

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR

ELIDIANA DE BONA

**ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA APLICADA A DADOS DE ESPECTROMETRIA
DE MASSAS EM AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS
CRÔNICOS**

CURITIBA

2016

ELIDIANA DE BONA

**ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA APLICADA A DADOS DE ESPECTROMETRIA
DE MASSAS EM AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS
CRÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Iara J.T. Messias Reason
Co-Orientadora: Dra. Luiza Helena Gremski

CURITIBA

2016

De Bona, Elidiana

Análise quimiométrica aplicada a dados de espectrometria de massas em amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos / Elidiana De Bona - Curitiba, 2015.

95 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Iara José de Taborda Messias Reason

Coorientadora: Professora Dra. Luiza Helena Gremski

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Chagas, Doença de. 2. Quimiometria. 3. Biomarcadores. 4. Espectrometria de massas.

I. Reason, Iara José de Taborda Messias. II. Gremski, Luiza Helena. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.9363

TERMO DE APROVAÇÃO

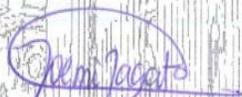
ELIDIANA DE BONA

Título: **"Análise quimiométrica aplicada a dados de espectrometria de massas em amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



Prof^a. Dra. Iara José de Messias Reason
Orientadora



Prof^a. Dra. Noemi Nagata
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 26 de fevereiro de 2016.

Dedico esta dissertação para aqueles, em especial aos meus pais, irmãs e sobrinha, que estiveram ao meu lado antes e depois de um turbulento, mas gratificante processo de metamorfose.... Somos os resultados das viagens que fazemos, dos livros que lemos das pessoas que amamos e somos a soma das experiências que vivemos...

AGRADECIMENTOS

*A **Deus**, por ter me dado o privilégio de ter os melhores pais do mundo e de ter me dado dois anjos sem asas que eu chamo de irmãs. Agradeço a presença e orientação em todas as vezes que precisei de um norte.*

*Aos meus pais **Sandra De Bona e Ivanir De Bona**, pela confiança, carinho e dedicação que têm pelos filhos, pelo trabalho e pela família. Obrigada por me mostrarem o significado da união, lealdade e honra. Amo-os incondicionalmente.*

*As minhas irmãs **Maiéle De Bona e Fabíola De Bona**, meus anjos sem asas. Minhas amigas nas horas mais difíceis e mais felizes. Amo-as incondicionalmente.*

*A minha sobrinha **Alice**, por me proporcionar o sorriso mais verdadeiro e sincero que já vi. Pela alegria contagiante que nos concede diariamente em nossas vidas. Amo-te, presente do céu.*

*A minha orientadora, **Dra Iara J. T. Messias Reason**, profissional e ser humano ímpar. Obrigada pelo apoio e confiança depositados e por ter me dado a oportunidade de amadurecimento profissional e pessoal. Obrigada pela honra de ter convivido com sua alegria, motivação e humildade. Que Deus ilumine sempre o seu caminho.*

*A **Dra Luiza Helena Gremski**, minha co-orientadora. Aprender e conviver contigo foi um presente inculcável. Obrigada pelo apoio em todas as horas, por ter me guiado durante toda execução do mestrado e pela paciência que teve em me ensinar. Obrigada pelas palavras de confiança e pelos puxões de orelha quando foram necessários. Obrigada por ser o ser humano íntegro, humilde, respeitoso, honesto e verdadeiro com quem tive o privilégio de conviver e aprender. Meu muito obrigada.*

*A **Dra Shirley** ao **Dr Renato** e ao **Valmir** pelo auxílio com os experimentos e conhecimentos acerca dos autoanticorpos e microscopia e pela oportunidade de convívio com pessoas tão queridas. Muito obrigada.*

Ao **Dr Silvio Veiga Sanches** por ter concedido a infraestrutura do seu laboratório para que eu pudesse realizar parte dos experimentos. Muito obrigada.

A **Dra Francinete Campos** pelo auxílio com os experimentos de espectrometria de massas, pelo convívio quase diário e pela parceria. Muito obrigada.

Aos professores, colegas e amigos **Luís Flávio Oliveira Souza, Alexandre Meneghello Fuentesfria, Maria Teresa Granella Lang, Mauro Antônio Dall Agnol, Ilo Odilon Villa Dias, Valéria Mokfa, Karyn Marcon Mantelli, Izabela Pereira, Marilice Ferro**, que durante toda graduação estiveram ao meu lado sempre, me incentivando, auxiliando, escutando confidências. A todos vocês que se tornaram amigos e colegas, jamais esquecerei todo o apoio e carinho.

Aos colegas e amigos da “GAVG (Grupo de apoio aos viciados em gominha) ” **Tatiana Zuccolotto, Allan Lourenço, Letícia Bonancio Cerqueira e Estevan Bruginski** pela parceria incondicional fosse para trabalhar, coletar *Bacharis*, jogar *Munchkin*, andar de patins, comer uma pizza ou qualquer outro programa improvisado que acabava sempre em muita risada. Meu muito obrigada por terem feito essa jornada mais leve e alegre.

Em especial meu muito obrigada ao **Estevan Bruginski** pelo ser humano incrível a quem posso chamar de amigo. Com toda certeza minha morada em Curitiba tornou-se mais alegre e feliz com sua presença. Obrigada por estar sempre por perto em qualquer situação. Obrigada pela parceria dentro e fora da Universidade. Sua amizade sem dúvidas foi um presente que Curitiba me deu. Meu carinho eterno.

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Matriz Extracelular, **Gabriel Meissner, Adriano Morgon, Fernando Matsubara, Thiago de Mari, Hanna Camara da Justa, Vanessa Ribeiro Heidemann, Marianna Boia, Bruno, Larissa Vuitika, Dilza Trevisan Silva**, pela paciência em me ensinar os experimentos e pelas parcerias ao longo desse período. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento profissional.

Obrigada em especial à **Aline Viana Bednaski** que além de me auxiliar em quase todas as tentativas experimentais tornou-se essa pessoinha por quem tenho tanto carinho. Espero que nossos laços de amizade se estreitem cada vez mais.

A **Karita Lidani, Fabiana Andrade, Sandra Catarino** meu muito obrigada por todo apoio. **Karita** obrigada por me auxiliar com os inúmeros conhecimentos que me passou e por todo auxílio estatístico. **Fabiana e Sandra** sou muito grata a vocês por todo auxílio técnico e de apoio que me proporcionaram. Meninas, obrigada pelos inúmeros almoços divertidos na companhia de vocês. Espero podermos estreitar os laços por mais tempo.

As colegas e amigas do Laboratório de Imunopatologia molecular, **Vanessa Picceli, Juliana Zimmerman, Fernanda Bovo, Thaisa Sandri, Regina, Angélica Boldt, Pamela Fontana** obrigada por toda ajuda e amizade.

Às amigas que mesmo de longe sempre torceram por mim. Obrigada **Bárbara, Fabíola, Liana, Sandra, Sabrina, Carolines**. Adoro vocês garotas.

Obrigada aos meus amigos amores **Luiz Dorini e Magali Bissani** por sempre confiarem e acreditarem em mim. Amigos são a família que escolhemos e sou muito grata por terem me escolhido. Amo vocês.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas da UFPR** por ter me concedido a oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A Doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanossoma cruzi*, consta na lista das 17 doenças tropicais negligenciadas, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, e afeta aproximadamente 7 milhões de pessoas somente na América Latina. A maioria dos indivíduos infectados permanece na forma assintomática ou indeterminada por toda vida, porém, parte significativa deles evolui para alguma das formas sintomáticas, apresentando danos cardíacos, digestivos e neurológicos irreversíveis. Pouco se sabe sobre os mecanismos imunológicos e patogênicos envolvidos na transição da fase aguda para a fase crônica da doença, bem como, sobre os fatores que contribuem para o desenvolvimento das diferentes formas clínicas existentes. Ainda, esforços têm sido direcionados na busca por biomarcadores sorológicos que sejam diferencialmente expressos em pacientes com as diferentes formas clínicas da DC crônica e que possam ser utilizados como marcadores de evolução clínica e prognóstico. No presente trabalho foi realizado uma busca por possíveis biomarcadores no soro de pacientes chagásicos crônicos. Na busca de biomarcadores utilizou-se duas estratégias. Em um primeiro momento, os soros dos pacientes com DC foram analisados por eletroforese bidimensional para resolução do seu conteúdo proteico. A segunda estratégia baseou-se na análise dos soros dos pacientes por espectrometria de massas. Os resultados mostraram que algumas proteínas tiveram perfil de expressão diferente entre controles saudáveis e entre os grupos de pacientes chagásicos cardíacos e assintomáticos. Os dados obtidos na espectrometria de massas foram analisados utilizando a ferramenta de Análise de Componentes Principais (PCA), sendo possível verificar uma discriminação entre os grupos controle e pacientes chagásicos, bem como, entre as diferentes formas clínicas cardíaca e indeterminada. Foram encontrados íons que podem ser relevantes na discriminação entre os subgrupos da DC.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Quimiometria. Biomarcadores.
Espectrometria de massas.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, in the list of 17 neglected tropical diseases, according to the World Health Organization, and affects approximately 7 million people in Latin America alone. Most infected individuals remain in asymptomatic or indeterminate for life, however, one significant part evolves into some of the symptomatic forms, with heart, digestive and irreversible neurological damage. Little is known about the immunological pathogenic mechanisms involved in the transition from the acute to chronic stage of the disease, as well as on the factors that contribute to the development of different existing clinical forms. Furthermore, efforts have been focused on the search for serum biomarkers that are differentially expressed in patients with different clinical forms of chronic DC and can be used as markers of clinical outcome and prognosis. In the present work was carried out a search for potential biomarkers in the serum of chronic Chagas disease. In the search for biomarkers was used two strategies. At first, serum from patients with CD were analyzed by two-dimensional electrophoresis for resolution of their protein pattern. The second strategy was based on analysis of patient serum by mass spectrometry. The results showed that some proteins have different expression profile between healthy controls and between groups of cardiac and asymptomatic chagasic patients. The data obtained in mass spectrometry were analyzed using Principal Component Analysis (PCA), and you can see a breakdown between the control group and patients with Chagas disease, as well as between the different cardiac and indeterminate clinical forms. Ions were found to be relevant in discriminating between subsets of DC.

Keywords: Chagas disease. Chemiometry. Biomarkers. Mass Spectrometry

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DO <i>TRYPANOSSOMA CRUZI</i>	23
FIGURA 2 - MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE INTERAÇÃO E RECONHECIMENTO PARASITO-HOSPEDEIRO.....	25
FIGURA 3 - PROCESSO DE INVASÃO CELULAR E DIFERENCIAÇÃO DO <i>T. CRUZI</i>	27
FIGURA 4 - IMAGEM DIGITALIZADA DO GEL SDS-PAGE BIDIMENSIONAL DO <i>POOL</i> DE SORO DOS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE	53
FIGURA 5 - IMAGEM DIGITALIZADA DO GEL SDS-PAGE BIDIMENSIONAL DO <i>POOL</i> DE SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS COM A FORMA CARDÍACA DA DOENÇA.	54
FIGURA 6 - IMAGEM DIGITALIZADA DO GEL SDS-PAGE BIDIMENSIONAL DO <i>POOL</i> DE SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS COM A FORMA INDETERMINADA DA DOENÇA.	55
FIGURA 7 - ESPECTRO DE MASSAS ADQUIRIDO DE AMOSTRA DO GRUPO CONTROLE.....	58
FIGURA 8 - ESPECTRO DE MASSAS ADQUIRIDO DE AMOSTRA DO GRUPO CHAGÁSICO CARDÍACO.....	58
FIGURA 9 - ESPECTRO DE MASSAS ADQUIRIDO DE AMOSTRA DO GRUPO CHAGÁSICO INDETERMINADO.	58
FIGURA 10 - GRÁFICOS DE <i>LOADINGS</i> DE CP1 E CP2	66
FIGURA 11 - ESPECTROS DE MASSAS REPRESENTATIVOS DE CADA GRUPO DE AMOSTRAS.	67
FIGURA 12 - GRÁFICOS DE <i>LOADINGS</i> DE CP1 E CP2 PARA OBSERVAR QUAIS ÍONS PODERIAM SER OS RESPONSÁVEIS PELA SEPARAÇÃO ENTRE OS PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS CARDÍACOS E INDETERMINADOS.....	69
FIGURA 13 - ESPECTRO DE MASSAS DE DUAS AMOSTRAS DO GRUPO DE PACIENTES CHAGÁSICO CRÔNICOS INDETERMINADO AMPLIADO PARA A REGIÃO DE 550 A 820 DA.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTRATÉGIAS E MECANISMOS DE SOBREVIVÊNCIA UTILIZADOS PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> PARA SOBREVIVÊNCIA NO INTERIOR DOS MACRÓFAGOS.....	28
TABELA 2 - MOLÉCULAS QUE MIMETIZAM ANTÍGENOS PRÓPRIOS DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO.	35
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DOS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE CHAGAS	44
TABELA 4 - ÍONS AUSENTES NO GRUPO DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS INDETERMINADOS E PRESENTES NOS PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS CARDÍACOS E AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE.	68
TABELA 5 - ÍONS PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NAS AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE.	68
TABELA 6 - ÍONS AUSENTES NO GRUPO DE PACIENTES CHAGÁSICOS INDETERMINADOS E PRESENTES NOS PACIENTES CHAGÁSICOS CARDÍACOS.....	70
TABELA 7 - ÍONS PRESENTES SOMENTE NOS PACIENTES DO SUBGRUPO EM VERDE DO GRÁFICO 4.	74

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - GRÁFICO DE AUTOVALORES PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS A SER UTILIZADA NA SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE E DOS PACIENTES CHAGÁSICOS.....	60
GRÁFICO 2 - SCORES DE SEPARAÇÃO ENTRE INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE (AZUL) E PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS (VERMELHO).....	62
GRÁFICO 3 - GRÁFICO DE AUTOVALORES PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS A SER UTILIZADA NA SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS.....	63
GRÁFICO 4- SCORES DE SEPARAÇÃO ENTRE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS CARDÍACOS E INDETERMINADOS.....	64
GRÁFICO 5- ANÁLISE DA "IDADE" ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS SEPARADOS NO PCA.	78
GRÁFICO 6 - DOSAGENS DE COLESTEROL TOTAL ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS SEPARADOS NO PCA.....	79
GRÁFICO 7- DOSAGENS DE TRIGLICERÍDEOS TOTAL ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS SEPARADOS NO PCA.	80
GRÁFICO 8- DOSAGENS DE COLESTEROL-HDL ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS SEPARADOS NO PCA.....	80
GRÁFICO 9- DOSAGENS DE COLESTEROL-LDL ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS SEPARADOS NO PCA.....	81
GRÁFICO 10 - PRESENÇA E AUSÊNCIA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS SEPARADOS NO PCA.	82
GRÁFICO 11 - PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DIABETES MELLITUS ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS SEPARADOS NO PCA.	83
GRÁFICO 12- FRAÇÃO DE EJEÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS SEPARADOS NO PCA.....	86
GRÁFICO 13- FREQUÊNCIA DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA ENTRE OS SUBGRUPOS SEPARADOS NO PCA.	86

LISTA DE SIGLAS

CCC – Cardiopatia Chagásica Crônica

CPs – Componentes principais

DIMS – Análise por infusão direta por espectrometria de massas

Da – Daltons

DC – Doença de Chagas

FEVE – Fator de ejeção do ventrículo esquerdo

HC/UFPR – Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

kDa – quilo Daltons

MS – Espectrometria de massas

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCA – Análise de Componentes Principais

T. cruzi – *Trypanossoma cruzi*

T. infestans – *Triatoma infestans*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1	A Doença de Chagas.....	20
3.1.1	Epidemiologia	20
3.1.2	Etiologia e transmissão.....	21
3.1.3	Morfologia, ciclo biológico e patogênese do <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
3.1.4	A doença na fase aguda	29
3.1.5	A doença na fase crônica	29
3.1.5.1	Forma crônica ideterminada ou assintomática.....	30
3.1.5.2	Formas crônicas cardíaca, digestiva e neurológica	31
3.1.6	Fisiopatogenia da Doença de Chagas crônica.....	33
3.2	Proteômica, metabolômica, quimiometria e pesquisa de biomarcadores	37
3.3	Quimiometria e Análise Multivariada	41
3.4	Biomarcadores e Doença de Chagas.....	43
4	METODOLOGIA.....	47
4.1	Amostras.....	47
4.2	Análise do perfil de proteínas.....	48
4.2.1	Quantificação das proteínas no soro.....	48
4.2.2	Eletroforese bidimensional.....	48
4.3	Análise Metabolômica.....	49
4.3.1	Depleção de proteínas de alto peso molecular	49
4.3.2	Espectrometria de massas	50
4.4	Quimiometria	50
4.5	Análise de Associação.....	51

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Análise proteômica	52
5.1.1	Eletroforese bidimensional.....	52
5.2	Metabolômica	57
5.2.1	Obtenção dos espectros de massas	57
5.2.2	Análise de Componentes Principais (PCA).....	59
5.2.2.1	Análise de SCORES.....	59
5.2.2.2	Análise de LOADINGS	65
5.2.2.3	Análise de associação de parâmetros clínicos e laboratoriais entre os subgrupos formados no PCA.	77
6	CONCLUSÕES.....	88
7	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas (DC) consta na lista das 17 doenças tropicais negligenciadas, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, sendo a América Latina considerada a área de maior prevalência, com cerca de 7 milhões de pessoas afetadas (WHO, 2012, 2015). O agente etiológico da doença é o protozoário flagelado *Trypanossoma cruzi*, veiculado por cerca de 120 espécies de insetos da subfamília Triatominae. No Brasil, a principal espécie desses insetos é o *Triatoma infestans*, popularmente designados de barbeiros, chupões, finções, chupanças, bicudos, procotós, entre outros (PEREIRA & NAVARRO, 2013).

A doença apresenta-se em duas fases, aguda e crônica. A fase aguda inicia cerca de quatro a oito semanas após a infecção sendo geralmente assintomática ou com poucos sintomas. Quando sintomática, comumente apresenta manifestações como doença febril autolimitada, mal estar, sinal de Romaña, linfadenomegalia, hepato e/ou esplenomegalia com raras alterações cardíacas ou neurológicas (PEREIRA & NAVARRO, 2013).

A maioria dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* permanecem na forma assintomática ou indeterminada durante toda a vida (GALVÃO ET AL., 2010). Apesar destes pacientes não apresentarem quaisquer sintomas clínicos, eles apresentam reações sorológicas positivas para o parasito (COURA, 2007).

As manifestações clínicas da forma crônica, no entanto, aparecem décadas após a fase aguda (MASSAD, 2008) em 15-30% dos casos, e incluem manifestações cardíacas, envolvimento gastrointestinal (CASTRO, 2009) e alterações do sistema nervoso periférico (BOSCARDIN et al., 2010; MUÑOZ-SARAVIA, HABERLAND, WALLUKAT, & SCHIMKE, 2012). A manifestação mais frequente, e também a considerada mais grave, é a cardiomiopatia chagásica, que está associada à insuficiência cardíaca, arritmias, morte súbita, e tromboembolismo periférico (CAROD-ARTAL & GASCON, 2010; PARKER & SETHI, 2011). Embora os mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da doença tenham sido extensivamente estudados, o exato processo fisiopatológico da expressão das diferentes formas clínicas da DC ainda é pouco entendido.

Nesse contexto, torna-se relevante a busca de possíveis biomarcadores de diagnóstico e/ou progressão que possam estar associados, diferentes aos aspectos da DC crônica.

Os avanços no desenvolvimento de novas técnicas para o diagnóstico, prognóstico e indicação de terapêutica adequada de doenças complexas como câncer, doenças autoimunes e parasitoses como leishmaniose e DC têm estabelecido um campo promissor na pesquisa de biomarcadores. Nesse sentido, técnicas de espectrometria de massas tornaram-se uma ferramenta indispensável para a análise de componentes presentes em amostras biológicas desde a detecção, quantificação e caracterização dessas moléculas, vindo de encontro com a necessidade de desenvolvimento de metodologias diagnósticas mais sensíveis, específicas e menos invasivas.

A busca de marcadores tanto para o diagnóstico como para prognóstico da forma crônica da DC, propicia benefícios diretamente na conduta terapêutica dos pacientes. Dessa maneira, permite que o manejo clínico seja melhor adequados necessidades específicas de cada paciente, bem como, beneficia na qualidade de vida desses indivíduos, justificando assim a realização do presente projeto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Explorar os padrões de metabólitos e proteínas na doença de Chagas crônica por meio de diferentes metodologias.

2.2 Objetivos específicos

- a. Buscar, por meio de uma análise proteômica, diferenças nos perfis proteicos de soros de indivíduos controles sem DC e de pacientes com DC crônica com as formas clínicas indeterminada e cardíaca.
- b. Verificar se a composição iônica do soro de pacientes chagásicos e de indivíduos controles apresenta diferenças capazes de discriminar, por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) esses dois grupos.
- c. Investigar se a composição iônica do soro de pacientes com a forma cardíaca da DC crônica e de pacientes com a forma indeterminada apresenta diferenças capazes de discriminar, por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) esses dois grupos.
- d. Verificar quais os possíveis íons responsáveis pelos agrupamentos e separações observadas entre os grupos de indivíduos sem DC e pacientes chagásicos crônicos com as formas cardíacas e indeterminada.
- e. Verificar possíveis associações dos resultados obtidos na PCA com diferentes aspectos clínicos e laboratoriais da DC crônica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A Doença de Chagas

3.1.1 Epidemiologia

A DC consta na lista das 17 doenças tropicais negligenciadas, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estando sua ocorrência intimamente relacionada com o desenvolvimento socioeconômico do local em que se faz presente. A América Latina é considerada a área de maior incidência, com epidemiologia, características clínicas, características dos vetores, reservatórios e hospedeiro variáveis de uma região para outra (WHO, 2003, 2012, 2015). No Brasil, estima-se que cerca de 2 a 3 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi*. Destas, 600.000 apresentam alguma manifestação clínica associada à fase crônica da doença, como o acometimento cardíaco ou complicações digestivas, levando à morte aproximadamente 5.000 indivíduos anualmente (WHO, 2003; CARLOS et al., 2008; COURA; DIAS, 2009).

Martins-Melo, *et al* (2012) apresentaram o primeiro estudo brasileiro abrangendo todo território nacional sobre a mortalidade de Chagas, com foco principal nas regiões geográficas mais afetadas, visando avaliar os índices de mortalidade da doença ao longo do tempo. Os autores constataram que a fase de maior incidência de mortalidade dá-se em indivíduos em fase crônica com uma maior ocorrência na região Norte. Desta maneira, reafirmam a necessidade de notificação compulsória das formas crônicas, quando diagnosticadas, e não apenas das formas agudas, como é atualmente preconizado. Além disso, os autores destacam a necessidade da implantação de programas de controle e interrupção da transmissão doméstica e peridoméstica por meio da contenção de vetores, reservatórios animais e programas para educação sanitária da população em risco.

A partir do ano 2000 houve um aumento no número de notificações de transmissão da DC em países não endêmicos fora da América Latina, como países da Europa e América do Norte. Tal fenômeno tem relação direta com a migração populacional com predomínio de transmissão via transfusões sanguíneas, transplante de órgãos e transmissão congênita (GUERRI-GUTTENBERG et al., 2008).

Assim, em 2007, a OMS e a Organização Pan-americana da Saúde convocaram uma reunião com países do continente americano para destacar a presença da infecção em países não endêmicos, de maneira a reconhecer a globalização da DC e a necessidade de aprimoramento no manejo da enfermidade, bem como, o reconhecimento de que se trata de um desafio para saúde pública global (WHO, 2010).

