. A média entre os valores destes tipos celulares não apresentou diferença significativa entre os grupos considerados soropositivos e soronegativos para o teste de imunofluorescência indireta (IFI) para a doença de Chagas (tabela 6).

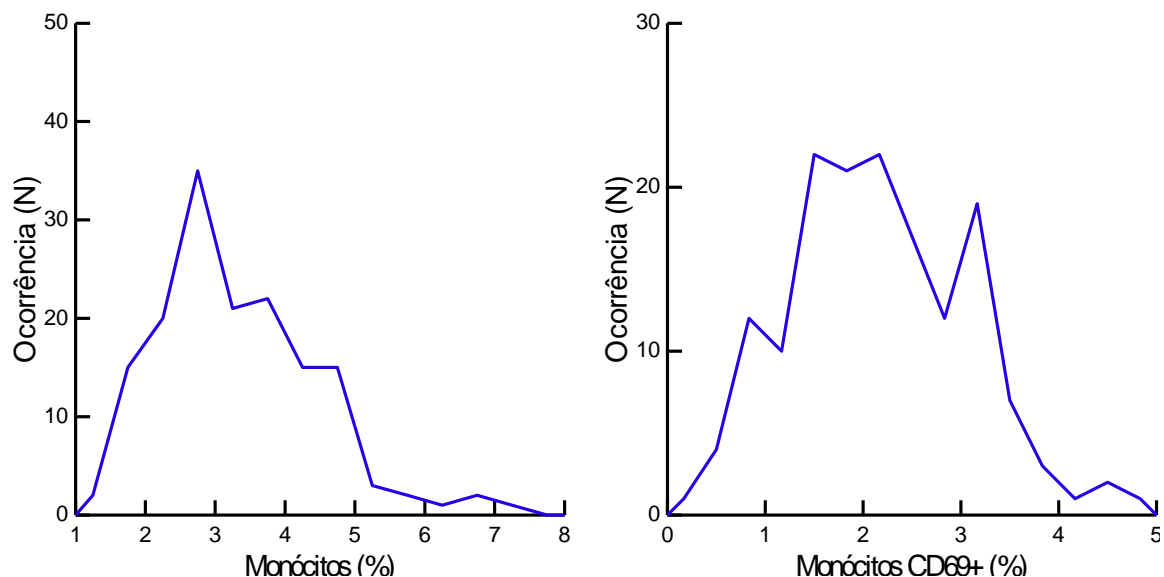


Figura 6. Ocorrência da proporção de monócitos e monócitos CD69+ nas amostras coletadas de 154 residentes da cidade de Barcelos, AM.

5.3.3 Neutrófilos

A frequência de ocorrência da citometria de fluxo para os neutrófilos e neutrófilos CD69+ estão apresentados na figura 7. A análise estatística demonstra que não houve diferença significativa entre os valores médios de neutrófilos de acordo com os dados de sorologia (tabela 7).