3.1.2 Etiologia e transmissão

O agente etiológico da doença, o protozoário flagelado *T. cruzi*, pode ser veiculado por cerca de 120 espécies de insetos da subfamília Triatominae. No Brasil, a principal espécie desses insetos é o *Triatoma infestans*, popularmente designados de barbeiros, chupões, finções, chupanças, bicudos, procotós, entre outras denominações (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

A capacidade de adaptação de algumas espécies, as ditas domiciliadas, ao ambiente humano infere em uma maior ligação epidemiológica com a doença humana. Dessas, o *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*, com larga distribuição no território brasileiro (estados de Alagoas, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Sergipe, Tocantins), e o *Triatoma brasiliensis* (difundido em todo o semi-árido do nordeste e no norte de Minas Gerais) são as espécies mais significantes, cobrindo uma área de 3,6 milhões de km², cerca de 36% da superfície total do país (WHO, 2003).

Visando implementar atividades de controle da DC, dois grandes inquéritos nacionais foram realizados para orientar as possíveis ações de combate ao *T. cruzi*. Um deles diz respeito à soro prevalência da doença em humanos e o outro trata da distribuição das espécies de triatomíneos. Compilando estes dados e fazendo a correlação entre a espécie do vetor e a incidência da doença, Passos e Silveira, (2011) reafirmaram a antropofilia do *T. infestans* e sua relação com a prevalência da infecção, já que onde há maior presença desta espécie, a infecção é frequente.

Além da transmissão direta pelo inseto vetor, a transmissão pode ocorrer por diversas outras maneiras, entre elas transfusões sanguíneas, ingestão de alimentos

contaminados com fezes do triatomíneo, transplante de órgãos, amamentação, acidentes laboratoriais, relação sexual com mulheres contaminadas em período menstrual, entre outras (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

3.1.3 Morfologia, ciclo biológico e patogênese do *Trypanosoma cruzi*

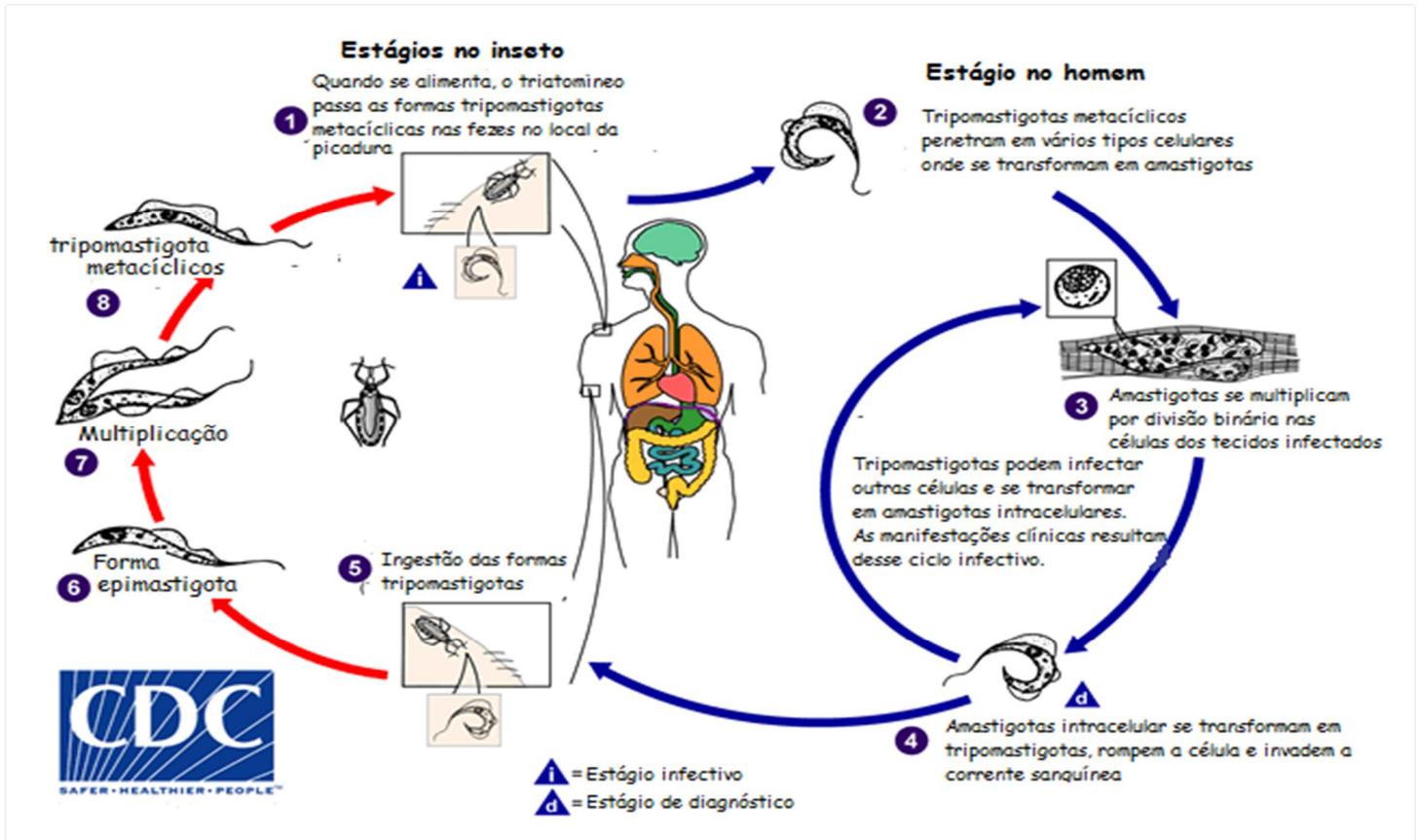
Trata-se de um protozoário flagelado, da ordem *Kinetoplastidae* que tem como característica principal a presença de um cinetoplasto (estrutura que abriga uma massa de DNA extracelular concentrado na única mitocôndria que possui, denominado de kDNA) (SIMPSON et al., 2006). A espécie é heterogênea e possui inúmeras cepas que circulam entre os hospedeiros mamíferos e insetos vetores. Sua extensa diversidade pode ser um dos motivos que explica as manifestações clínicas diferentes na DC (RASSI; MARINNETO, 2010).

Após diferentes propostas, um novo consenso acerca da nomenclatura intraespecífica de *T. cruzi* foi proposto em 2009, orientando que as cepas devem ser classificadas em seis DTUs (*discrete typing unit* - unidades de tipagem discretas) – termo utilizado para descrever um conjunto de grupos que são geneticamente mais semelhantes entre si que qualquer outro grupo e identificados por marcadores moleculares comuns - nomeados como TcI a TcVI (ZINGALES et al., 2009).

O *T. cruzi* existe em três morfologias distintas presentes em diferentes etapas do ciclo de vida desse protozoário. A forma tripomastigota (1), presente no sangue periférico do hospedeiro mamífero, é transferida para o triatomíneo durante a hematofagia e dirigida para o intestino do inseto, onde sofrerá diferenciação para forma tripomastigota metacíclica, passando anteriormente por uma forma intermediária exclusiva no triatomíneo, a forma epimastigota (2). Por meio do processo de alongamento do corpo celular e do flagelo origina-se a forma epimastigota clássica, que será diferenciada na forma tripomastigota metacíclica infectante. Durante sua transformação, as formas amastigotas (3) incham e estendem seus flagelos podendo neste processo serem referenciadas como esferomastigotas. Nos tecidos infectados, as formas amastigotas intracelulares irão transformar-se em tripomastigotas rompendo a célula, invadindo a

corrente sanguínea e uma variedade de células, com tropismo para células musculares e neuronais dando seguimento ao ciclo conforme esquematizado na figura 1 (TYLER; ENGMAN, 2001; MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012).

FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DO *TRYPANOSSOMA CRUZI*.



Adaptado de <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>

Os mecanismos e a maneira como o *T. cruzi* invade as células do hospedeiro variam muito com o tipo celular alvo. Diferente de outros agentes infecciosos, as formas tripomastigotas deste parasito têm capacidade de invadir diretamente tanto fagócitos profissionais quanto células não fagocíticas, sendo os macrófagos teciduais os alvos críticos na resposta infecciosa precoce através do processamento e apresentação do antígeno (EPTING et al., 2010).

O processo denominado invasão celular é descrito como uma penetração ativa na qual a passagem pela membrana plasmática é uma atividade mecânica prevalente do

parasito. Tal processo no *T. cruzi*, é caracterizado por sempre apresentar a formação de um vacúolo parasitóforo inicial, formado pelo processo de endocitose onde há a extensão da membrana plasmática de maneira a envolver o parasito (TAN; ANDREWS, 2002; SOUZA; CARVALHO, 2013).

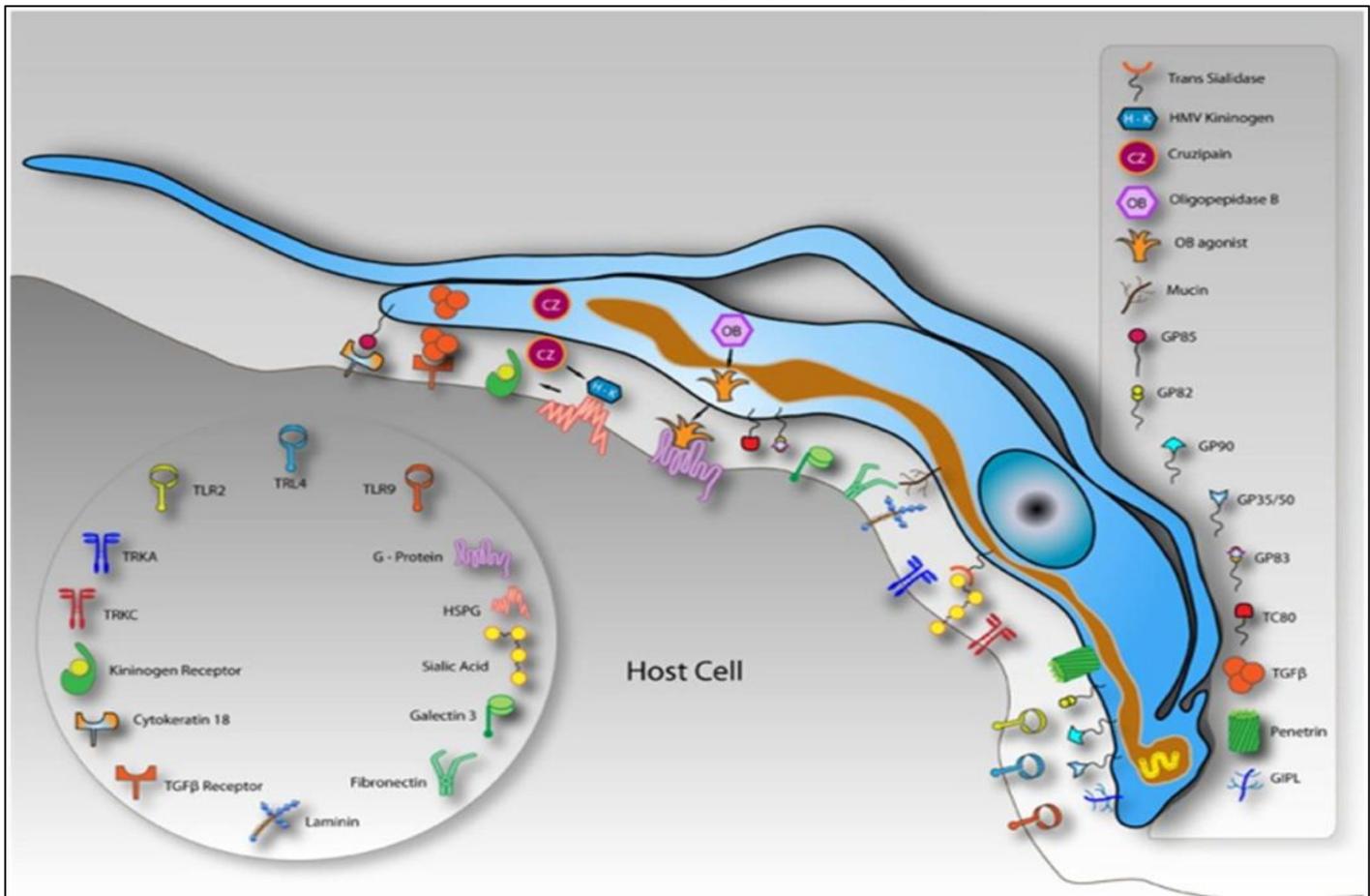
Para conseguir inserir-se no meio intracelular, é necessário que inicialmente o parasito tenha acesso e forme um vínculo estável com a superfície da célula, processos denominados adesão e reconhecimento. Para tal, há o envolvimento de uma série de moléculas de superfície que servem como âncoras de adesão e, além disso, vão permitir a destruição da matriz, evasão imune ou ainda iniciar outros eventos de sinalização bidirecional entre o parasito e a célula do hospedeiro (EPTING et al., 2010; BARRIAS et al., 2013).

A superfície do *T. cruzi* é constituída principalmente por glicoconjugados, frequentemente da superfamília gp85/Trans-sialidases e mucinas, associados a membrana através de âncoras de glicosilfosfatidilinositol. Atransialidase TeTS é uma enzima expressa pelo *T. cruzi* que catalisa a transferência de ácido siálico presente em glicoconjugados do hospedeiro para mucinas de superfície e glicoproteína gp/85 do parasito, pois o mesmo é incapaz de produzir o ácido siálico. A glicoproteína gp85 está envolvida no processo de adesão celular do parasito por reconhecer proteínas celulares como laminina, fibronectina, colágeno e citoqueratinas e ativar a cascata de sinalização e mobilização do cálcio nas células do hospedeiro e do parasito. Ainda, apresenta importante papel na infecção oral por apresentar ligações seletivas à mucina gástrica. Os glicoconjugados do tipo mucina fornecem proteção do parasito contra o vetor invertebrado e contra os mecanismos de defesa do vertebrado, podendo ser divididos em TcMUC presente nos parasitos encontrados no inseto vetor e TcSMUG nos parasitos encontrados nos hospedeiros vertebrados (EPTING et al., 2010; OSORIO et al., 2012; TORRECILHAS et al., 2012; BARRIAS et al., 2013).

Ainda, outras moléculas desempenham importante papel nos processos de adesão e evasão. Pode-se destacar algumas, tais como, a cisteino-peptidase denominada cruzipan que é expressa em todos os estágios de desenvolvimento do parasito e em organelas relacionadas a lisossomos, desempenhando papel na formação de cininas que promovem o aumento de cálcio citoplasmático, o qual é essencial para o processo de

invasão, bem como, a facilitação da degradação proteolítica do tecido. Destacam-se também receptores para Fc e moléculas do complemento, receptores de manose e para componentes da matriz extracelular, receptores de bradicinina, endotelina, entre outras moléculas (Figura 2). Cerca de 50 % do genoma de *T. cruzi* é dedicado a codificação destas proteínas de superfície (EPTING et al., 2010; OSORIO et al., 2012; TORRECILHAS et al., 2012; BARRIAS et al., 2013).

FIGURA 2 - MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE INTERAÇÃO E RECONHECIMENTO PARASITO-HOSPEDEIRO



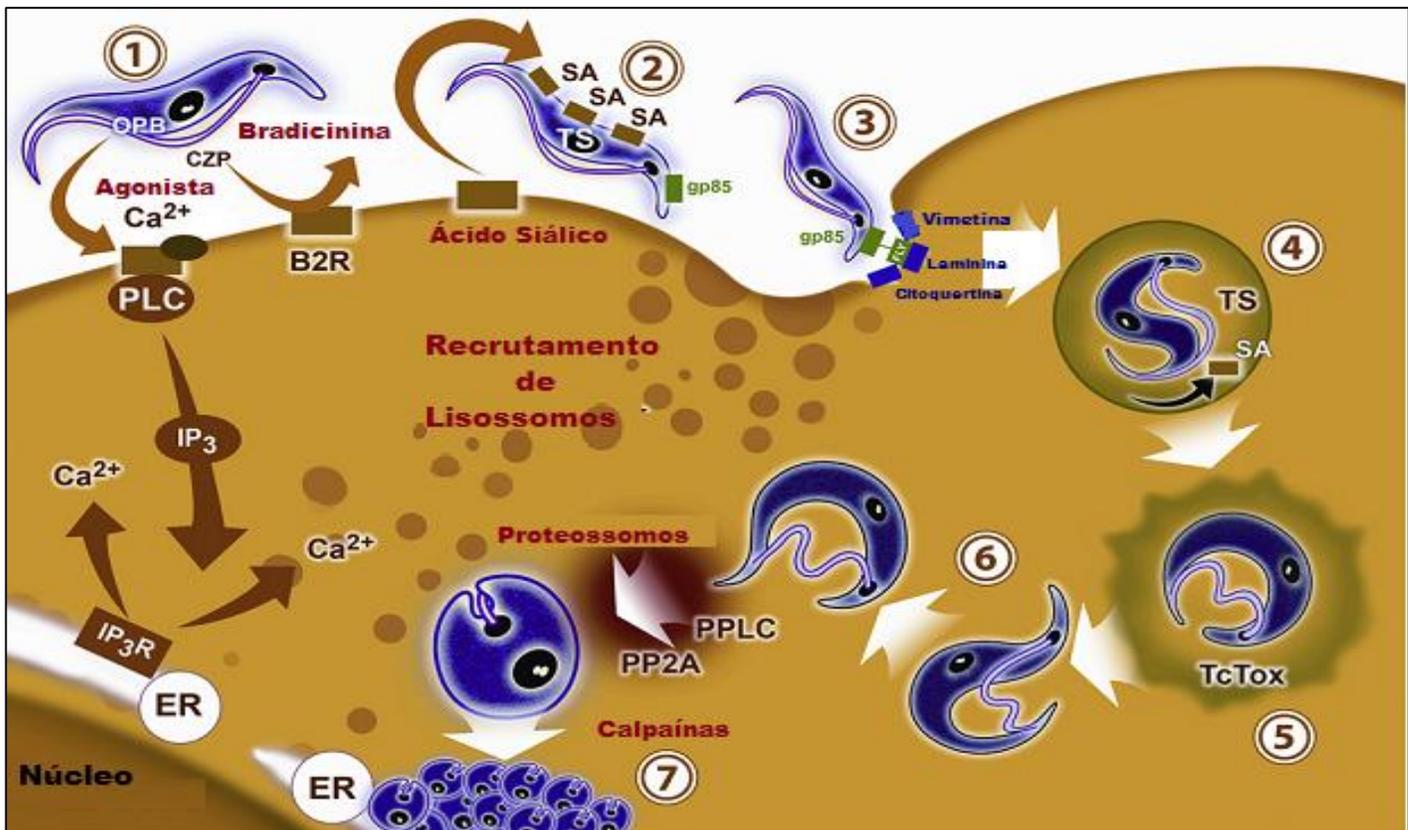
. Fonte: EPTING et al.(2010).

A invasão celular, após o reconhecimento e ligação à superfície, ocorre por diversas vias de internalização. Esses mecanismos são conhecidos como fagocitose e endocitose. No processo de fagocitose mediada por células fagocíticas profissionais, a célula emite pseudópodos com a participação ativa de filamentos de actina. Ao contrário,

no processo de endocitose, a invaginação não depende da emissão de pseudópodos, mesmo assim há a contribuição direta dos filamentos de actina (BARRIAS et al., 2013).

Outro processo de internalização do parasito, de ocorrência em células não fagocíticas, baseia-se no recrutamento de lisossomos, de maneira dependente de microtúbulos e cinesinas motoras (EPTING et al., 2010). Nesse processo de invasão, lisossomos são recrutados para o local de ataque fundindo-se à membrana plasmática formando um vacúolo no qual o parasito se une de maneira a formar uma vesícula parasitófora que se funde aos lisossomos, formando o fagolisossomo. Com o auxílio da oligopeptidase B, que induz a liberação de Ca^{2+} do retículo plasmático através da geração de um agonista de cálcio que se liga ao receptor de superfície na célula alvo ativando a cascata de sinalização, o parasito promove mudanças celulares que levam ao recrutamento e fusão de lisossomos da célula hospedeira facilitando sua entrada (BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

No espaço luminal, glicoproteínas lisossomais sializadas (lgp_s) recobrem o fagolisossomo. Tais proteínas desempenham um papel protetivo na membrana do lisossomo contra o ataque de enzimas lisossomais no vacúolo fornecendo, ainda, substrato para as transialidases do *T. cruzi*. A liberação do parasito no citoplasma é mediada por uma proteína formadora de poros do parasito (Tc-tox) que possui maior atividade em membranas desializadas, dessa maneira a remoção do ácido siálico das glicoproteínas lisossomais sializadas facilita a ruptura do fagolisossomo pela Tc-tox conforme a figura 3 (OSORIO et al., 2012).

FIGURA 3 - PROCESSO DE INVASÃO CELULAR E DIFERENCIAÇÃO DO *T. CRUZI*.

Fonte: Adaptado de OSORIO et al (2012)

Legenda: (1) Oligopeptidase B (OPB) envolvida na sinalização de cálcio e regulação da exocitose lisossomal. Cruzipan (CZP) gera bradicinina que se liga ao receptor de bradicinina do tipo B (B2R).

(2-3) Transialidase/gp85 participam da invasão celular ligando-se a citoqueratina, laminina e vimetina na célula do hospedeiro.

(4-5) O escape do vacúolo fagolisossomal é atribuído a atividade da transialidase e a expressão da hemolisina TcTox.

(6) Diferenciação para formas amastigotas é realizada por fosfolipase C (PPLC), fosfatase 2ª (PP2A) e proteossomos.

(7) Calpaínas estão envolvidas na proliferação das formas amastigotas.

Diversos são os mecanismos envolvidos na sobrevivência do parasito nas células do hospedeiro, como a expressão de moléculas em sua superfície que interferem na ativação de moléculas do sistema complemento. Outro mecanismo envolve a formação de vesículas provenientes da membrana plasmática da célula do hospedeiro que, quando liberadas, ligam-se à C3 convertase, inibindo sua atividade catalítica. Dessa forma esse mecanismo confere ao parasito proteção contra a lise do complemento e favorece a

sobrevivência. Outras estratégias e mecanismos de sobrevivência utilizados pelo protozoário estão descritas na tabela a seguir (CESTARI et al., 2012, 2013).

TABELA 1 - ESTRATÉGIAS E MECANISMOS DE SOBREVIVÊNCIA UTILIZADOS PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* PARA SOBREVIVÊNCIA NO INTERIOR DOS MACRÓFAGOS.

Estratégias e mecanismos de sobrevivência utilizados pelo <i>T. cruzi</i>	
Estratégia	Mecanismo
Formação ou abrigo em um compartimento intracelular seguro	Evasão para dentro do citosol
Supressão da síntese de radicais microbianos	Inibição da atividade ou expressão da indução de óxido nítrico sintase
Modulação da apoptose de macrófagos	Redução da sobrevivência de macrófagos depois da infecção
Modulação da produção de citocinas por macrófagos	Indução de citocinas inibindo/desativando macrófagos (ex: Interleucina 10, fator transformador de crescimento β)
Inibição da apresentação de antígenos e estimulação de células T	Redução da adesão de células T nos macrófagos infectados

Fonte: Adaptado de BOGDAN & RÖLLINGHOFF (1999).

No hospedeiro, tanto a imunidade humoral como a resposta imune celular participam do controle parasitário. Citocinas, principalmente IFN- γ e TNF- α auxiliam nas defesas parasitárias bem como, na regulação da replicação do *T. cruzi*, e a presença de anticorpos anti-IFN causam um aumento na parasitemia e mortalidade do hospedeiro infectado (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012).

Apesar da contribuição de ambas as vias imunológicas, não é observada uma completa eliminação do parasito. A persistência parasitária e o mimetismo molecular dos antígenos do *T. cruzi* com antígenos humanos no tecido cardíaco e gastrointestinal podem ser a causa da resposta autoimune pós-infecção (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012).

3.1.4 A doença na fase aguda

A doença apresenta-se em duas fases, aguda e crônica. A fase aguda inicia cerca de quatro a oito semanas após a infecção sendo geralmente assintomática ou com poucos sintomas. Quando sintomática, comumente apresenta manifestações como doença febril autolimitada, mal estar, reação inflamatória local com formação de forte inchaço no local da inoculação do parasito (sinal de Romaña), linfadenomegalia, hepato e/ou esplenomegalia com raras alterações cardíacas ou neurológicas, predominância de células mononucleares e a formação de granulomas locais, principalmente nos tecidos cardíaco e muscular (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

Nesta fase há aumento da parasitemia e circulação das formas tripomastigotas na circulação sanguínea - podendo ser detectada por exames de microscopia, técnicas moleculares como PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) ou ainda, mesmo que com baixa capacidade de detecção devido a produção diminuta em fase aguda, a pesquisa sorológica de anticorpos específicos contra *T. cruzi* - com o desenvolvimento de imunidade humoral e celular. Ao infectar os macrófagos, inicia-se a resposta imune inata com a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF), e interleucinas. Essas moléculas estimulam células do tipo *natural killer* (NK) a produzir interferon gama, que age diretamente nos macrófagos para o desenvolvimento de atividade antimicrobiana. Esses macrófagos ativados então produzem óxido nítrico, que é um potente agente contra o *T. cruzi* (AYO et al., 2013).

As manifestações dessa fase geralmente são autolimitadas em cerca de 90% dos casos, mesmo quando o indivíduo não é tratado com drogas antiparasitárias (RASSI; MARIN-NETO, 2010).

3.1.5 A doença na fase crônica

O resultado do controle incompleto da parasitemia é a permanência do *T. cruzi* ao longo da vida, causando nestes indivíduos a forma crônica da doença, na qual há a presença de positividade para anticorpos contra *T. cruzi* e baixos níveis de parasitemia,

mesmo em estágios assintomáticos. Um terço desses pacientes desenvolve a fase sintomática da doença, com mais de 90% dos casos havendo o acometimento do tecido cardíaco e no restante a presença de lesões como o megacólon e o megaesôfago (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012).

3.1.5.1 Forma crônica ideterminada ou assintomática

A forma crônica indeterminada é definida pela presença de positividade sorológica para anticorpos contra *T. cruzi* ou testes parasitológicos positivos, com ausência de sinais e sintomas clínicos, com normalidade eletrocardiológica e radiológicas de esôfago, cólon e coração, sendo essa classificação de uso em estudos epidemiológicos (RASSI; MARINETO, 2010). Pode durar de 10 a 30 anos e o indivíduo portador do parasito pode permanecer assintomático durante toda vida. Mesmo sem apresentar sintomatologias, pequenos focos de lesões inflamatórias são detectados em amostras de tecidos de músculo cardíaco, esquelético e do trato gastrintestinal de pacientes assintomáticos. Apesar da existência de muitas pesquisas em relação a essa fase da doença, não se sabe exatamente qual seu verdadeiro prognóstico. As contribuições a respeito de tal estágio apresentam achados como: focos de miocardite linfoplasmocitária, necroses vasculares e arteriais em vários órgãos, atividade citotóxicas de linfócitos T contra células do miocárdio (MACÊDO, 1999; PUNUKOLLU et al., 2007; MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012).

A problemática econômico-social que envolve os indivíduos portadores da forma indeterminada da DC está inserida no questionamento da possibilidade de tais indivíduos (assintomáticos e sem alterações de exames eletrocardiográficos e ergométricos) estarem aptos e em boas condições de trabalho, sem restringi-los a condição de cidadãos economicamente improdutíveis (MACÊDO, 1999).

3.1.5.2 Formas crônicas cardíaca, digestiva e neurológica

A Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) se manifesta tanto em homens quanto em mulheres na faixa dos 30 a 50 anos, com o aparecimento de anormalidades nos exames de eletrocardiograma e/ou ecocardiograma, como bloqueio do ramo direito, bloqueio divisional anterior esquerdo, extrassístoles ventriculares, bradicardia sinusal, fibrilação auricular e completo bloqueio atrioventricular. Nos estágios avançados da doença cardíaca chagásica, são sinais típicos o aparecimento de miocardite, morte súbita cardíaca e insuficiência cardíaca congestiva (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012; NUNES et al., 2013).

O dano cardíaco é geralmente progressivo, e caracteriza-se por quatro fases levando em conta os sinais clínicos e achados de exames complementares. No primeiro estágio, estágio A, o paciente portador crônico da doença não possui qualquer tipo de anormalidade cardíaca. No estágio B, o paciente assintomático passa a apresentar mudanças no eletrocardiograma e leves anormalidades de contratilidade no ecocardiograma e funções ventriculares preservadas ou decaimento leve da funcionalidade do ventrículo esquerdo. Ao evoluir para o estágio C, passa a apresentar disfunção ventricular esquerda ou sintomas prévios de falha cardíaca que quando evolui para o estágio D, o mais severo, apresenta falhas cardíacas mesmo em repouso, sendo necessárias intervenções especializadas e intensivas (NUNES et al., 2013).

Os sinais e sintomas da CCC não se correlacionam diretamente com a gravidade dos quadros clínicos, alguns pacientes com alterações importantes no eletrocardiograma e ecocardiograma podem passar longos períodos sem apresentar sintomas. Devido a isso, o uso apropriado de métodos diagnósticos assegura a avaliação do prognóstico do paciente. Os testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o *T. cruzi* são utilizados para diagnosticar a infecção crônica, podendo ser realizados via ensaios de ELISA, técnicas de imunofluorescência e a pesquisa de biomarcadores no hospedeiro por meio de técnicas de espectrometria de massa. Para a identificação das fases da CCC são utilizados os exames de eletrocardiograma, ecocardiograma e cintilografia cardíaca (PUNUKOLLU et al., 2007; NDAO et al., 2010; CORTEZ et al., 2012).

O desenvolvimento do megacólon está associado com distúrbios de motilidade (constipação) e hipertrofia do tecido colo-retal, com acometimento maior na porção do reto e sigmoide. Ainda, existe uma associação das lesões do Sistema Nervoso Entérico com a substancial redução do número de neurônios ali presentes. Uma redução do número de células ganglionares no trato gastrintestinal, bem como, o aumento do diâmetro dessas células apresenta associação direta com a dilatação e hipertrofia do cólon. Baseado no método de contagem que permite a avaliação do grau de denervação destas células, Adad et al (2001) demonstra um aumento em 69,3% do diâmetro e diminuição do número das células nervosas do complexo entérico com um grau de denervação superior a 55% em 41,2% dos paciente chagásicos crônicos com megacólon da população de estudo.

Seguindo esta mesma linha, Silveira et al. (2007), avaliou a mudança na inervação muscular entérica de pacientes com megacólon, sugerindo que a perda das células do Sistema Nervoso Entérico pode induzir a perda da homeostase do cólon contribuindo para o desenvolvimento da hipertrofia, demonstrando ainda que a perda do tecido neuronal também ocorre em pacientes chagásicos assintomáticos.

A presença de kDNA (DNA kinetoplasto) no esôfago de pacientes com megaesôfago sugerem uma associação entre o desenvolvimento dessa deformação e a permanência do parasito na fase crônica (SILVEIRA et al., 2005).

Para verificar tal afirmação, o processo inflamatório, a denervação e a presença de kDNA de *T. cruzi* foi avaliado em pacientes que apresentavam megaesôfago e um grupo controle, confirmando a presença de kDNA em todas as amostras de pacientes que apresentavam essa característica clínica, bem como, a presença de uma contagem neuronal diminuída, células *Natural Killers* e linfócitos citotóxicos. Dessa maneira, os autores sugeriram que a presença dessas células esteja ligada à perda neuronal, e que a denervação, portanto, pode estar associada à processos citotóxicos imunes presentes devido à persistência do parasito (SILVEIRA et al., 2005).

Existem relatos do comprometimento neurológico na DC crônica, com o aparecimento das formas tripomastigotas no líquido cerebrospinal acompanhado de pleocitose linfocítica, proteínas elevadas e glicose diminuída. O Sistema Nervoso periférico é raramente afetado e, quando ocorre, é caracterizado por uma leve polineuropatia sensorial e motora (PY, 2011).

Sintomatologias clínicas como cefaleia, convulsões, paraparesia e hemiparesia ou alterações eletroencefálicas inespecíficas têm sido relatadas. Com o objetivo de verificar a existência do comprometimento da função cortical cerebral, Prost et al. (2000) realizaram estudos eletrofisiológicos em pacientes chagásicos crônicos, no qual reportam o comprometimento cerebral nesta fase da doença.

3.1.6 Fisiopatogenia da Doença de Chagas crônica.

Diversos são os mecanismos patogênicos envolvidos nos danos teciduais na DC crônica. As hipóteses sobre tais mecanismos baseiam-se nos danos relacionados com a resposta direta do sistema imune ao parasito no tecido e às interações inflamatórias, imunológicas e autoimunes desenvolvidas pelo hospedeiro (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012). Alguns desses mecanismos são citados a seguir:

- a) **Danos relacionados ao sistema nervoso:** Essa hipótese de patofisiologia sugere a presença de um processo de denervação do sistema nervoso autônomo e destruição de células ganglionares parassimpáticas do coração (ROSSI, MARCOS A; MENGEL, 1992) e células ganglionares do trato gastrintestinal (ADAD et al., 2001). Tais danos podem estar envolvidos na fase inicial da doença, fase aguda, podendo acelerar os processos de injúria tecidual observada na fase crônica da DC (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012)
- b) **Toxicidade celular induzida pelo *T. cruzi* e produtos do *T. cruzi*:** Tal hipótese baseia-se na sugestão de que o dano celular é ocasionado pela própria presença do parasito e a resposta inflamatória aguda do hospedeiro em resposta à sua presença no tecido (RASSI; MARIN-NETO, 2010). Todavia, a baixa carga parasitária tecidual na fase crônica e os baixos níveis de produtos do parasito sugerem que tal mecanismo tenha maior relevância apenas nos casos onde há elevada carga parasitária (fase aguda) e nos casos onde há processos de imunossupressão instalados (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012).

- c) **Alterações microvasculares induzidas pelo *T. cruzi*:** Nesse mecanismo os autores sugerem que, sem haver lise celular, o parasito interage com reações metabólicas das células do endotélio microvascular, resultando em modificações na síntese de proteínas e mudanças na homeostase do cálcio podendo levar a danos relacionados a hipoperfusão celular e consequente isquemia e hipóxia celular (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012)
- d) **Ativação de célula B policlonal:** Processos autoimune e imunossupressivos podem resultar em ativação de células B policlonais dando suporte aos eventos patogénéticos associados a doença (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012).
- e) **Persistência de antígenos do *T. cruzi*:** A persistência de antígenos do parasito pode desencadear uma resposta mediada por células T, ocasionando danos às células do hospedeiro por citotoxicidade ou através da ativação *bystander* (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012).
- f) **Autoimunidade:** O mecanismo propõe a relação da presença de mimetismo molecular e/ou ativação *bystander* com epítomos moleculares do hospedeiro (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012)

Muitos mecanismos sobre a patogenia do processo inflamatório da DC foram reportados após os anos 90, enfatizando especialmente a agressão autoimune associada ao mimetismo antigênico do *T. cruzi*, e a persistência de alta intensidade parasitária na fibra cardíaca (KIERSZENBAUM, 1999, 2005). Ainda, Rossi & Mengel (1992) argumentam que a patogênese da CCC relaciona-se com a invasão contínua do parasito no tecido cardíaco e liberação de toxinas locais, bem como, da participação de mecanismos autoimunes. Os autores enfatizam que a hipótese de participação da autoimunidade tem sido postulada como a principal causa da patogênese, baseada em estudos experimentais que relatam a modulação da produção de anticorpos, ativação de macrófagos e indução da lesão por linfócitos T CD4+.

Os mecanismos que sugerem a autoimunidade após a infecção pelo *T. cruzi* envolvem a geração de células maduras, células T ou células B efectoras autorreativas que são capazes de induzir o dano tecidual. Dessa maneira, três mecanismos são importantes

para o desenvolvimento da autoimunidade na DC. O primeiro refere-se ao dano tecidual e consequente exposição de proteínas intracelulares que podem atuar como autoepítomos ativando a imunidade inata e a resposta inflamatória do tecido cardíaco nas fases aguda e crônica da infecção (ativação *bystander*). Nesse mecanismo, o parasito produz uma condição proinflamatória com produção de citocinas, óxido nítrico, peroxinitritos e quimiocinas que juntamente com a replicação parasitária resultaria nos danos de cardiomiócitos e consequente liberação de autoantígenos e epítomos críticos.

O segundo mecanismo – já mencionado acima – trata do mimetismo molecular de antígenos do parasito com epítomos antigenicamente semelhantes do hospedeiro levando a uma resposta imune cruzada das células T e B contra seus epítomos próprios. Porém, ainda há questionamento em relação à reatividade desses autoanticorpos contra proteínas amplamente distribuídas em diversos tecidos. O terceiro mecanismo leva em conta a ativação policlonal e produção de anticorpos específicos contra *T. cruzi* e autoantígenos sugerindo a ativação de células B policlonais durante a infecção aguda (KIERSZENBAUM, 2005; CUNHA-NETO et al., 2011; MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012).

O mimetismo molecular é considerado o mais significativo mecanismo de autoimunidade na CCC, sendo considerado como um evento patogênico chave na manifestação da doença (BONNEY; ENGMAN, 2015). De fato, um número crescente de reações cruzadas entre antígenos do *T. cruzi* e do hospedeiro foram relatados nos últimos anos. Na tabela abaixo, adaptada de Cunha-Neto et al. (2006), são listados antígenos de *T. cruzi* e humanos que exibem reação cruzada.

TABELA 2 - MOLÉCULAS QUE MIMETIZAM ANTÍGENOS PRÓPRIOS DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO.

Antígenos humanos	Antígenos de <i>T. cruzi</i>
Neurônios	Glicolípido sulfatado
Proteína neuronal de 48 kDa	F1-160
Músculo esquelético e cardíaco	Fração microsomal

Músculo liso e estriado	Proteína de 150 kDa
Cadeia pesada da miosina cardíaca	Proteína B13
Antígeno do retículo sarcoplasmático (SRA)	SRA
Glicoesfingolípídios	Glicoesfingolípídios
Proteína associada aos microtúbulos (MAP) (cérebro)	MAP
Proteína da membrana do linfócito de 28 kDa	Proteína de membrana de 55 kDa
Proteína ribossomal de 23 kDa	Proteína ribossomal de 23 kDa
Adrenoreceptor Beta 1, receptor muscarínico M2, receptor colinérgico M2 (cardíacos)	P0 ribossomal, P2beta e proteína de 150 kDa
Receptor muscarínico de acetilcolina cardíaco	Desconhecido

Fonte: Adaptado de Cunha-Neto et al (2006)

Medei et al. (2008) sugeriram que a presença do parasito não é um estímulo suficiente para causar a miocardite difusa com perda significativa da função e, portanto, outros mecanismos devem estar associados. Ainda, Coura; Borges-Pereira (2012) citam que o megacólon, megaesôfago e distúrbios na condução cardíaca na DC são decorrentes da denervação do sistema autônomo parassimpático e essa denervação pode ser explicada pelo fenômeno inflamatório local e por mecanismos imunológicos.

3.2 Proteômica, metabolômica, quimiometria e pesquisa de biomarcadores

O termo biomarcador é definido como uma característica que é objetivamente mensurada e avaliada como um indicador do processo biológico normal, patogênico ou resposta farmacológica a alguma intervenção terapêutica (STRIMBU; TAVEL, 2011). O Programa Internacional de Química da OMS, tem uma definição mais ampla: alguma substância, estrutura ou processo e seus produtos que podem ser mensurados no organismo e influenciar ou prever a incidência de êxito ou doença (“IPCS. Biomarkers in risk assessment :validity and validation.” 2001).

Seu uso potencial advém da possibilidade de fornecer a identificação dos eventos iniciais dentro da história natural da doença, possibilitando uma via de identificação da sua patogênese. Além disso, leva em conta variáveis e o efeito de modificação do risco preditivo, sendo que, por essa capacidade, os biomarcadores são utilizados por epidemiologistas, médicos e cientistas para o estudo das doenças humanas, de maneira a fornecer o entendimento das causas, maneiras de diagnósticos, progressão/regressão e o processo de cura (MAYEUX, 2004).

Os biomarcadores podem ser classificados em relação às suas características moleculares, bem como, quanto ao processo no qual esta envolvido. Em relação ao processo clínico, os biomarcadores podem ser classificados em três categorias: I) biomarcadores diagnósticos II) biomarcadores prognósticos III) biomarcadores de resposta terapêutica. Devido à abundância proteica nos fluídos corporais e por esse grupo de moléculas apresentar maior estabilidade que metabólitos e o DNA, a proteômica tem recebido muita atenção na pesquisa de biomarcadores (LIU et al., 2014).

As proteínas são provavelmente as moléculas mais afetadas quando as doenças se instalam, razão pela qual a pesquisa de biomarcadores proteicos tem sido bastante explorada em diversas doenças, tais como, câncer, doença de Alzheimer, síndromes genéticas, doenças cardiovasculares e negligenciadas, tais como, leishmaniose, hanseníase, DC, entre outras (MCDONALD; YATES, 2000; MASUMORI et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2005; XU et al., 2005; NDAO et al., 2010; CALLIGARIS et al., 2011; LIU et al., 2014).

O conjunto de proteínas expressas pelo genoma em um determinado momento da vida é denominado proteoma. O mapeamento das proteínas explica não apenas a sua existência, mas também sua expressão e atuação nos seres vivos, pois há uma variação de expressão de acordo com a idade, fatores ambientais, cepas, status fisiológico, fase de diferenciação celular, entre outros (WILKINS; CHEMISTRY, 1996).

Essencialmente, a proteômica estuda de maneira descritiva e quantitativa desde o conjunto de proteínas de uma organela subcelular até as proteínas de um ecossistema, seus níveis de expressão, as modificações pós-transcricionais e pós-traducionais, interações, entre outras características, com o fim de obter uma visão integrada dos processos de doença e celulares, e suas redes de ligação. Tem aplicação bem estabelecida na investigação das alterações clínicas e laboratoriais, podendo relacionar as mudanças de expressão de proteínas em processos de doença ou estudo toxicológicos de drogas e hormônios, bem como,, identificar e quantificar novos biomarcadores no diagnóstico diferencial de doenças (BLACKSTOCK; WEIR, 1999).

A análise proteômica pode ser realizada em diversos fluidos corporais e tecidos, porém, sem dúvida, o soro e o plasma são as fontes mais importantes para busca de marcadores biológicos, fornecendo importantes informações sobre os processos fisiopatológicos. Muitas das proteínas celulares aparecem em concentração muito reduzida na circulação sanguínea, em contraste com algumas proteínas abundantes, cerca de 22, que compõem aproximadamente 95% do volume proteico sorológico (BARBOSA et al., 2012).

A eletroforese bidimensional (2D) é uma técnica comumente utilizada nos laboratórios e possui capacidade de separar e resolver milhares de proteínas em uma única análise, razão pela qual é uma das principais ferramentas na análise de expressão de perfis proteicos nas doenças. Porém a técnica possui algumas limitações. Dentre elas, a massa molecular: a baixa resolução de proteínas menores que 10 kDa e proteínas maiores que 150 kDa. Ainda, a análise de proteínas que apresentam pontos isoelétricos muito básicos, proteínas pouco solúveis e pouco abundantes são difíceis de serem detectadas, pois são raramente resolvidas utilizando géis convencionais (ÁLVAREZ-CHAVER et al., 2014). Para resolver tais limitações, modificações de protocolos, como a adição de detergentes e agentes redutores tem sido constantemente explorados; bem

como,, novas técnicas têm sido desenvolvidas. Visando melhorar a reprodutibilidade e o tempo necessário em uma análise de eletroforese 2D convencional, uma técnica de eletroforese em gel diferencial (2D-DIGE) foi desenvolvida onde são utilizados cromóforos diferentes para diferentes amostras em uma mesma corrida eletroforética. Dessa maneira é possível a visualização de padrões diferenciados, sem que haja a interferência do preparo de géis e condições de corridas como ocorre na eletroforese 2D convencional, tornando assim o 2D-DIGE uma técnica mais robusta e excelente para estudos de biomarcadores (ÁLVAREZ-CHAVER et al., 2014).

Apesar da proteômica descrever e quantificar o conjunto de proteínas de maneira a obter uma integração dos processos celulares junto à transcriptômica, ambas ainda são incapazes de mapear os rastros resultantes dos processos bioquímicos envolvidos nos diferentes momentos metabólicos celulares. Portanto, a metabolômica vem de encontro a complementar as demais “ciências ômicas” na busca do entendimento dos processos biológicos, informando a fisiologia celular nas diferentes condições biológicas (normal ou patológica) estudadas (NICHOLSON et al., 2002).

Metabólitos são moléculas resultantes do conjunto dinâmico de reações químicas que constituem o metabolismo dos seres vivos. Nesse processo, muitos são os fatores endógenos e exógenos que contribuem para a sua homeostase. Quando há um desequilíbrio desses processos, ocorrem mudanças na composição e/ou quantificação dos metabólitos que são passíveis de serem mapeadas. Portanto, a metabolômica é a ciência que estuda os perfis metabólicos de células, tecidos, órgãos e organismos em diferentes condições de exposição (BARALDI et al., 2009).

A dosagem global dos metabólitos, assim como dosagens genômicas e proteômicas possibilitam o encontro de informações moleculares funcionais mais completas dos processos bioquímicos que conectam o genoma, uma vez que o perfil metabólico proporciona a informação final das moléculas resultantes da expressão do código genético (BARALDI et al., 2009; NORDSTRÖM; LEWENSOHN, 2010).

Em se tratando de metabólitos como marcadores de processos bioquímicos, tais moléculas são amplamente discutidas como biomarcadores diagnósticos já que podem ser mensuradas em fluidos corporais (soro, plasma, urina, líquido cérebro espinhal)

obtidos através de técnicas metodológicas pouco ou não invasivas. Todavia, esses fluidos podem esconder um número de potenciais metabólitos que podem ser “armadilhas metabômicas” uma vez que, fatores como idade, sexo, condição nutricional, entre outros, possivelmente reflitam na composição do fluido de estudo escolhido. Tais mudanças fisiológicas normais podem mascarar mudanças moleculares causadas por doenças (NORDSTRÖM; LEWENSOHN, 2010).

Outros aspectos a serem observados levam em conta o fato de que potenciais metabólitos marcadores encontram-se diluídos em virtude da sua baixa concentração nos fluidos corporais. Além disso, pode-se destacar a importância da análise da heterogeneidade de muitas doenças e a escolha do grupo controle com o qual os grupos de estudos são comparados, visando assim evitar o encontro de “falsos biomarcadores” provenientes da escolha inadequada desses grupos (NORDSTRÖM; LEWENSOHN, 2010).

As aplicações do estudo metabolômico na clínica têm por objetivo o diagnóstico inicial e caracterização fenotípica de doenças, bem como, a identificação de características metabômicas individuais capazes de prever a eficácia e/ou toxicidade de drogas em estudos farmacometabolômicos. Para tal, as metodologias empregadas baseiam-se em análises de espectrometria de massas ou análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear, que são capazes de analisar amostras biológicas complexas com alta sensibilidade, seletividade e robustez. Ambas são capazes de produzir bases de dados multivariadas que somente podem ser interpretadas utilizando-se ferramentas de bioinformática. Um exemplo disso são os métodos não supervisionados de reconhecimento de padrões (PCA – Análise de Componentes Principais e HCA – Análise Hierárquica de Clusters) que tornam possível a redução da complexidade dos dados espectrais obtidos por meio de análises em gráficos, permitindo sua análise visual e estatística (FERNIE et al., 2004; BARALDI et al., 2009).