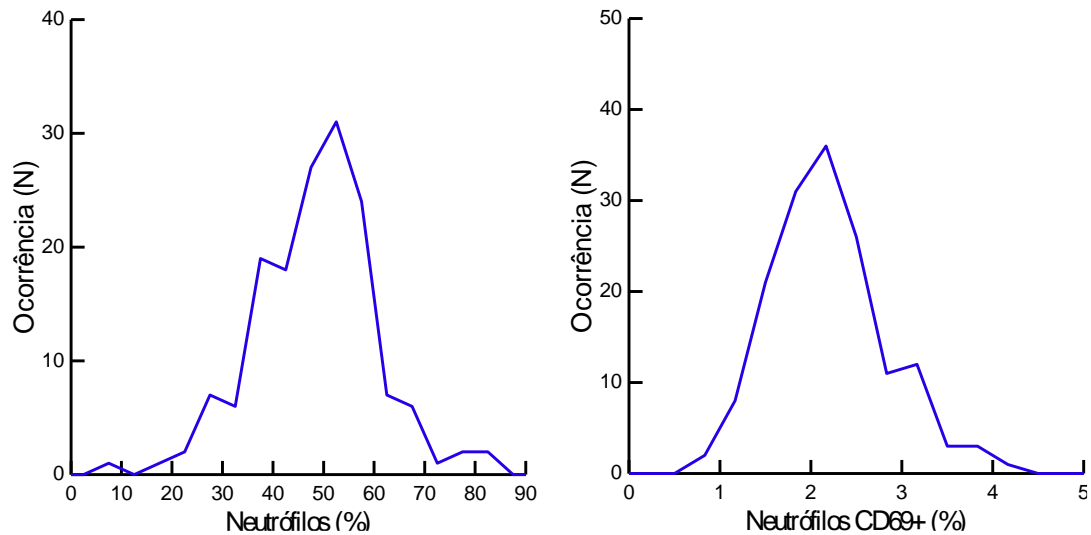


Figura 7. Ocorrência da proporção de neutrófilos e neutrófilos CD69+ nas amostras coletadas de 154 residentes da cidade de Barcelos, AM.

Tabela 6. Média±desvio padrão do percentual de monócitos, monócitos CD69+, neutrófilos e neutrófilos entre as amostras soropositivas e soronegativas.

SOROLOGIA	Monócitos	MonCD69+	Neutrófilos	NeuCD69+
Soropositivos	3,8±0,6	1,7±0,9	39,1±5,75	2,2±0,5
Soronegativos	3,2±1,2	2,1±0,9	48,6±12,0	2,1±0,6

5.4. Estudo de citocinas por *Cytometric Bead Array* - CBA

Os valores para todas as citocinas analisadas (tabelas 7 e 8) não foram estatisticamente significativas (teste U de Mann-Whitney, $p > 0,05$) entre os indivíduos considerados soropositivos e soronegativos.

Tabela 7. Média±desvio padrão das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 (pg/dL) entre as amostras soropositivas e soronegativas para o teste de IFI.

SOROLOGIA	IL-2	IL-4	IL-10	IL-17
Soropositivos	222,12±22,44	142,04±23,51	90,08±7,56	105,81±14,86
Soronegativos	221,20±21,98	147,06±20,35	108,89±41,27	106,91±21,43

Tabela 8. Média±desvio padrão de TNF- α e IFN- γ (pg/dL) entre as amostras soropositivas e soronegativas para o teste de IFI.

SOROLOGIA	TNF- α	IFN- γ
Soropositivos	117,25±18,91	73,88±14,10
Soronegativos	253,32±126,50	79,08±16,50

5.5 Epidemiologia e imunologia

As análises de redundância (RDA) foram realizadas com os dados de epidemiologia e imunologia. O RDA mostrou uma relação proporcional entre os dados epidemiológicos e os dados de sorologia (Fig. 8). Pode-se observar uma relação direta entre a soropositividade do teste de IFI e a idade (teste de simulação de Monte Carlo, $p < 0,05$), sendo que a maior parte dos soropositivos foram os indivíduos mais velhos. Indivíduos que trabalham com a extração da piaçava (Fig. 9) foram significativamente associados com os dados de soropositividade para a doença de Chagas do que os de

outras profissões. Valores mais altos da IFI também foram relacionados com elevados níveis de interleucina 12.