3.3 Quimiometria e Análise Multivariada

A quimiometria surgiu em resposta a uma necessidade de desenvolver métodos estatísticos e matemáticos que pudessem solucionar os problemas de análise do grande volume de dados produzidos com o desenvolvimento das técnicas analíticas modernas, tendo sido proposto na década de 70 e nos últimos 10 anos sua aplicação estendida para o uso em diversas áreas da ciência, tais como, química analítica, química orgânica, química forense, ciências de alimentos, ciência farmacêutica, ciência ambiental, medicina, agricultura e indústria. O modelo de estatístico multivariado utilizado pela quimiometria permite a correlação de muitas variáveis simultaneamente, permitindo que um maior número de informações seja analisado (SCHMEE, 1986; WOLD et al., 1987; BAYNE, 2002)

Para o estudo de quimiometria, dois métodos podem ser utilizados. O método não supervisionado e métodos supervisionados de classificação. O método não supervisionado trata-se de um método não paramétrico pelo qual é possível extrair informações relevantes a partir de conjuntos de dados multivariados e recomendado para encontrar tendências em dados desconhecidos. Dentre eles, a Análise de Componentes Principais (PCA) é provavelmente a ferramenta mais conhecida das técnicas de análise multivariada não supervisionadas (KOKOT et al., 1998; CAMPANELLA et al., 2003; JOLLIFFE, 2014)

A PCA consiste em uma ferramenta matemática que possibilita um redimensionamento dos dados multivariados originais para um menor conjunto de variáveis sem prejudicar a relevância das informações originais. Esses novos dados geram conjuntos de *SCORES* e *LOADINGS*, que trazem informações sobre as amostras e as variáveis, respectivamente (MATOS et al., 2003).

As novas disposições relacionam uma amostra à outra, de maneira que aquelas que se aproximam apresentam um perfil multivariado semelhante, enquanto aquelas que se distanciam possuem propriedades diferentes. Assim, é possível classificar as amostras do estudo em grupos distintos (*SCORES*). Da mesma maneira aos *SCORES*, os *LOADINGS* permitem observar quais são as variáveis que diferenciam os grupos de amostras (*SCORES*) (TRYGG et al., 2007).

A aplicação da PCA permite uma simplificação e redução da dimensão original dos dados, modelação, detecção de *outliers*, a seleção das variáveis mais importantes na discriminação e ainda permite classificar e prever amostras externas do sistema em estudo (DAVIES; FEARN, 2005)

As técnicas para análises quimiométricas tem contribuído significativamente para o estudo de metabolômica e proteômica de maneira a permitir que um complexo volume de dados possa ser comprimido sem que haja perda da relevância das informações originais, porém facilitando a compreensão e interpretação da correlação dos mesmos (MATOS et al., 2003).

Na literatura é possível encontrar diversos trabalhos recentemente publicados utilizando a aplicação dos métodos quimiométricos. Nesse sentido, é possível citar os trabalhos de Zhao et al. (2016) que utilizando a ferramenta de PCA observou a expressão de genes RNAm como genes biomarcadores para o abuso do uso de ractopamina, um agonista β_2 , usado ilegalmente como aditivo para aumentar a taxa de crescimento e redução de custos na criação de animais e Liaw et al. (2016) que caracterizou o perfil de lipídeos em modelos celulares *in vitro* de diferenciação de adipócitos em comparação ao modelo *in vivo*, tendo encontrado através da PCA variação na composição de tri e diacilgliceróis, esfingomielinas, glicerofosfolipídeos e cardiolipina entre os modelos estudados.

Outro trabalho utilizando a quimiometria para classificação de amostras foi o de Lin et al. (2016) onde buscou verificar o mecanismo do ginseng, planta utilizada na medicina chinesa para o tratamento da deficiência de energia vital, uma tradicional síndrome da medicina chinesa, usando de três grupos murinos, para buscar possíveis biomarcadores que pudessem explicar o mecanismo de ação desta planta no metabolismo dos animais.

Ainda, visando buscar biomarcadores, Lau et al. (2016) realizaram um estudo utilizando dados obtidos por espectrometria de massas analisados por PCA para buscar um biomarcador para o diagnóstico da melioidose.

3.4 Biomarcadores e Doença de Chagas

O soro e o plasma sanguíneo contêm traços de todas as biomoléculas resultantes dos processos metabólicos produzidas pelo organismo. Na DC, a dinamicidade dos processos celulares e a deposição no sangue das moléculas resultantes desses processos, bem como, os caminhos que esse tecido percorre é importante uma vez que, tal trajeto pode expor modificações no perfil das biomoléculas circulantes. Proteínas circulantes de baixa massa molecular, como peptídeos, hormônios ou pequenas proteínas secretadas, estão relacionadas com processos fisiopatológicos, podendo ser potenciais marcadores clínicos utilizados no diagnóstico, prognóstico e monitoramento terapêutico (LUQUE-GARCIA; NEUBERT, 2007; WEN; GARG, 2012).

Devido à complexidade de avaliação prognóstica dos indivíduos portadores de DC crônica, bem como, ao crescente aumento na incidência das doenças tropicais negligenciadas em países até então considerados livres da doença e, ainda, na tentativa de diminuir o número de resultados falso negativos e falso positivos em testes diagnósticos em bancos de sangue, a busca de novos biomarcadores tem sido alvo constante de pesquisas (NDAO et al., 2010). Nesse sentido, REQUENA-MÉNDEZ et al (2013) relataram vários tipos de biomarcadores que têm sido alvo de pesquisas na DC. Os autores classificaram essas moléculas em quatro grupos, de acordo com a estrutura bioquímica e atividade biológica:

a) **marcadores de inflamação e dano celular:** a desregulação da homeostase dos processos de tolerância imune na presença do parasito é capaz de ativar e amplificar o fenômeno autoimune; dessa maneira, indivíduos com déficit imunológico de tais processos e alta parasitemia inicial são mais propensos ao desenvolvimento das formas cardíacas e digestivas da doença.

b) **biomarcadores metabólicos:** marcadores como glicose, insulina e adipocinas podem ser alterados em virtude do aumento no tamanho e número de ilhotas pancreáticas, infiltrados inflamatórios, fibrose, ou ainda resultante da denervação do pâncreas.

c) **biomarcadores prótrombóticos:** eventos tromboembólicos são comuns na fase crônica da doença, em especial na CCC. Tal fenômeno é atribuído à resposta imune do

hospedeiro e a modificação da viscosidade do sangue promovida pela presença do parasito levando a danos no endotélio vascular e desencadeando eventos inflamatórios.

d) **marcadores derivados de antígenos específicos do parasito:** anticorpos que reagem contra antígenos específicos ou determinados epítomos do parasito.

Grande parte dos pacientes chagásicos apresentam a forma indeterminada da doença que tem características clínicas silenciosas, embora alguns possam apresentar alterações precoces discretas de ordem cardíaca ou digestiva. Parte dos pacientes que evoluem para as formas clínicas cardíacas e digestivas somente é diagnosticada após o estabelecimento de sinais e sintomas característicos com danos irreversíveis. Em vista disso, o grande desafio é encontrar marcadores que auxiliem a identificação de pacientes com maior propensão de desenvolver as formas mais graves da doença, visando o desenvolvimento de respostas mais precoces e melhor abordagem terapêutica. Marcadores já conhecidos estão resumidos na Tabela 3.

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DOS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE CHAGAS

Características dos biomarcadores na doença de Chagas		
	Biomarcador	Correlação com a DC
Enzimas cardíacas e hormônios	Peptídeo natriurético cerebral (BNP)	Deficiência aumenta o risco cardíaco e de morte
	Troponina cardíaca (cTNI)	Aumentada em pacientes chagásicos com cardiomiopatia
Marcadores de inflamação e dano tecidual	Fator de necrose tumoral (TNF α)	Altos níveis em pacientes chagásicos crônicos indeterminados e com CCC
	Intérferon gama (IFN γ)	Relacionado com a severidade da cardiopatia

	Óxido nítrico	Aumentado na cardiomiopatia chagásica crônica
Marcadores de stress oxidativo	Mieloperoxidases	Aumentada em pacientes chagásicos
	Proteína C reativa	Aumentada na forma indeterminada e em pacientes com cardiopatias iniciais
Fenômeno de mimetismo molecular	Fator intersticial vascular endocárdico (EVI-Ab)	Aumentado na CCC
	Anticorpo anti-sarcolema	Aumentado na CCC
	Anticorpo anti-miosina	Correlacionado com a presença de lesões crônicas cardíacas
	Anticorpo anti-músculo cardíaco e esquelético	Aumentado na CCC
	Anticorpo anti-nodo átrio-ventricular e nodo sino-atrial	Sem correlação
	Anticorpo contra receptores acoplados a proteína G (adrenérgico β -1 e M-2)	Indicam cardiomiopatia
	Anticorpo contra receptores acoplados a proteína G (adrenérgico β -2e M-2)	Indicam doença gastrintestinal
	Anticorpo anti-galectina-1	Relacionado com a severidade da CCC
Biomarcadores metabólicos	Apolipoproteína A1	Aumentada em pacientes assintomáticos

	Selênio	Relacionado com a severidade da cardiopatia
Biomarcadores pró-trombóticos	Fragmento de ativação de pró-trombina	Aumentado nos estágios iniciais da DC

Fonte: Adaptado de Requeña-Mendez *et al* (2013).

Visando associar biomarcadores com CCC, OKAMOTO et al (2014) avaliaram três já conhecidos marcadores estruturais cardíacos - peptídeo natriurético cerebral (BNP), creatinoquinase-MB (CKMB) e troponina I - bem como, metaloproteinases e fatores transformadores de crescimento beta em pacientes com DC e indivíduos não infectados com e sem insuficiência cardíaca, afim de avaliar a especificidade destes marcadores. Apesar de não encontrarem um marcador individual associado com as alterações iniciais da CCC, os autores mostraram a existência de uma associação progressiva para os coeficientes de metaloproteinase 2/metaloproteinase 9 e metaloproteinase 2/fator transformador de crescimento beta 1 na gravidade da cardiomiopatia.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), sob o nº de registro CAAE: 0133.0.208.000-07.

Para realização do trabalho, 59 amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos, com as formas cardíacas e indeterminadas atendidos no Ambulatório de Atenção ao Paciente Chagásico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná foram utilizadas.

Os pacientes do estudo foram diagnosticados, previamente, como portadores da doença através de dois diferentes testes imunológicos positivos e como portadores da forma clínica cardíaca através da presença de alterações nos exames de eletrocardiograma e ecocardiograma e da forma clínica indeterminada pela ausência de sinais e sintomas de desordens cardíacas, gastrodigestivas e neurológicas.

Os pacientes selecionados para o estudo não apresentavam qualquer doença de base ou desordem de origem imunológica, como câncer ou doenças autoimunes, que poderiam interferir nos resultados laboratoriais.

Para compor o grupo controle foram utilizadas amostras de soro de 23 indivíduos provenientes do banco de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), que foram pareados de acordo com o sexo, idade e grupo étnico dos pacientes.

Todas as amostras utilizadas fazem parte da soroteca do Laboratório de Imunopatologia Molecular do HC/UFPR.

4.2 Análise do perfil de proteínas.

O perfil de proteínas foi verificado através da técnica de eletroforese bidimensional. Para sua realização, foi preparado um *pool* de soro de 10 pacientes selecionados aleatoriamente com a forma cardíaca, 10 pacientes com a forma indeterminada e 10 controles negativos

4.2.1 Quantificação das proteínas no soro

A quantificação das proteínas nas amostras foi realizada com base no método do Azul de Coomassie, descrito por Bradford (1976). As amostras proteicas foram submetidas à diluição seriada em água MilliQ (1:10, 1:100, 1:1000), a proteína padrão soro albumina bovina (BSA) foi diluída em água MilliQ atendendo gradiente linear de 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL; 2,0 µg/mL. Em placa de 96 poços MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram colocados 20 µL tanto das amostras de proteína padrão quanto das proteínas de concentração desconhecida. Para a leitura do branco foram utilizados 20 µL de água MilliQ e todas as amostras foram feitas em duplicata. Foi adicionado 200 µL do reativo de Bradford e após incubação de 5 min à temperatura ambiente, as absorbâncias das reações colorimétricas foram mensuradas em leitor de ELISA (Meridian ELX 800) com filtro 610 nm programado para deduzir a leitura do branco das leituras das amostras de interesse e calcular a curva a partir das concentrações da proteína padrão.

4.2.2 Eletroforese bidimensional

Para realização da eletroforese bidimensional, 200 µg de proteínas foram reidratadas, overnight, utilizando-se tampão de reidratação (2 M de tiouréia, 7 M de uréia, 2% CHAPS) contendo 10 µM de DTT em strip (fitas de focalização isoeétrica) de 13 cm e pH 3-10. Depois de reidratadas as fitas, as proteínas foram separadas de acordo com o ponto isoeletrico (PI) no aparelho "Ettan IPGphor" (GE Healthcare, Reino Unido). A próxima

etapa foi o desenvolvimento da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE com concentração de 12,5% (segunda dimensão – separação por massa) das proteínas previamente separadas pelo PI.

Os géis foram mantidos sob agitação em todos os passos seguintes que incluíram: incubação em solução de fixação (ácido orto-fosfórico 1,3% e metanol 20%) por 1h, incubação em solução corante (Coomassie G-250 2,5% em ácido orto-fosfórico 2% e sulfato de amônio 10%) por 16 a 48 h, incubação em solução de neutralização (Tris 0,1 M pH 6,5; ajustado com ácido orto-fosfórico) por 3 minutos, lavagem em metanol 20% por 30 segundos, seguido de incubação em solução estabilizante (sulfato de amônio 0,2%) por 1 h e incubação em solução de armazenamento (ácido acético 1%). Os géis foram digitalizados no Image Scanner III (GE Healthcare) e analisados.

4.3 Análise Metabolômica

Para análise metabolômica foram utilizadas as técnicas de infusão direta por espectrometria de massas aliada à quimiometria.

Para a espectrometria de massas, foram adquiridos individualmente espectros utilizando 50 µL de soro, com depleção de proteínas de alto peso molecular, de 82 indivíduos sendo 26 pacientes com a forma cardíaca, 33 pacientes com a forma indeterminada e 23 controles negativos.

4.3.1 Depleção de proteínas de alto peso molecular

A retirada das proteínas de alto peso molecular da amostra foi realizada adicionando-se à amostra 50 µL de pool de soro, 2,5 µL de ditioneitol (DTT) 200 mM e incubado em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 100 µL de solução acetona/ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e homogeneizado em vórtex por 1 minuto. A solução foi centrifugada em 14.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e totalmente evaporado em SpeedVac até a formação de um sedimento.

4.3.2 Espectrometria de massas

As amostras de soro depletadas de proteínas de alto peso molecular foram ressuspensas em 200 μL de acetonitrila/água/ácido fórmico (30:70:0,1 v/v/v), homogeneizadas, centrifugadas a 14000 rpm, 4°C por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um microtubo para posterior análise por espectrometria de massas (DIMS). A análise ocorreu via injeção direta em um espectrômetro de massas do tipo micrOTOF-Q® (BRUKER), com uma fonte de ionização do tipo eletrospray (ESI), no modo positivo e com a bomba seringa com velocidade de fluxo de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Os parâmetros ajustados para estabilização do sinal foram: voltagem do capilar (IS) -4500 V, potencial de entrada no cone EP -500V, pressão do gás de nebulização 0,4 Bar, fluxo do gás de secagem 4 l/min com temperatura de 180 °C. A energia de ionização utilizada para o analisador de massas foi de 5 eV. Os espectros foram adquiridos com um range de varredura de 200 a 1000 Daltons (Da), acumulando 3 ciclos de 3.0 Hz (4 minutos).

4.4 Quimiometria

Para realização da quimiometria, os dados espectroscópicos de massa/carga (m/z) e intensidade de sinal, foram avaliados utilizando a técnica de PCA. Tais dados obtidos pela técnica de infusão direta por espectrometria de massas (DIMS) dos soros dos pacientes chagásicos e controles, foram organizados no software Origin Pro 8® (OriginLab) para compor a matriz de dados que posteriormente foram analisados utilizando o pacote PLSToolbox 3.0® que opera em ambiente Matlab 7.0.1® (Mathworks), e pré-processamento pela técnica de autoescalamento.

4.5 Análise de Associação

Os dados necessários para a correlação clínico-laboratorial foram obtidos dos prontuários dos pacientes. Todos os dados foram adequadamente registrados, mantendo-se o sigilo ético necessário para uso especificamente da pesquisa.

Os parâmetros selecionados para análise de associação foram idade, fração de ejeção do ventrículo esquerdo, presença de insuficiência cardíaca, dosagens lipídicas de colesterol total, as frações HDL e LDL-colesterol e triglicerídeos, e a presença das síndromes metabólicas de hipertensão arterial e diabetes mellitus. Tais parâmetros foram escolhidos uma vez que a presença do parasito leva a alterações em órgãos alvos como o coração, o cólon e o esôfago, bem como, leva a alterações metabólicas celulares, como por exemplo, a presença do parasito no tecido adiposo ocasionando alterações nas rotas bioquímicas relacionadas com síntese e armazenamento de lipídeos.

Os dados resultantes das correlações clínico laboratoriais foram estatisticamente analisados utilizando os *testes de Komolgorov-Smirnov (K-S)* e o *teste de Fisher (F)* para verificação da normalidade e homocedasticidade dos dados, respectivamente.

As estatísticas referentes às variáveis cujos dados foram considerados paramétricos e homocedásticos (colesterol, colesterol-LDL e triglicerídeos), foram realizados utilizando a Análise de Variância de fator único (*ANOVA – One way*).

De forma semelhante, as estatísticas referentes às variáveis cujos dados foram considerados não paramétricos (idade, fator de ejeção do ventrículo esquerdo, colesterol-HDL) foram realizadas utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* e *Wilcoxon-Mann-Whitney*.

Em relação aos dados categorizados (presença de diabetes melitus, hipertensão arterial e insuficiência cardíaca), o método estatístico aplicado foi o teste *Exato de Fisher* ou teste de *Qui-quadrado* com correção de *Yates*, conforme a característica dos dados amostrais.

Quando houve significância entre os grupos, um modelo de regressão logística binária com *odds ratio* (OR) foi aplicado para corrigir as variáveis que poderiam influenciar na resposta apresentada. Os testes estatísticos foram aplicados utilizando os softwares Graphpad Prism® 5.0 e Stata® 12.0, considerando significativo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise proteômica

Estudar as proteínas em larga escala permite a construção de bases de dados que posteriormente facilitam pesquisas que buscam proteínas marcadoras em diversas condições celulares. Para tal, ferramentas modernas têm sido constantemente desenvolvidas, como a eletroforese bidimensional (2DE), eletroforese em gel diferencial (2D-DIGE) e técnicas de espectrometria de massas.

5.1.1 Eletroforese bidimensional

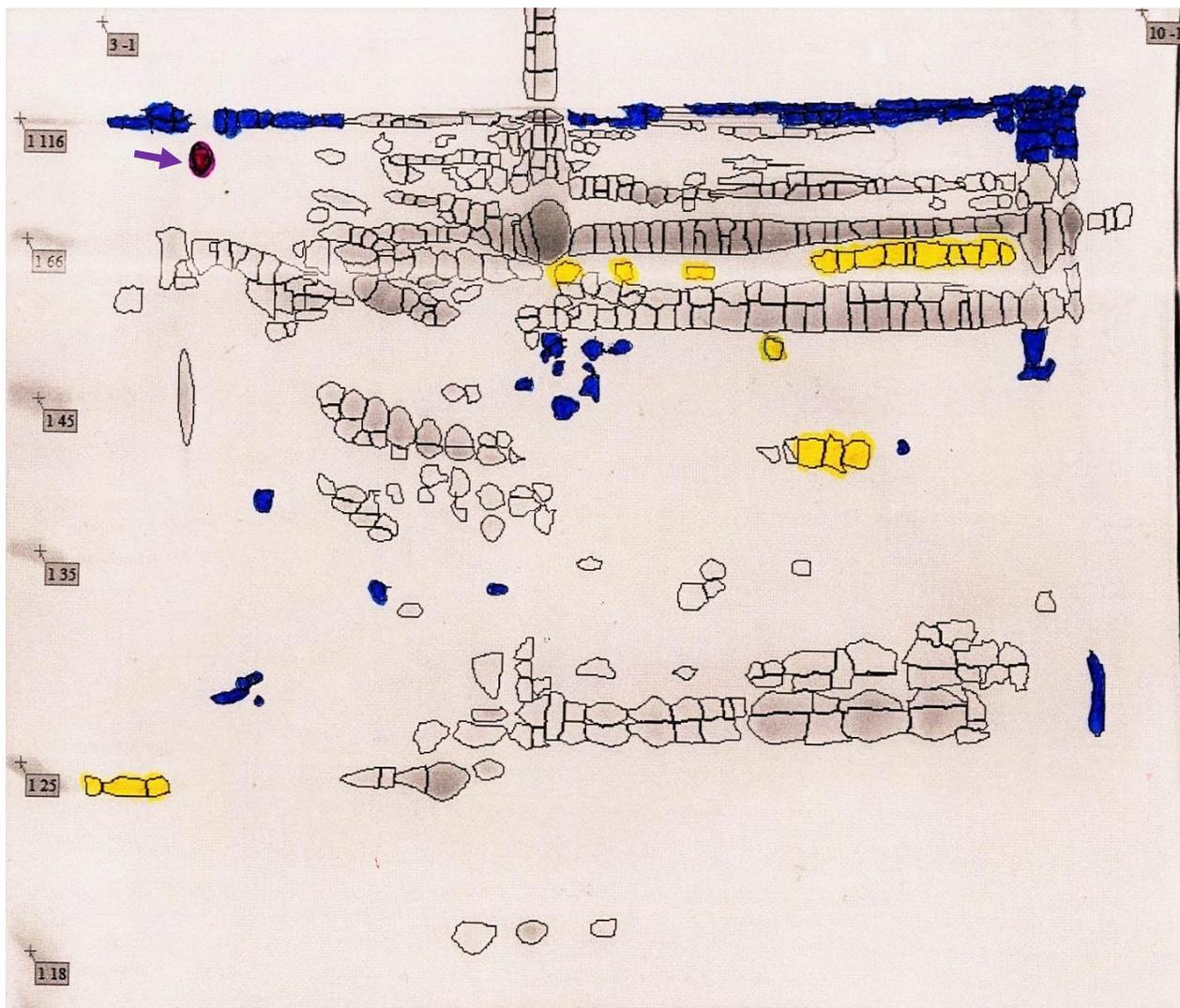
Buscando verificar as diferenças de expressão proteica no pool de soro dos grupos de pacientes cardíacos, indeterminados e no grupo de indivíduos saudáveis, 2DE foram realizadas. Através da análise visual dos géis, foi possível observar uma expressão diferenciada entre proteínas no soro de pacientes com DC e controles, bem como, entre os grupos de pacientes com DC.

Os diferentes pontos realçados nas figuras 4-6 identificam seis tipos de expressão diferenciadas: a) proteínas que foram expressas exclusivamente em pacientes CCC; b) proteínas que foram expressas exclusivamente em pacientes chagásicos crônicos indeterminados; c) proteínas que foram expressas somente em indivíduos do grupo controle; d) proteínas que foram expressas apenas no grupo controle e em pacientes CCC; e) proteínas que foram expressas apenas no grupo controle e pacientes chagásicos crônicos indeterminados e f) proteínas que foram expressas apenas nos pacientes CCC e indeterminados.

Portanto, os resultados obtidos nessa análise proteômica inicial mostraram que existe uma diferença de expressão proteica nos indivíduos chagásicos, comparando-os aos indivíduos que não possuem a DC, bem como, há uma diferença no perfil de expressão de pacientes com diferentes formas clínicas da doença. Em vista disso, os

pontos de proteínas que apresentaram expressão diferenciada foram extraídos dos géis para posterior identificação por espectrometria de massas.

FIGURA 4 - IMAGEM DIGITALIZADA DO GEL SDS-PAGE BIDIMENSIONAL DO *POOL* DE SORO DOS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE

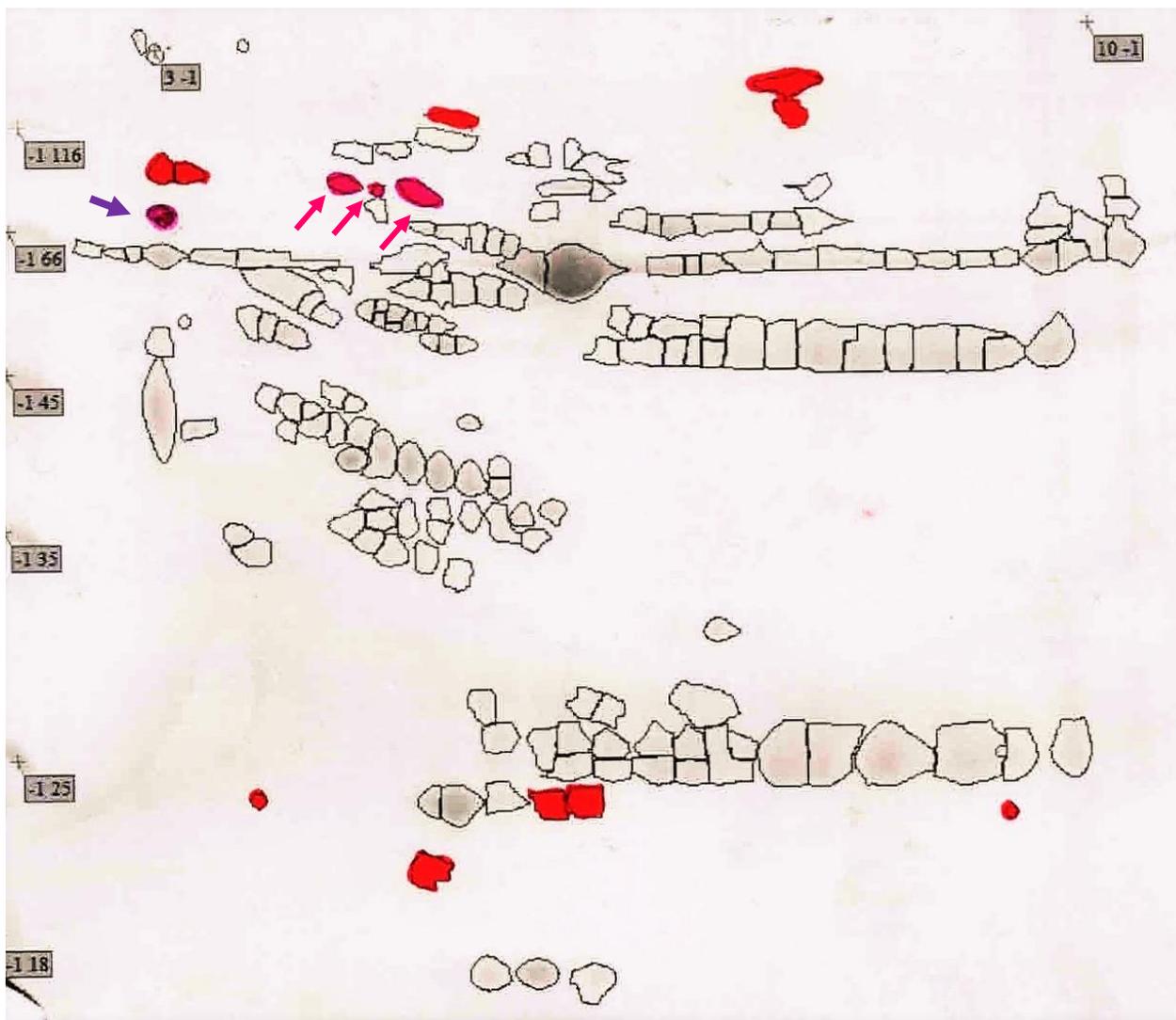


Legenda: a) Em azul pontos de proteínas presentes exclusivamente no *pool* de soro do grupo controle.

b) Em amarelo pontos presentes nos *pools* de soro do controle e dos pacientes indeterminados.

c) Flecha roxa ponto expresso pelos *pools* do controle e dos pacientes CCC.

FIGURA 5 - IMAGEM DIGITALIZADA DO GEL SDS-PAGE BIDIMENSIONAL DO POOL DE SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS COM A FORMA CARDÍACA DA DOENÇA.

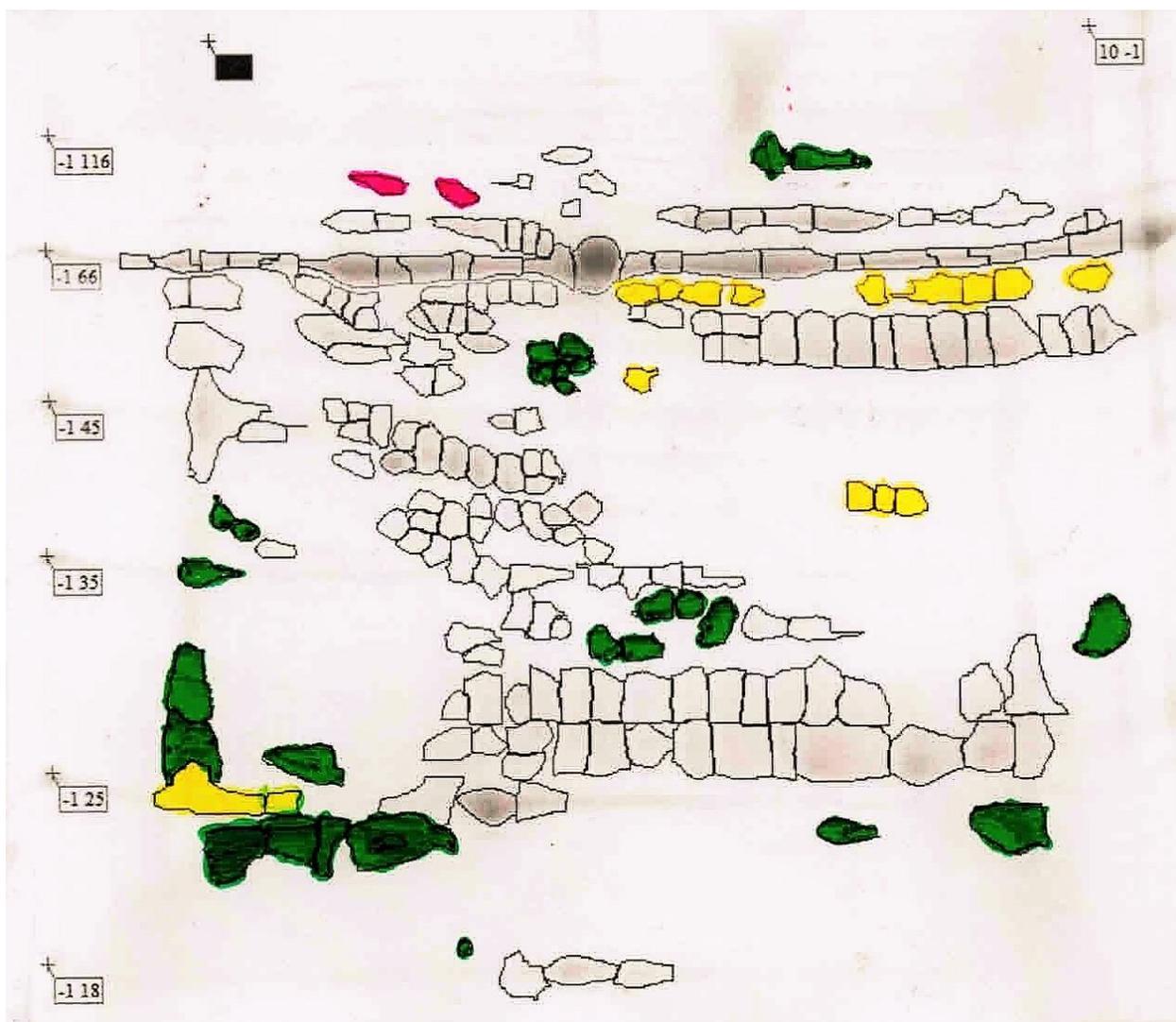


Legenda: a) Em vermelho pontos presentes exclusivamente no *pool* de soro dos pacientes chagásicos crônicos cardíacos.

b) Em roxo (flecha) ponto presente nos *pools* de soro do controle e pacientes chagásicos crônicos cardíacos

c) Em rosa (flechas) pontos presentes nos *pools* de soro dos pacientes CCC e indeterminados.

FIGURA 6 - IMAGEM DIGITALIZADA DO GEL SDS-PAGE BIDIMENSIONAL DO POOL DE SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS COM A FORMA INDETERMINADA DA DOENÇA.



- Legenda:
- a) Em verde pontos presentes somente no *pool* de soro de pacientes chagásicos crônicos indeterminados.
 - b) Em amarelo pontos presentes nos *pools* de soro do controle e pacientes chagásicos crônicos indeterminados.
 - c) Em rosa pontos presentes nos *pools* de soro de pacientes chagásicos crônicos indeterminados e cardíacos.

Diversos estudos têm investigado o perfil de proteínas expressas no soro, plasma e tecidos de indivíduos em condição de doença e em indivíduos saudáveis (GOLLAPALLI et al., 2012; RANI et al., 2014; YAO et al., 2015).

Nesse contexto, buscando biomarcadores para o diagnóstico precoce da Síndrome de Down, YAO et al. (2015) encontraram 29 proteínas marcadoras potenciais no soro de gestantes com fetos afetados pela doença, bem como, RANI et al. (2014) encontraram uma expressão proteica diferenciada em pacientes com granulomatose com poliangite e em pacientes que apresentavam remissão da doença.

Apesar da grande variabilidade técnica dos estudos, o padrão de separação de proteínas de soro de controles relatados assemelha-se com o padrão observado no grupo controle deste trabalho. Spots característicos presentes nas imagens dos géis dos grupos controle destas outras pesquisas proteômicas coincidem com os spots apresentados no padrão do gel do grupo controle desse estudo (dados não mostrados).

Diante dos resultados obtidos neste estudo, faz-se necessária uma investigação mais profunda, de maneira a garantir a reprodutibilidade dos padrões utilizando um número maior de pacientes com análises em diferentes géis devido a alta complexidade da DC. Também se faz necessária a identificação dessas proteínas que foram expressas de maneira diferenciada por meio de técnicas mais adequadas para tal finalidade, tais como, plataformas de espectrometria de massas, como por exemplo MALDI-TOF, uma vez que a identificação de possíveis biomarcadores proteicos que possam ser úteis como marcadores de diagnóstico ou prognóstico da DC crônica iria contribuir significativamente para um melhor acompanhamento dos pacientes e do curso da doença e suas manifestações secundárias.

5.2 Metabolômica

5.2.1 Obtenção dos espectros de massas

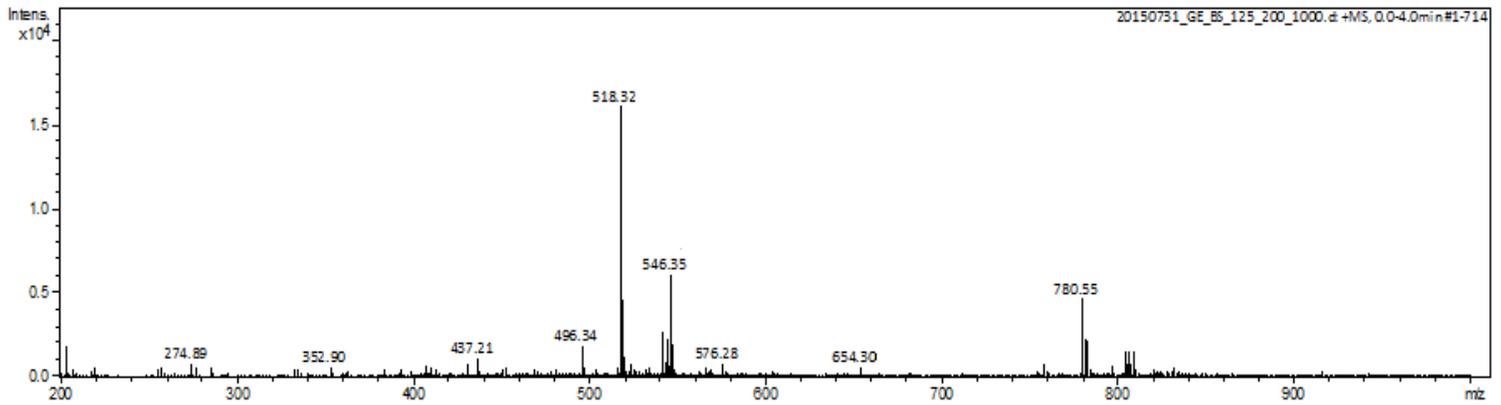
A espectrometria de massas é uma técnica que possui boa capacidade de resolução de amostras biológicas complexas com alta sensibilidade, seletividade e robustez. Essa abordagem foi utilizada para analisar a composição iônica nas amostras de soro de indivíduos sem DC e com diferentes formas clínicas de DC crônica. Após o processo de depleção de proteínas de alto peso molecular, análises por infusão direta por espectrometria de massas foram realizadas com 23 amostras de soro de indivíduos controles e 26 de pacientes com a forma cardíaca e 33 com a forma indeterminada da DC. Sendo que, para cada amostra um espectro de massas foi adquirido.

Os resultados obtidos demonstraram diferenças na composição e/ou intensidade de íons entre os grupos controles, chagásicos cardíacos e chagásicos indeterminados na faixa analisada (200 a 1000 Da), figuras 7-9.

Devido a complexidade e intensa variação biológica das amostras, análises visuais comprometem a fidedignidade das afirmações referentes a tais resultados, sendo necessário o uso de técnicas estatísticas que as tornem mais confiáveis. Para tal, foi utilizada a técnica de análise multivariada através da Análise de Componentes Principais (PCA), de maneira a comprimir todas as informações de massas/carga (m/z) e intensidades (%) obtidas nos 82 espectros adquiridos. Dessa maneira, os dados relacionados à massa/carga (m/z) e intensidade (%) dos íons obtidos foram compilados de maneira a formar planilhas.

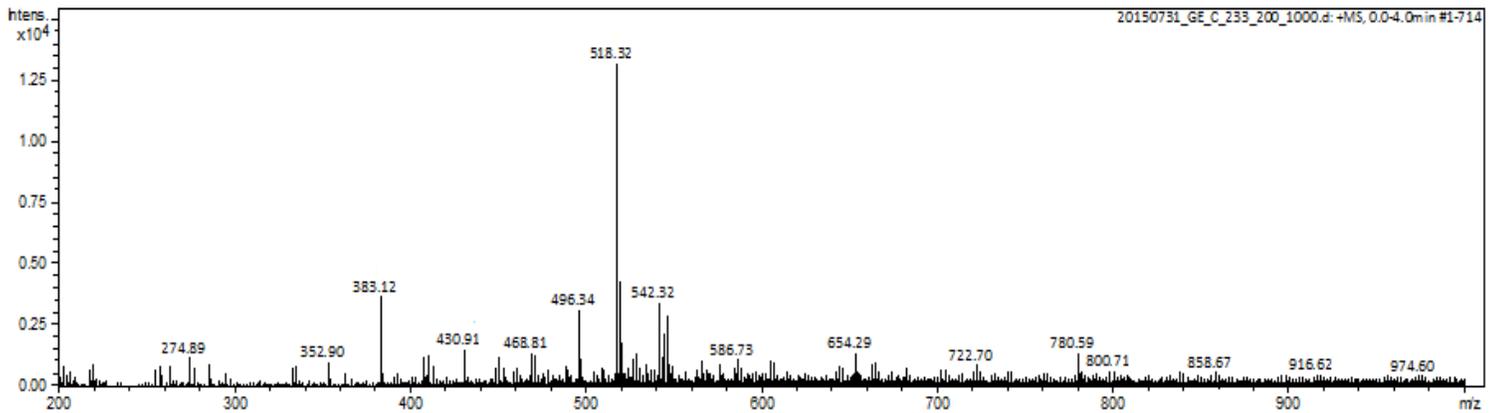
As planilhas construídas foram transferidas para o software Matlab, onde a PCA foi realizada. Para essas análises, os pré-tratamentos de dados autoescalados e dados centrados na média foram analisados, bem como, inúmeras combinações de componentes principais, de maneira a buscar a melhor combinação de fatores para a discriminação dos grupos amostrais. A descrição desses procedimentos será feita com mais detalhes a seguir.

FIGURA 7 - ESPECTRO DE MASSAS ADQUIRIDO DE AMOSTRA DO GRUPO CONTROLE.



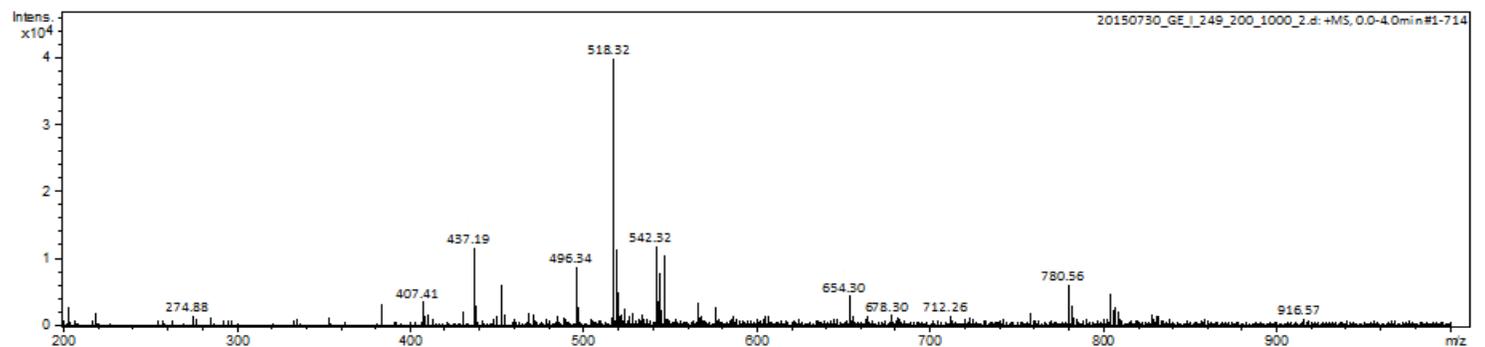
Fonte: O autor (2016)

FIGURA 8 - ESPECTRO DE MASSAS ADQUIRIDO DE AMOSTRA DO GRUPO CHAGÁSICO CARDÍACO.



Fonte: O autor (2016)

FIGURA 9 - ESPECTRO DE MASSAS ADQUIRIDO DE AMOSTRA DO GRUPO CHAGÁSICO INDETERMINADO.



Fonte: O autor (2016)

5.2.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

5.2.2.1 Análise de SCORES

Diferenças entre a escala dos valores e medidas dos dados experimentais podem ocasionar extração e interpretações inadequadas dos dados, sendo necessário o uso de ferramentas de pré-processamento dos dados originais para correção destes problemas. Neste estudo, os valores numéricos de intensidade iônica que compuseram a matriz utilizada na análise discriminatória dos indivíduos não doentes e dos pacientes chagásicos apresentavam uma discrepância relevante (variavam em cerca de 300 vezes do menos para o maior valor de intensidade iônica obtida), dessa forma foi necessário o pré-tratamento dos dados.

Os métodos de pré-processamento mais utilizados aplicáveis para corrigir tais discrepâncias ao tipo de análise aqui realizada envolvem a centralização dos dados na média ou autoescalamento dos dados (FERREIRA et al., 1999). Centrar dados na média consiste em calcular a média dos valores de intensidade para cada pico de massa/carga encontrado e subtraí-la de cada intensidade que compõe a respectiva coluna. Em contrapartida, autoescalar os dados consiste em centrar os dados na média e dividi-los pelo respectivo desvio padrão, sendo um para cada pico de massa/carga que compõe a matriz de dados (FERREIRA et al., 1999).

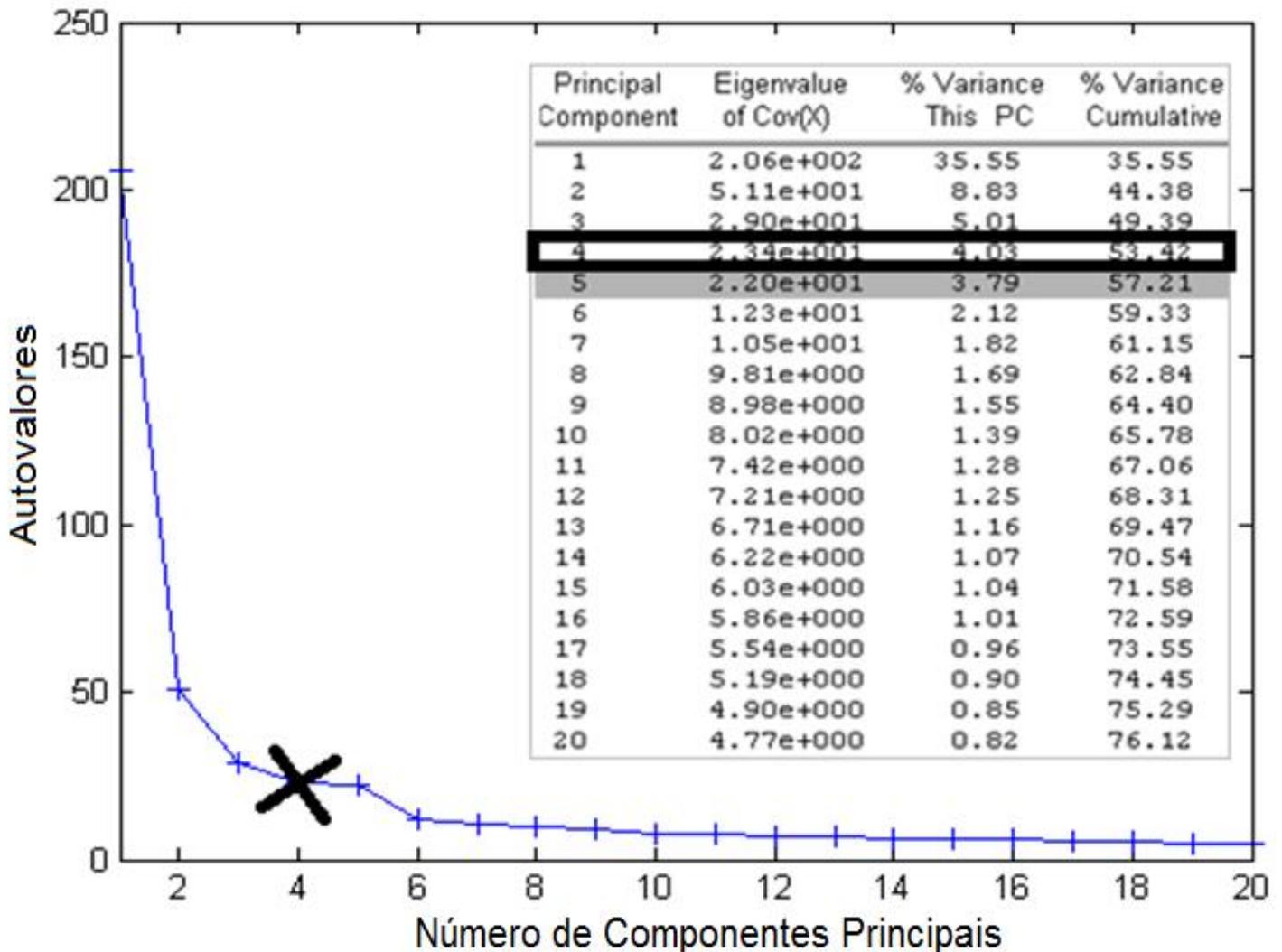
Dos dois pré-tratamentos testados, aquele que apresentou melhores resultados foi o autoescalamento dos dados, o que permitiu que a dispersão das amostras fosse reduzida e seu agrupamento pudesse ser visualizado com melhor nitidez.

A escolha do número de componentes principais a serem analisadas foi baseada pelo gráfico de *AUTOVALORES* (variância acumulada explicada) versus número de CPs (Gráfico 1), e a componente escolhida foi aquela cuja sequente componente não apresenta aumento significativo de variância total explicada, a partir da CPs onde o gráfico inicia um platô.