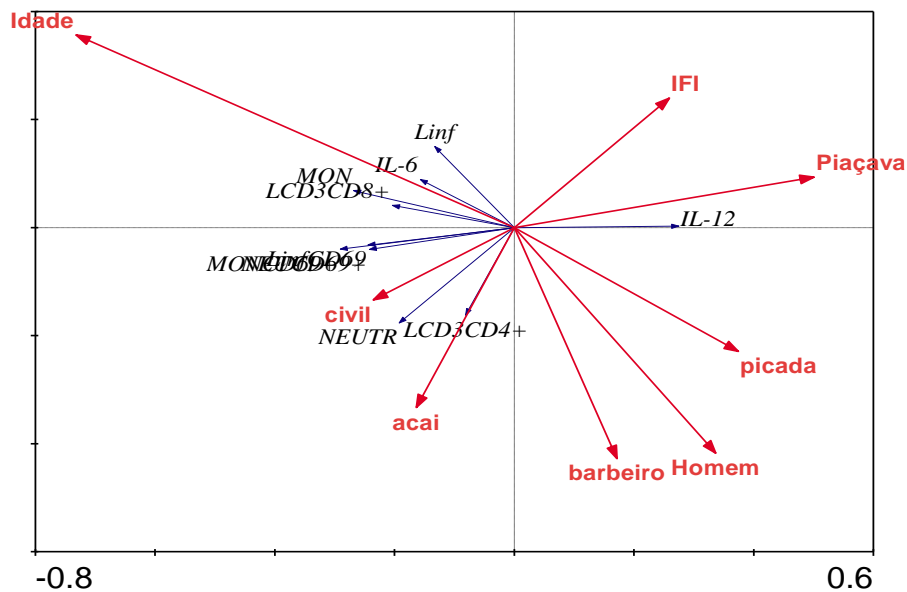


Figura 8. Análise de redundância relacionando os dados de epidemiologia, sorologia e imunologia de todas as amostras coletadas no município de Barcelos. Foi demonstrado pelo teste de simulação de Monte Carlo que os dados de sorologia (incluindo as amostras soropositivas para o teste de IFI) foram significativamente ($p < 0,05$) relacionados à idade mais avançada e à atividade laboral de extração de piaçava na região do Médio Rio Negro.



Figura 9. Desembarque da piaçava 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).

Em nossos resultados epidemiológicos realizados na região de Barcelos no Médio Rio Negro (Estado do Amazonas), Análises multivariadas (análise de redundância seguida de simulações de Monte Carlo) reforçam a associação entre a aquisição da infecção chagásica e a atividade laboral de extrativismo da piaçava com 17.65% 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 4 indivíduos soropositivos, 3 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 maior que 60 anos, com 6,67% 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. Cerca de 70% dos indivíduos que dizem terem sido picados pelo barbeiro foram soropositivos e somente cerca de 1% dos indivíduos que disseram não terem sido picados pelo barbeiro estavam infectados, 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* observou-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). O diagnóstico definitivo foi realizado utilizando-se imunofluorescência indireta, com recomendado pelo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2005).

Tem-se demonstrado que as citocinas inflamatórias são essenciais durante a fase aguda da infecção e são produzidas na fase crônica, possivelmente pela exposição crônica ao parasita da doença de Chagas. 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. Ainda que os valores de IL-12 entre indivíduos soropositivos e soronegativos sejam semelhantes, as análises multivariadas demonstram uma clara associação entre indivíduos soropositivos e valores elevados de IL-2 nos indivíduos residentes na cidade de Barcelos. Segundo Barbosa (2008), durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, a produção de IFN- γ e TNF- α é induzida pela IL-12, levando a uma resposta imune protetora mediada por células.

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 importantes 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. Em nosso estudo foram observados 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.

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 à alta expressão de TNF- α , e os da forma indeterminada são moduladores com alta expressão de IL-10 e IL-4 (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.

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.

7. CONCLUSÕES

- 1 – A doença de Chagas no município de Barcelos-AM está associada ao extrativismo da piaçava e, principalmente em homens com faixa etária maior que 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;
- 7 – As análises multivariadas mostrou uma associação entre elevados níveis de IL-12 e os indivíduos soropositivos.

8. RECOMENDAÇÕES

De acordo com o perfil epidemiológico descrito da doença de Chagas descrito nesse estudo sugerem-se a necessidade aumentar o esforço de pesquisa nessa área nos trabalhadores dos piaçabais da região do Médio Rio Negro. Além disso, recomenda-se um monitoramento para essa endemia tanto na região de Barcelos, quanto nas demais localidades amazônicas com surtos de doenças de Chagas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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: 10/02/2012.

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.

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&lng=en acesso: 22/02/2012.

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&lng=en acesso: 25/02/2012.

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.

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&lng=en acesso: 15/02/2012.

- 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.
- 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 *Trypanosoma 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: 24/02/2012.
- 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: 03/03/2012.
- 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:25/02/2012.
- 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: 03/03/2012.

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: 12/01/2012.