A exemplo do exposto, o gráfico 1 mostra que 20 componentes principais foram construídas para explicar a quase totalidade da variância dos dados originais, mas a partir

da quarta componente não há acréscimo significativo da variância acumulada dos dados. Portanto, para a análise da separação dos grupos controle e de pacientes chagásicos, segundo o critério supracitado, a escolha foi utilizar 4 componentes principais, que explicam 53,42% da variância dos dados originais (Gráfico 1).

GRÁFICO 1 - GRÁFICO DE AUTOVALORES PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS A SER UTILIZADA NA SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE E DOS PACIENTES CHAGÁSICOS.

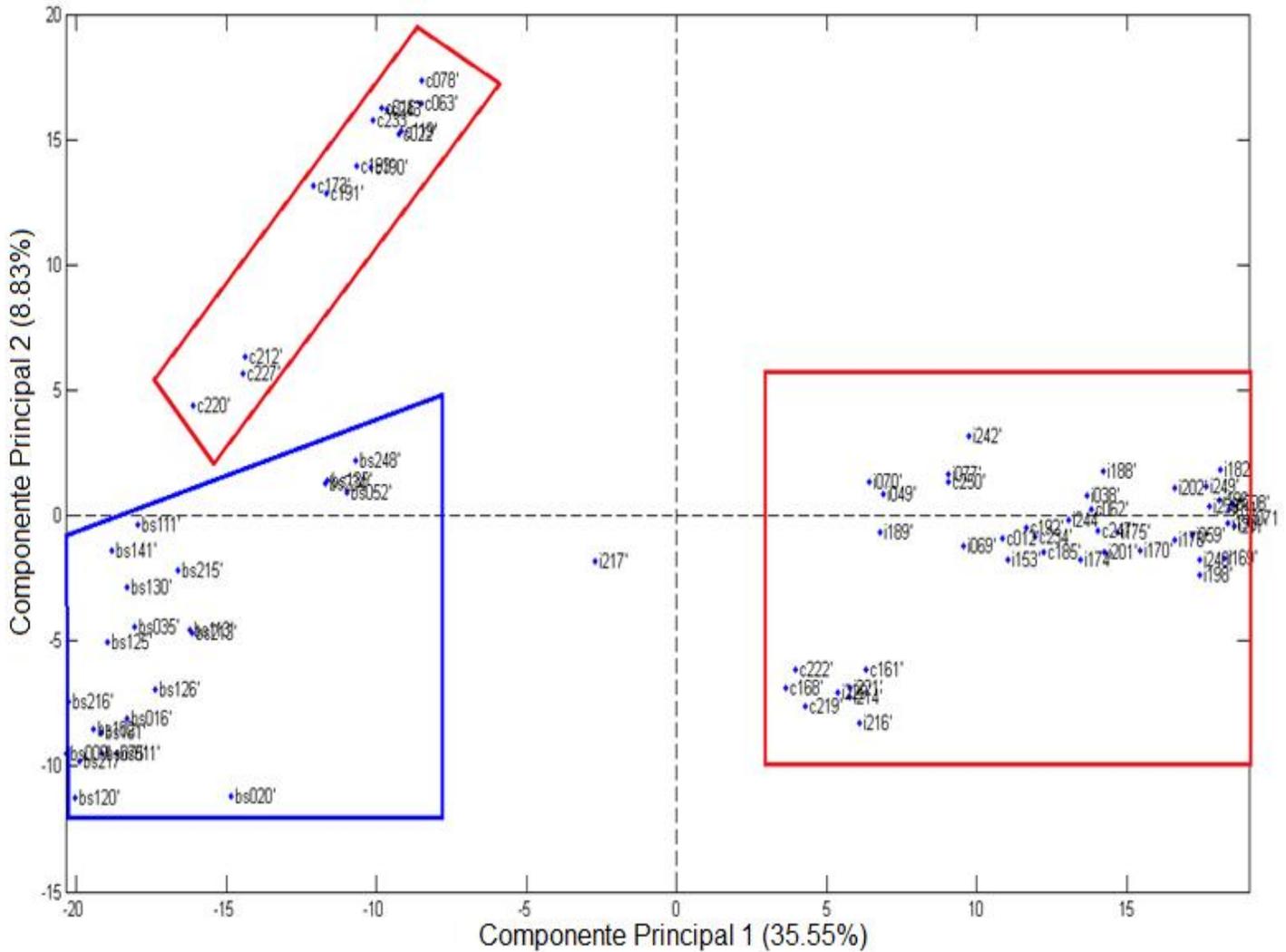


Após a escolha do número de CPs, gráficos de *SCORES* foram construídos, visando observar a localização das amostras dos indivíduos pertencentes ao grupo controle e pacientes chagásicos crônicos e a possibilidade de diferenciação dos grupos.

Conforme o gráfico de *SCORES* (gráfico 2), a primeira componente principal responde por cerca de 35,5% da variância dos dados, e a segunda componente principal por 8,8% da variância. Juntas, as componentes principais 1 e 2 respondem a cerca de 44% da variância de todos os dados resultantes da espectrometria de massas.

Analisando a partir do princípio de que amostras com scores semelhantes possuem características semelhantes e amostras com scores diferentes possuem características diferentes, as localizações das amostras apresentadas por esse gráfico permitem dizer que há diferenças e/ou similaridades nas composições iônicas presentes no soro dos pacientes portadores da DC crônica e dos indivíduos controles, os quais comprovadamente são soronegativos para a DC, por testes sorológicos realizados pelo banco de sangue da HEMEPAR. Tais diferenças e similaridades iônicas serão discutidas posteriormente na análise de *LOADINGS*.

GRÁFICO 2 - SCORES DE SEPARAÇÃO ENTRE INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE (AZUL) E PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS (VERMELHO).



Legenda: Amostras com inicial "c" pertencem ao grupo chagásico crônico cardíaco.

Amostras com inicial "i" pertencem ao grupo chagásico crônico indeterminado.

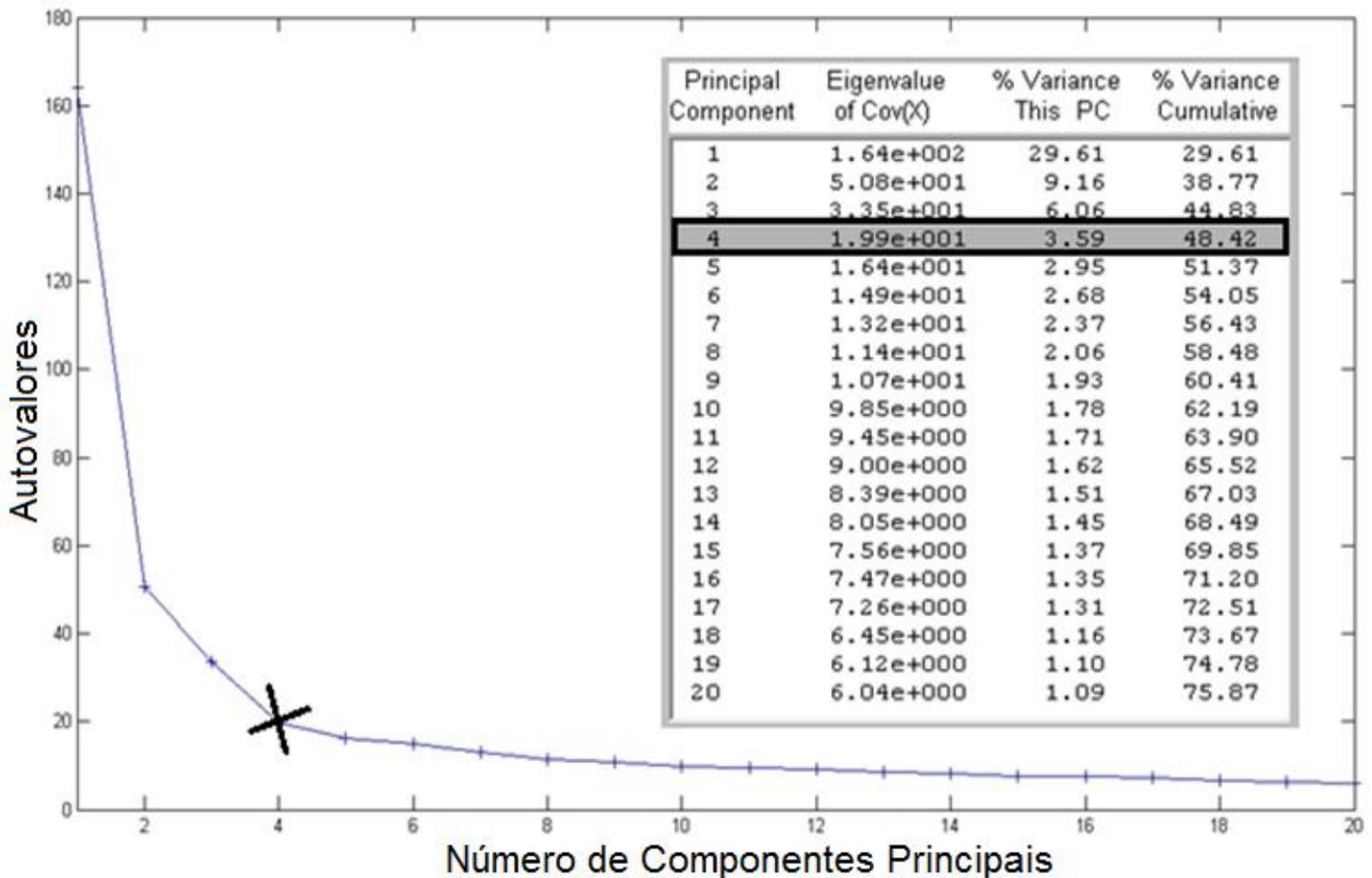
Amostras com iniciais "bs" pertencem ao grupo controle.

Ainda, em uma primeira análise ao gráfico supracitado, já é possível observar a formação de *clusters* (subgrupos) entre pacientes portadores das formas crônicas cardíaca e indeterminada da DC.

Para uma melhor observação entre as possíveis diferenças encontradas entre as diferentes formas clínicas da doença, uma segunda PCA foi realizada. Da mesma maneira

da análise anterior, a escolha do número de componentes principais foi baseada pelo gráfico de *AUTOVALORES versus* número de CPs, sendo escolhido utilizar para análise de componentes principais das amostras de pacientes cardíacos e indeterminados até 4 componentes principais, que explicam 48,42% da variância dos dados originais (Gráfico 3).

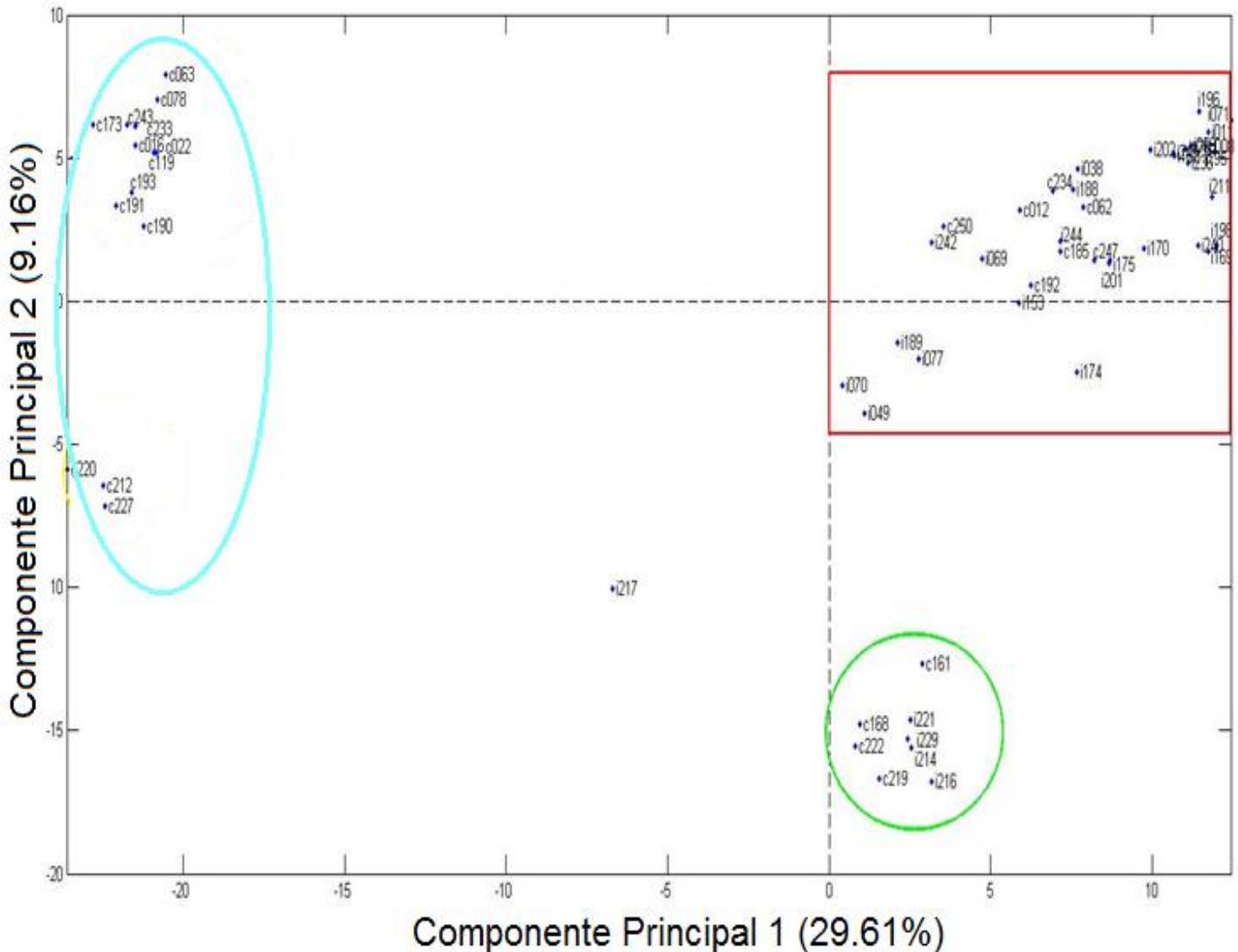
GRÁFICO 3 - GRÁFICO DE AUTOVALORES PARA SELEÇÃO DO NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS A SER UTILIZADA NA SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS.



Na realização do PCA para análise de agrupamento/separação entre pacientes com formas clínicas cardíaca e indeterminada, foi possível observar a formação de um grupo de pacientes chagásicos crônicos cardíacos e dois subgrupos nos quais estão presentes pacientes chagásicos crônicos com as duas formas clínicas: cardíaca e indeterminada. Em um desses grupos “mistos”, predominam os pacientes com a forma

indeterminada (cor vermelha no gráfico 4). No outro grupo misto, o número de pacientes com as diferentes formas clínicas é o mesmo (cor verde no gráfico 4).

GRÁFICO 4- SCORES DE SEPARAÇÃO ENTRE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS CARDÍACOS E INDETERMINADOS.



Legenda: No círculo azul somente pacientes chagásicos crônicos com a forma cardíaca.

No círculo verde e quadrado vermelho encontram-se pacientes chagásicos crônicos cardíacos e indeterminados.

Amostras com inicial "c" pertencem ao grupo chagásico crônico cardíaco.

Amostras com inicial "i" pertencem ao grupo chagásico crônico indeterminado.

As diferenças de localização espacial apresentadas pelas amostras e a formação de tais subgrupos para a mesma forma clínica da doença, indicam que tais amostras com *SCORES* semelhantes/iguais possivelmente possuam perfis iônicos e características clínicas semelhantes/iguais entre si, porém diferentes entre os subgrupos.

5.2.2.2 Análise de *LOADINGS*

Visando observar quais íons poderiam estar fazendo a diferença na separação dos indivíduos do grupo controle e de pacientes chagásicos, gráficos de *LOADINGS* para CP1 e CP2 foram construídos permitindo a visualização do peso atribuído para cada variável na separação (Figura 10).

No gráfico de *SCORES*, anteriormente demonstrado (gráfico 2), é possível observar que as amostras dos indivíduos não doentes se encontram, na sua maioria, concentradas do lado negativo da CP1 e negativo de CP2, sugerindo que os íons responsáveis por essa separação se encontram nesses mesmos lados dos gráficos de *LOADINGS* de CP1 e CP2. Portanto, a busca pelos íons responsáveis pela separação entre os subgrupos foi feita também no lado negativo dos gráficos de *LOADINGS*.

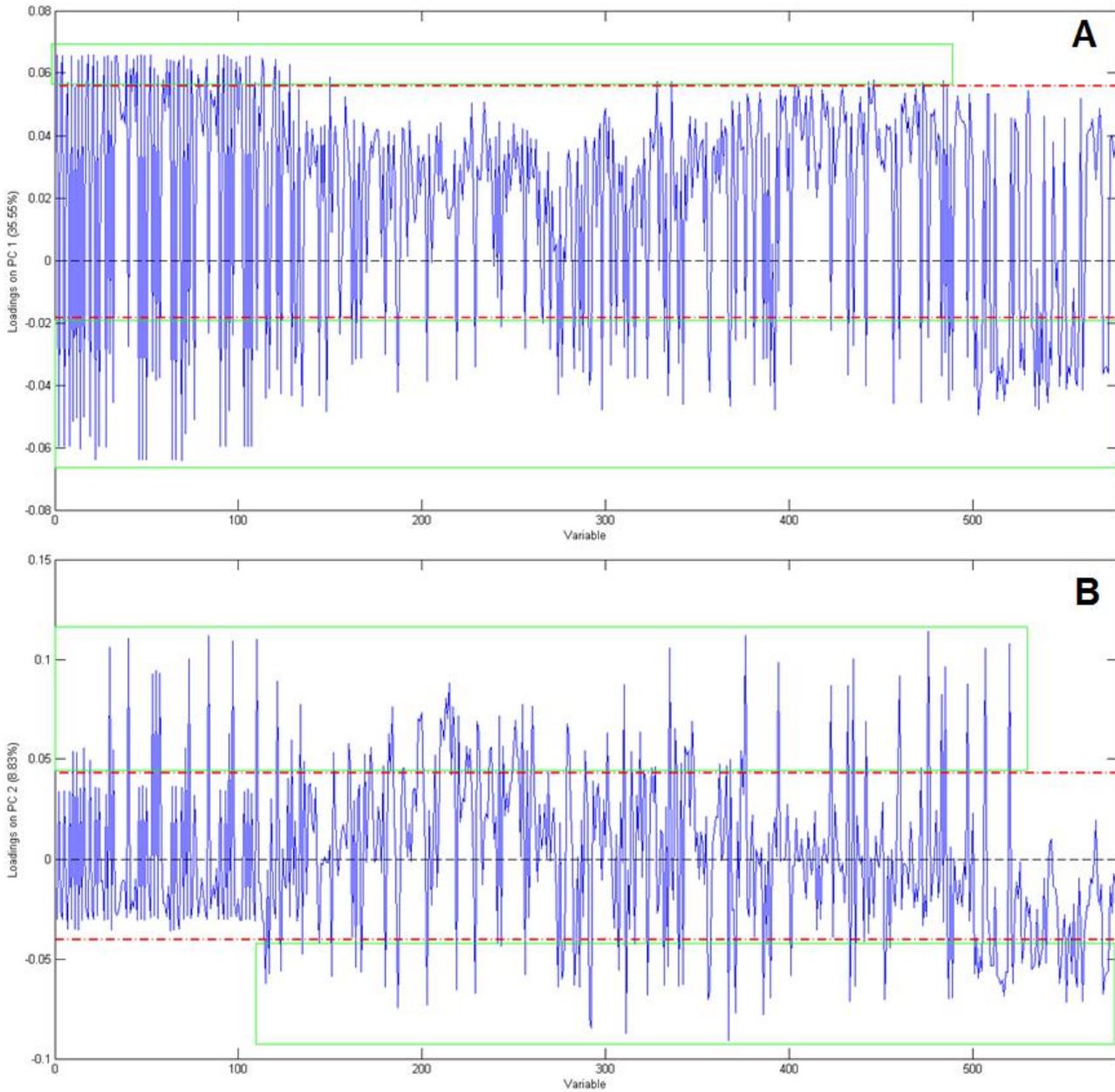
Como é possível observar nos gráficos de *LOADINGS* (figura 10), muitos são os íons responsáveis pela diferenciação desses grupos.

O critério escolhido quais íons seriam considerados potenciais diferenciadores dos grupos foi o de seu valor de *LOADING* ser superior ao desvio padrão calculado de maneira a orientar a busca o máximo possível mais distante das massas/cargas próximas à linha do zero e, posteriormente a verificação destas na matriz de dados original, de maneira a verificar a presença e intensidade destes íons nos espectros correspondentes a cada grupo de amostras.

Dessa maneira, em uma primeira análise, foi possível verificar a ausência de um grande número de íons nas amostras de pacientes com a forma clínica indeterminada, os quais estavam presentes nas amostras de indivíduos do grupo controle e de pacientes

com a forma clínica cardíaca. Conforme pode ser observado no exemplo de alguns íons destacados na figura 11. A tabela 4 lista e complementa estes íons.

FIGURA 10 - GRÁFICOS DE *LOADINGS* DE CP1 E CP2



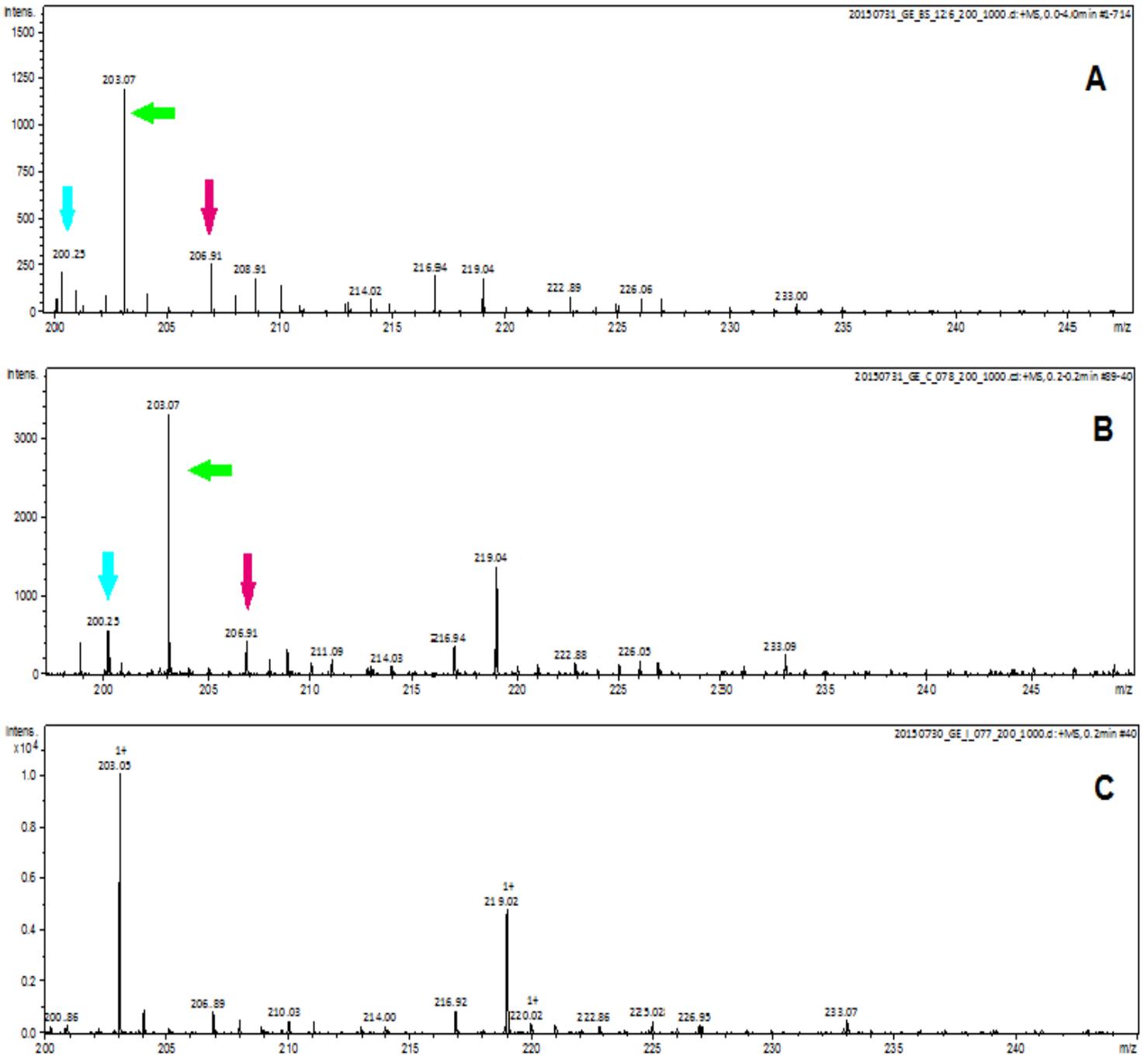
Legenda: As linhas verticais representam as massas/carga resultantes da espectrometria de massas.

Em A, *LOADINGS* para CP1 e em B *LOADINGS* para CP2.

As linhas pontilhadas em vermelho correspondem ao desvio padrão entre os valores máximos e mínimos atribuídos aos *LOADINGS*.

As linhas contidas nos retângulos verdes correspondem as massas/cargas com valores de *LOADINGS* acima do valor do desvio padrão.

FIGURA 11 - ESPECTROS DE MASSAS REPRESENTATIVOS DE CADA GRUPO DE AMOSTRAS.



Legenda: Em A amostra representativa do grupo controle.

Em B do grupo de pacientes chagásicos crônicos cardíacos.

Em C do grupo de pacientes chagásicos crônicos indeterminados.

As flechas azul, verde e cor-de-rosa apontam os íons 205.25 Da, 203.07 Da e 206.91 Da, respectivamente, encontrados exclusivamente nos representantes do grupo controle e pacientes chagásicos crônicos cardíacos.

TABELA 4 - ÍONS AUSENTES NO GRUPO DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS INDETERMINADOS E PRESENTES NOS PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS CARDÍACOS E AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE.

Íon	Peso atribuído ao loading em -PC1
200,25	-0.05959
203,07	-0.06052
206,91	-0.06396
212,83	-0.05948
218,91	-0.05976
256,82	-0.06390
258,81	-0.06396
260,81	-0.06395
276,88	-0.06392
278,88	-0.06392
286,91	-0.06401
334,14	-0.05958
336,83	-0.05964
354,89	-0.05966
362,93	-0.05953
367,12	-0.05967
458,78	-0.04209
807,57	-0.04965
898,59	-0.04678

Também foi observada a ausência de dois íons nas amostras de pacientes chagásicos indeterminados e de pacientes chagásicos cardíacos, porém os mesmos estavam presentes exclusivamente nas amostras do grupo controle, conforme mostra a tabela a seguir (Tabela 5).

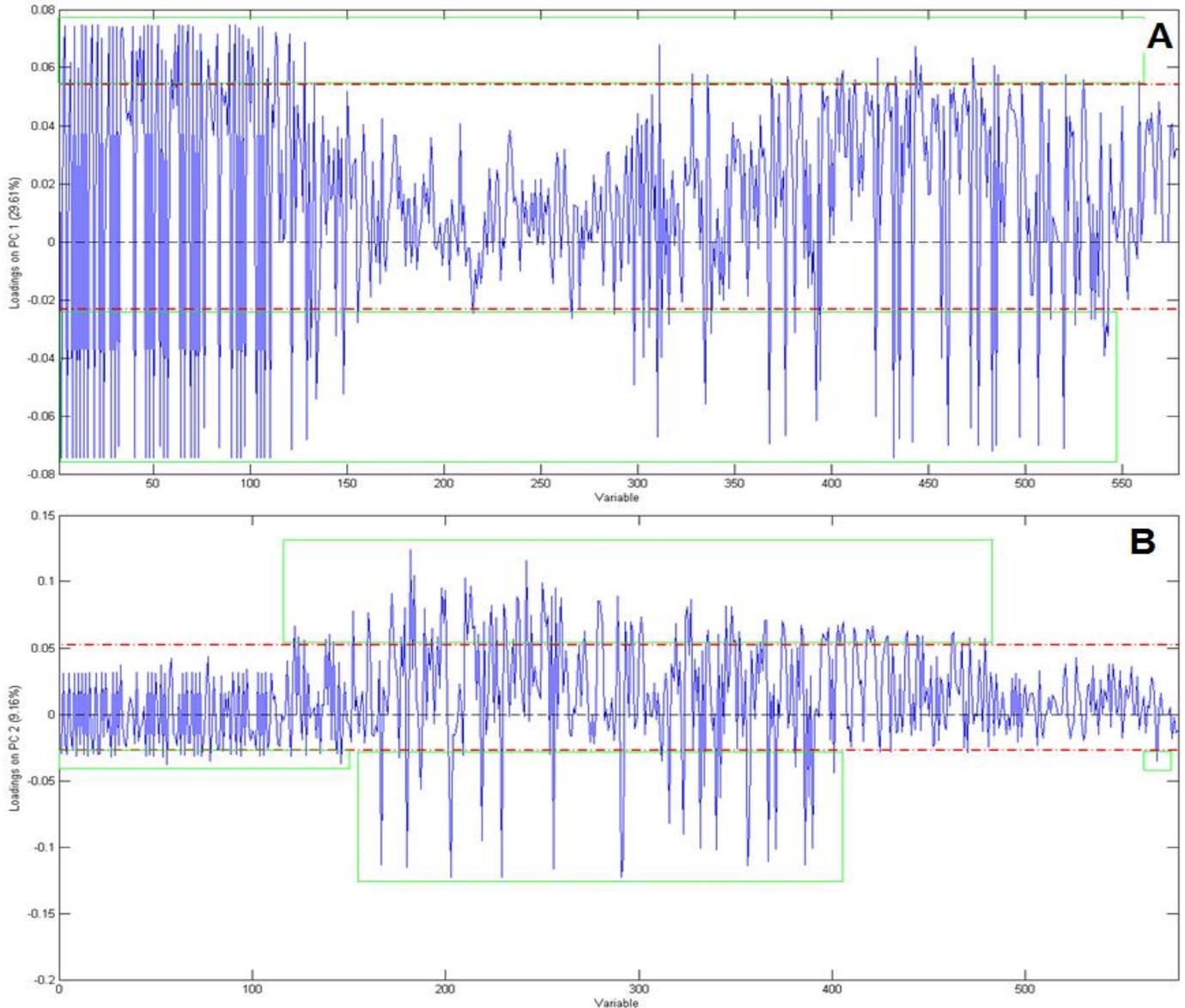
TABELA 5 - ÍONS PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NAS AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE.

Íon	Peso atribuído ao loading em -PC1	Peso atribuído ao loading em -PC2
378,91	-0.04404	-0.06215
787,60	-0.04468	-0.06967

Gráficos de *LOADINGS* para CP1 e CP2 foram construídos para verificar a presença de diferenças iônicas entre os grupos de amostras, e identificar quais íons

poderiam ser responsáveis pela separação entre os pacientes chagásicos crônicos cardíacos e indeterminados (Figura 12).

FIGURA 12 - GRÁFICOS DE *LOADINGS* DE CP1 E CP2 PARA OBSERVAR QUAIS ÍONS PODERIAM SER OS RESPONSÁVEIS PELA SEPARAÇÃO ENTRE OS PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS CARDÍACOS E INDETERMINADOS.



Legenda: As linhas verticais representam as massas/carga resultantes da espectrometria de massas.

Em A *LOADINGS* para CP1 e em B *LOADINGS* para CP2.

As linhas pontilhadas em vermelho correspondem ao desvio padrão entre os valores máximos e mínimos atribuídos aos *LOADINGS*.

As linhas contidas nos retângulos verdes correspondem as massas/cargas com valores de *LOADINGS* acima do valor do desvio padrão.

No gráfico de *SCORES* anteriormente demonstrado (gráfico 4), é possível observar que as amostras dos pacientes chagásicos crônicos cardíacos que não se misturam aos chagásicos indeterminados são separadas por íons que se encontram ao lado negativo da CP1.

Quando verificada a relação da presença/intensidade dos picos na matriz contendo os resultados dos íons adquiridos e suas respectivas intensidades presentes nos espectros de massas, foi possível verificar a ausência de um grande número de íons nas amostras de pacientes com a forma clínica indeterminada (Tabela 6).

Essa observação já havia sido feita anteriormente na análise de *LOADINGS* entre indivíduos do grupo controle e pacientes chagásicos, a exemplo da figura 21 para os íons 200.25 Da, 203.07 Da e 206.91 Da encontrados no espectro B que representa um paciente chagásico crônico cardíaco e ausente em C que representa um paciente chagásico crônico indeterminado. Muitos desses íons se repetem nas duas análises, porém apresentam diferenças de pesos atribuídas pelos *LOADINGS* e conseqüente diferenças de significância em cada análise realizada.

TABELA 6 - ÍONS AUSENTES NO GRUPO DE PACIENTES CHAGÁSICOS INDETERMINADOS E PRESENTES NOS PACIENTES CHAGÁSICOS CARDÍACOS

Íon	Peso atribuído ao <i>loading</i> em -PC1
200,25	-0.07447
200,88	-0.07448
203,07	-0.07447
204,07	-0.07446
206,91	-0.07446
208,91	-0.07445
212,83	-0.07445
218,91	-0.07447
218,93	-0.07445
219,04	-0.07049
226,96	-0.07445
256,82	-0.07448
258,81	-0.07446
260,81	-0.07447

263,10	-0.07447
266,86	-0.07443
276,88	-0.07447
278,88	-0.07446
286,91	-0.07446
286,92	-0.07448
290,86	-0.07446
294,95	-0.06423
314,79	-0.07089
334,14	-0.07446
336,83	-0.07447
336,84	-0.07447
354,89	-0.07448
362,93	-0.07448
367,12	-0.07448
368,87	-0.07444
383,12	-0.07143
594,76	-0.06666
684,80	-0.07003
724,70	-0.07023

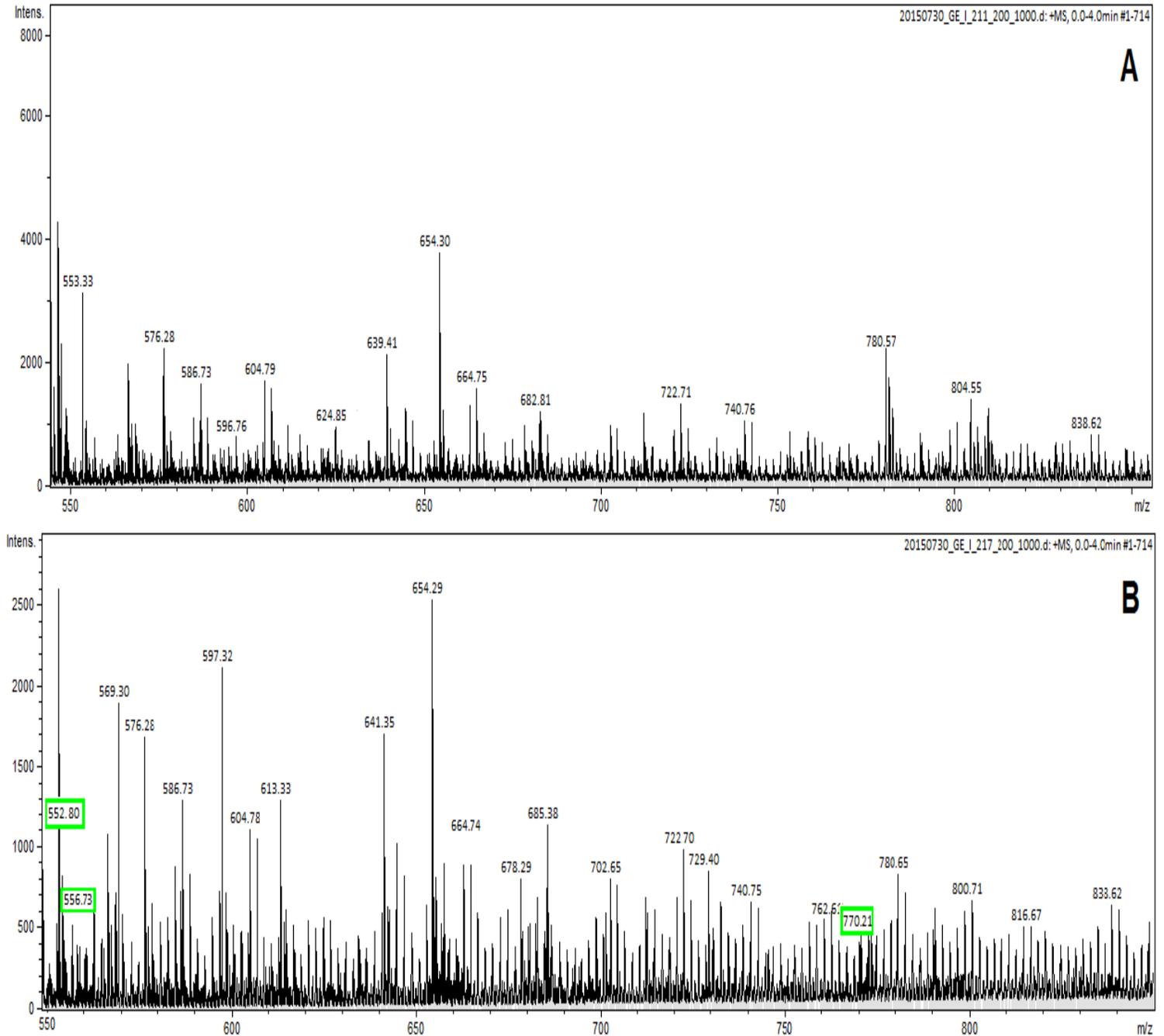
Outra característica observada diz respeito a amostra i217 (Gráfico 4 e Figura 13), de um paciente com a forma indeterminada que não apresenta agrupamento com qualquer outra amostra nos gráficos de *SCORES*. Nenhum dado clínico ou laboratorial se relacionou com esse fato reportado no gráfico de *SCORES*. Porém na análise dos *LOADINGS* e na conferência dos resultados iônicos da MS observou-se que essa amostra possuía uma composição iônica diferenciada dos demais pacientes indeterminados. No soro desse paciente observou-se a presença dos íons 552,8 Da, 556,73 Da e 770,21 Da (Figura 14) e houve ausência dos íons 219,02 Da, 220,03 Da, 226,95 Da, 263,08 Da, 272,79 Da, 342,87 Da, 372,74 Da e 420,89 Da. Tais íons achavam-se ausentes ou presentes unicamente nessa amostra, quando comparados com as amostras do grupo de pacientes indeterminados.

Apesar da diferença iônica encontrada nessa amostra não justificar seu isolamento no gráfico de *SCORES*, uma vez que tais íons também estão presentes em outras amostras dos demais grupos, essa particularidade de composição pode estar relacionada a uma das razões que dificultam análises de amostras biológicas provenientes de estudos

casos-controles, onde não é possível controlar fatores como a variabilidade biológica e os hábitos ambientais dos pacientes. Diferentemente de amostras biológicas provenientes de estudos *in vivo* controlados e randomizados.

Dessa maneira, é possível inferir que tais particularidades iônicas podem estar relacionadas com hábitos alimentares, exposições ambientais, características hormonais ou mesmo fatores genéticos desse indivíduo, uma vez que não consta no prontuário nenhuma informação a respeito de qualquer doença ou característica que o diferencie dos demais pacientes do grupo chagásico indeterminado.

FIGURA 13 - ESPECTRO DE MASSAS DE DUAS AMOSTRAS DO GRUPO DE PACIENTES CHAGÁSICO CRÔNICOS INDETERMINADO AMPLIADO PARA A REGIÃO DE 550 A 820 DA.



Legenda: Em A amostra i211 (representativa das amostras de pacientes com a forma indeterminada que foram incluídos em algum subgrupo)

Em B amostra i217.

Destacado em verde os íons exclusivos da amostra i217.

Também nas amostras do grupo que incluía tanto pacientes cardíacos como indeterminados - (c161, c168, c219, c222, i214, i216, i221, i229)-. círculo verde do gráfico 4 – observou-se um padrão diferente de íons, com presença exclusiva de 458,78 Da, 547,85 Da, 607,38 Da, 610,76 Da, 630,81 Da e 636,40 Da, conforme tabela 7.

TABELA 7 - ÍONS PRESENTES SOMENTE NOS PACIENTES DO SUBGRUPO EM VERDE DO GRÁFICO 4.

Íon	Amostras do subgrupo
458,78	c168 e c222
547,85	c219 e c222
607,38	c161, c168, c219, c222, i216
610,76	c161, c168, c219, i216
630,81	c161, c168, c219, c222, i216, i221, i229
636,40	i214, i216, i221, i229

A partir dos resultados obtidos pela análise de *LOADINGS* e a sugestão de algumas massas/cargas consideradas relevantes na separação dos grupos controle e pacientes, incluindo os subgrupos de pacientes cardíacos e indeterminados, o próximo passo a ser tomado seria a identificação desses compostos e possível validação dos mesmos como biomarcadores.

Todavia, até o presente momento não foi possível a sua identificação, pois para isso faz-se necessário o uso de técnicas que revelem informações mais precisas, robustas e de mais alta resolução, tais como espectrometria de massas acopladas a técnicas cromatográficas como cromatografia líquida e/ou cromatografia gasosa.

Diversos trabalhos utilizando técnicas de proteômica e metabolômica têm sido realizados na investigação da DC. NDAO et al. realizaram em 2010 um estudo visando procurar marcadores diagnósticos no soro de indivíduos chagásicos assintomáticos utilizando MS. O objetivo principal era diminuir a problemática de resultados falsos

positivos e negativos nos exames realizados em bancos de sangue. Segundo os autores, uma revisão em 16 bancos de sangue na América Latina, entre os anos de 1997 e 2000, revelaram que houve entre 0,7 e 3,7% de resultados sorológicos falso negativos e 0,3 a 3,2% de falsos positivos nestes locais, justificando assim a busca de um biomarcador diagnóstico mais eficiente para a DC. Os autores identificaram proteínas truncadas que poderiam atuar de maneira valiosa como biomarcadores, algumas delas derivam da Apolipoproteína A1, com tamanhos moleculares de 9,3 kDa, 10,1kDa, 13,6 kDa e 24,7 kDa. Outras foram identificadas como proteína truncada derivada da fibronectina com massa molecular de 28,9 kDa, e derivada de C3a desArg, com massa molecular de 8,1 kDa.

Seguindo a mesma linha de pesquisa de biomarcadores por MS, Wen; Garg (2012) e Dhiman *et al.* (2008) buscaram identificar proteínas, suas isoformas e modificações estruturais que pudessem atuar como biomarcadores durante a progressão da doença e ocorridas em especial no desenvolvimento da CCC. Os autores observaram alterações nos níveis proteicos associados ao estresse oxidativo que afetavam os níveis de expressão de proteínas associadas a processos de inflamação e transporte durante o curso da infecção pelo *T. cruzi*. Tal fato ocorrendo de maneira diferenciada nas fases aguda e crônica da DC. Os autores enfatizam a necessidade de identificar marcadores capazes de classificar os estágios da doença bem como, de identificar indivíduos assintomáticos com maior risco para o desenvolvimento de CCC.

Em relação a estudos metabolômicos na DC, este é o primeiro trabalho realizado em pacientes chagásicos crônicos. Recentemente, (GIRONÈS et al., 2014) induziram a doença em modelo experimental *in vivo* e estudaram o perfil metabólico no tecido cardíaco e no plasma desses animais durante a fase aguda da doença. Os autores realizaram análises bioquímicas e metabolômicas em extrato do tecido cardíaco e plasma dos animais. Para a análise metabolômica, utilizaram algumas metodologias de MS e análise de componentes principais (PCA), com identificação de mudanças moleculares e vias metabólicas.

O grande número de alterações metabólicas encontrado no modelo experimental sugeriu que essas mudanças são consequência de condições de estresse cardíaco relacionado ao aumento da glicólise, de danos ocasionados na cadeia respiratória

mitocondrial, acumulação de lipídeos, formação de ácido úrico e produção de radicais livres de oxigênio. Dentre as alterações, os autores destacam ainda elevação de sulfato de p-cresol, metabólito resultante do metabolismo da tirosina e fenilalanina; kinurenina, resultante do metabolismo de triptofano; e alantoína, produto do metabolismo de nucleotídeos, como possíveis biomarcadores para a DC.

Apesar das pesquisas metabolômicas nos pacientes chagásicos e no modelo experimental citado anteriormente terem utilizado plasma e soro sanguíneo, não foi encontrada similaridade nas massas moleculares identificadas em ambos os trabalhos.

Tal discrepância pode ser explicada em virtude das diferentes técnicas utilizadas, bem como, o *range* de massa pesquisado. Além disso, o trabalho de (GIRONÈS et al., 2014) trabalhou com modelos experimentais de fase aguda da DC, e o presente trabalho foi realizado em pacientes com DC na fase crônica.

Considerando-se a DC um problema de saúde pública, que afeta principalmente indivíduos em países em desenvolvimento, e que apresenta sintomas progressivamente limitantes para os pacientes com comprometimento de diversos órgãos, torna-se imprescindível estudos de biomarcadores que possam contribuir para melhor entendimento da fisiopatologia da doença como também manejo clínico, visando melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

A continuidade da busca de marcadores que possam diagnosticar a DC de maneira a reduzir o número de falsos positivos e falsos negativos em bancos de sangue beneficiando a médio e longo prazo o controle de novos casos por transmissão não vetorial, bem como, a identificação de marcadores prognósticos de desenvolvimento das formas mais graves da doença torna-se imprescindível para melhor controle da doença e condutas de saúde pública.

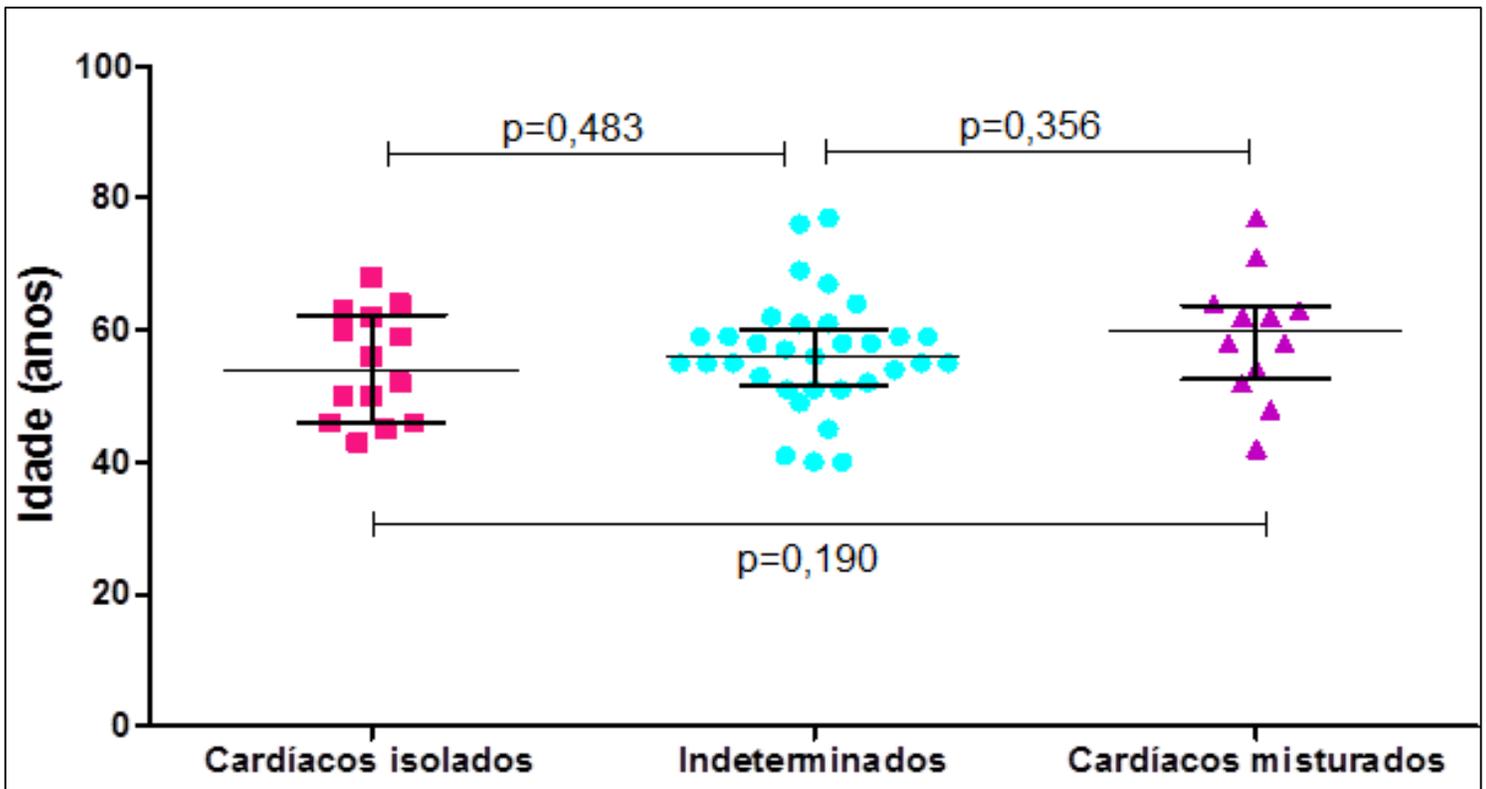
5.2.2.3 Análise de associação de parâmetros clínicos e laboratoriais entre os subgrupos formados no PCA.

Com o objetivo de avaliar se variáveis clínicas, laboratoriais e demográficas estariam associadas e poderiam diferenciar os padrões observados (gráfico 4), foi realizada uma análise de associação. Essa incluiu as variáveis: idade, fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), dosagem de colesterol, triglicerídeos, colesterol-LDL, colesterol-HDL, hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2 e obesidade. Sendo que esses dados foram levantados através do prontuário médico e os dados utilizados foram referentes ao ano da coleta das amostras.

As análises levaram em conta os seguintes grupos: “cardíacos isolados” (amostras incluídas no grupo azul do gráfico 4), “indeterminados” (amostras de pacientes com a forma clínica indeterminada incluídos dos subgrupos vermelho e verde do gráfico 4) e “cardíacos mistos” (amostras de pacientes com a forma clínica cardíaca incluídos nos subgrupos vermelho e verde do gráfico 4).

A primeira análise realizada foi relacionada aos dados de idade dos pacientes, de maneira a responder a hipótese de que pacientes mais idosos seriam mais propensos a desenvolver a forma cardíaca da doença ou de evoluir para a mesma. Ainda, pacientes com a forma cardíaca alocados isoladamente poderiam ter uma idade e/ maior do que aqueles com a forma cardíaca incluídos no mesmo subgrupo dos pacientes com a forma indeterminada. Porém os resultados das análises não mostraram diferença significativa entre os grupos para ambas as variáveis, idade e tempo de evolução da doença (Gráfico 5).

GRÁFICO 5- ANÁLISE DA "IDADE" ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS SEPARADOS NO PCA.



Nota: Barra central referente a mediana.

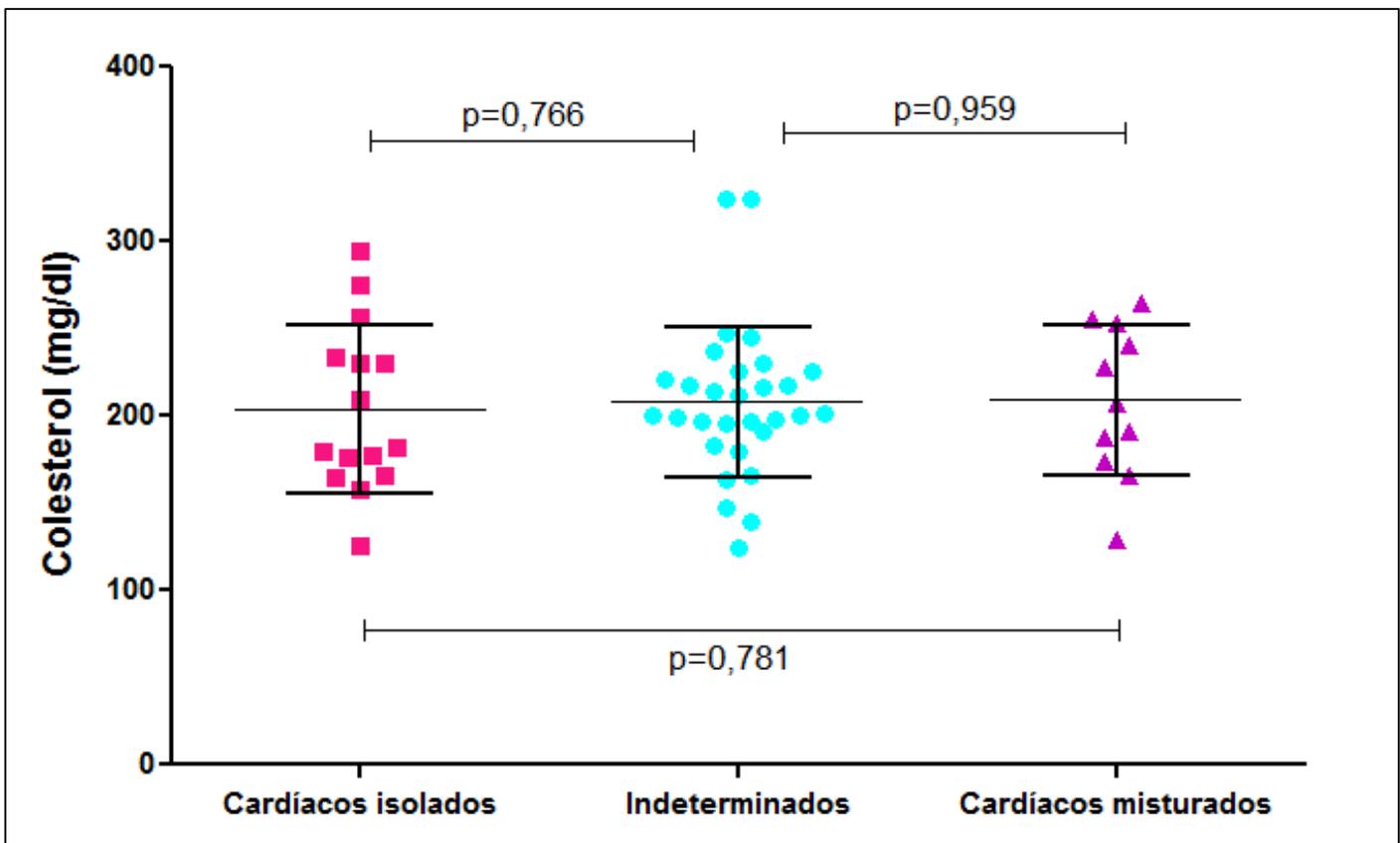
Barras das extremidades referentes aos intervalos interquartis.

As análises referentes ao perfil lipídico dos pacientes não demonstraram diferença significativa entre os grupos. As dosagens de colesterol total, triglicerídeos, colesterol-HDL e colesterol-LDL apresentaram valores de $p > 0,05$, conforme mostram os gráficos 6-9, respectivamente. O perfil lipídico é feito periodicamente nesses pacientes. Os mecanismos de invasão tecidual e evasão imune pelo parasito, bem como, sua presença nos tecidos altera os processos metabólicos celulares, incluindo o metabolismo lipídico.

Os processos utilizados pelo parasito para invasão tecidual e evasão imune envolvem uma série de moléculas de características lipoproteicas e glicoproteicas, como moléculas de superfície, que muitas vezes lhes servem como âncoras de adesão, como mucinas, transialidases e glicofosfatidilinositol. Tais processos ativam uma série moléculas de sinalização e conseqüentemente diversas rotas bioquímicas responsáveis pelo metabolismo celular (EPTING et al., 2010; OSORIO et al., 2012; TORRECILHAS et

al., 2012; BARRIAS et al., 2013). O *T. cruzi* ainda é capaz de produzir muitos lipídios bioativos, como tromboxano A e a prostaglandina F₂α, capazes de promover constrição vascular e agregação plaquetária, um dos mecanismos iniciais para o desenvolvimento da doença cardíaca, bem como, interferir na geração de ATP mitocondrial e reduzir os níveis de superóxido dismutase, que possui papel protetivo nos mecanismos de defesa antioxidantes das células (BONNEY; ENGMAN, 2015). Embora, pacientes cardíacos poderiam ter maiores alterações no perfil lipídico do que pacientes indeterminados, a análise estatística das dosagens desses parâmetros bioquímicos não demonstrou que as separações dos grupos observadas no gráfico de SCORES estariam relacionadas ao perfil lipídico dos pacientes.

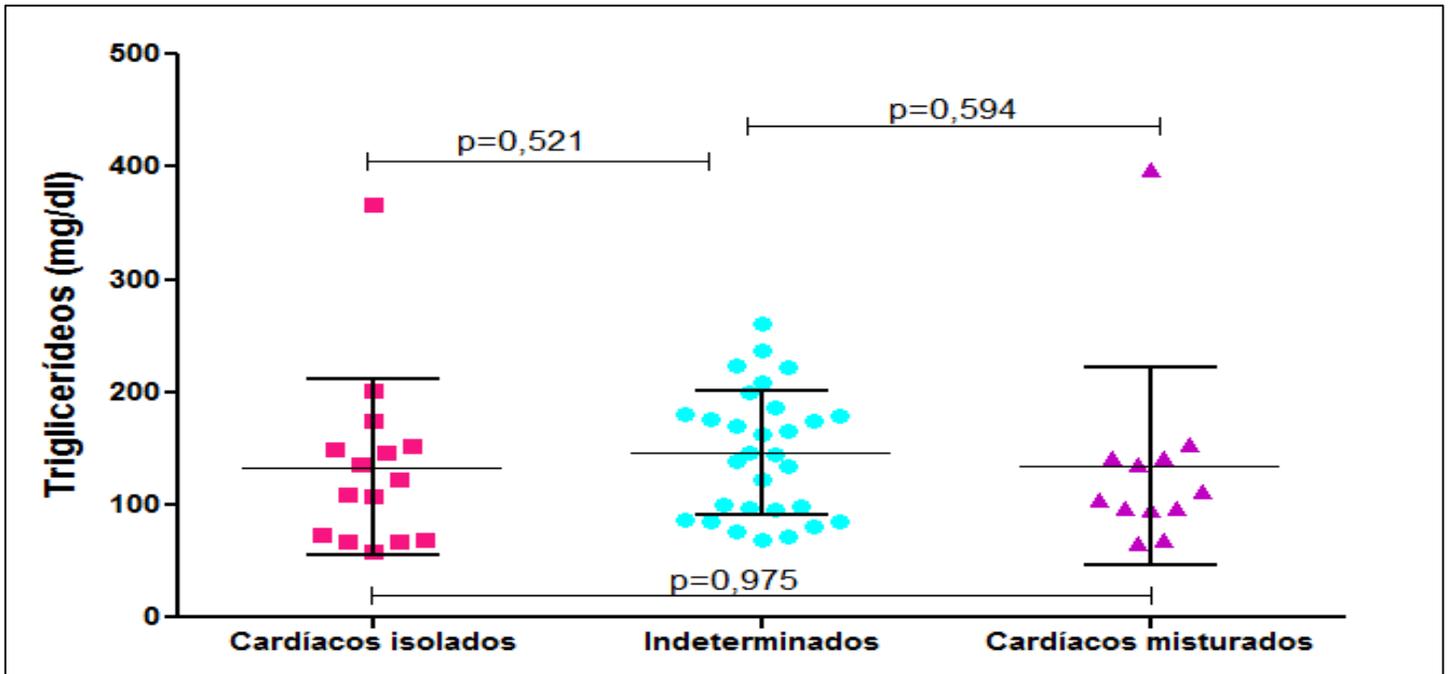
GRÁFICO 6 - DOSAGENS DE COLESTEROL TOTAL ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS SEPARADOS NO PCA.



Nota: Barra central referente a média

Barras das extremidades referentes aos intervalos interquartis.

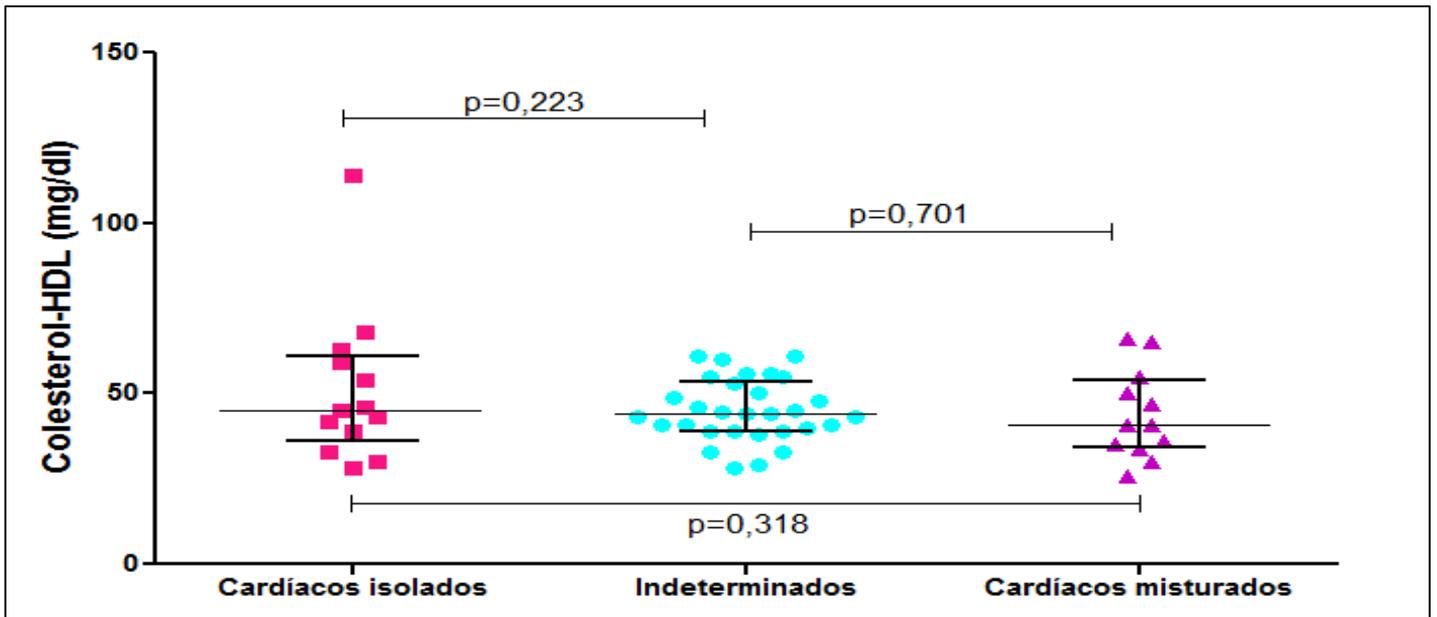
GRÁFICO 7- DOSAGENS DE TRIGLICERÍDEOS TOTAL ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS SEPARADOS NO PCA.



Nota: Barra central referente a média

Barras das extremidades referentes aos intervalos interquartis.

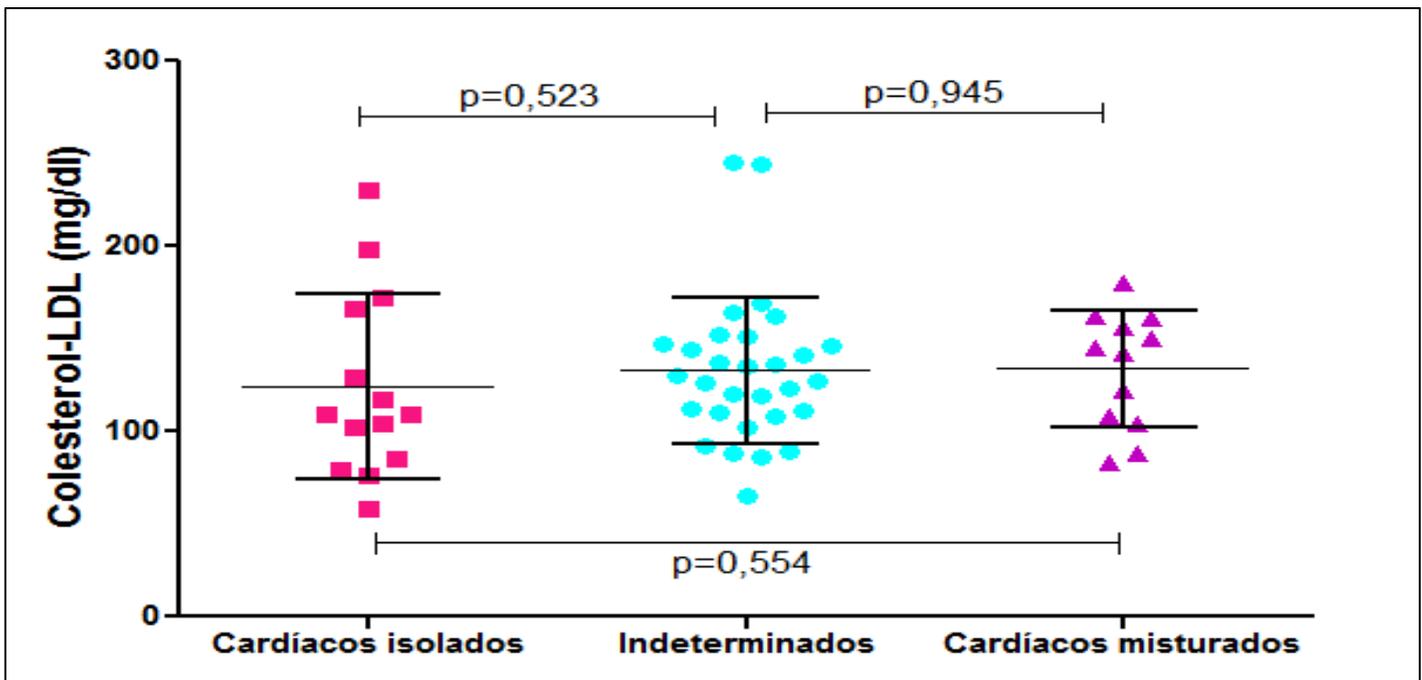
GRÁFICO 8- DOSAGENS DE COLESTEROL-HDL ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS SEPARADOS NO PCA.



Nota: Barra central referente a mediana.

Barras das extremidades referentes aos intervalos interquartis.

GRÁFICO 9- DOSAGENS DE COLESTEROL-LDL ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS SEPARADOS NO PCA.



Nota: Barra central referente a média

Barras das extremidades referentes aos intervalos interquartis.

Outras análises incluíram a frequência de doenças metabólicas nos diferentes subgrupos, tais como hipertensão arterial, diabetes mellitus e obesidade. A DC pode levar a mudanças metabólicas causadas pelos processos de adesão, invasão e evasão do parasito nas células, que provoca uma série de modificações nas rotas metabólicas celulares.

Os resultados demonstraram uma diferença estatisticamente significativa da hipertensão arterial entre os grupos cardíacos isolados e cardíacos mistos ($p=0,044$). Essa significância estatística foi mantida após correção para as variáveis idade e FEVE, através de regressão logística multivariada). Como pode-se observar no gráfico 10, a hipertensão foi mais comum entre os pacientes com a forma cardíaca incluídos nos subgrupos junto com pacientes indeterminados do que os cardíacos isolados.

Embora a diabetes mellitus leve a um comprometimento do sistema circulatório e ainda estudos em ratos diabéticos terem demonstrado que a associação da doença com

a presença do parasito causa uma maior mortalidade que em ratos não diabéticos infectados pelo *T. cruzi* (TÁVORA et al., 1999), não houve associação entre a presença de diabetes mellitus com os grupos separados pela PCA.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à presença de diabetes mellitus (gráfico 11). Devido o número de amostras dos grupos, somente foi possível aplicar análise estatística entre os grupos cardíacos mistos e indeterminados.

GRÁFICO 10 - PRESENÇA E AUSÊNCIA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS SEPARADOS NO PCA.

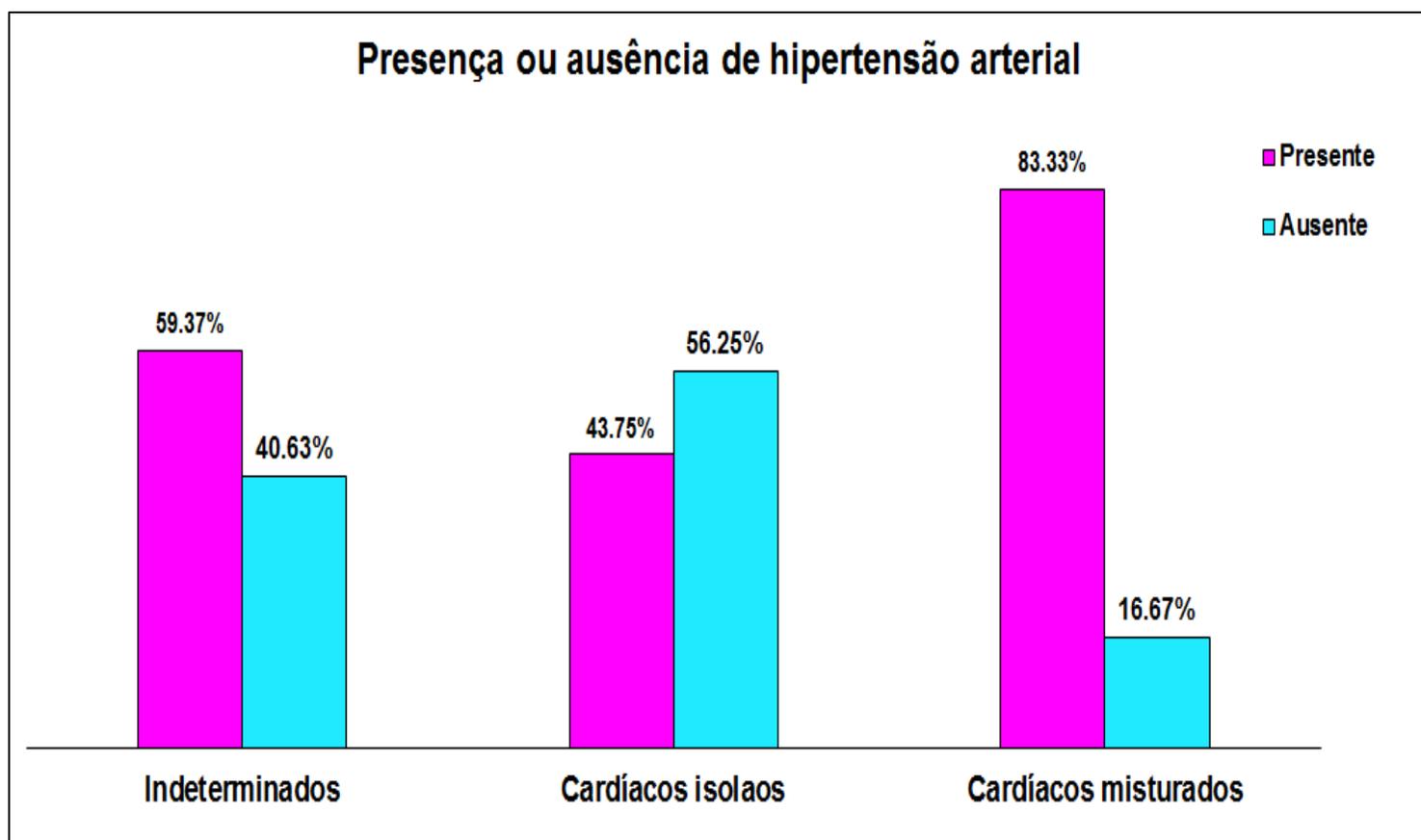
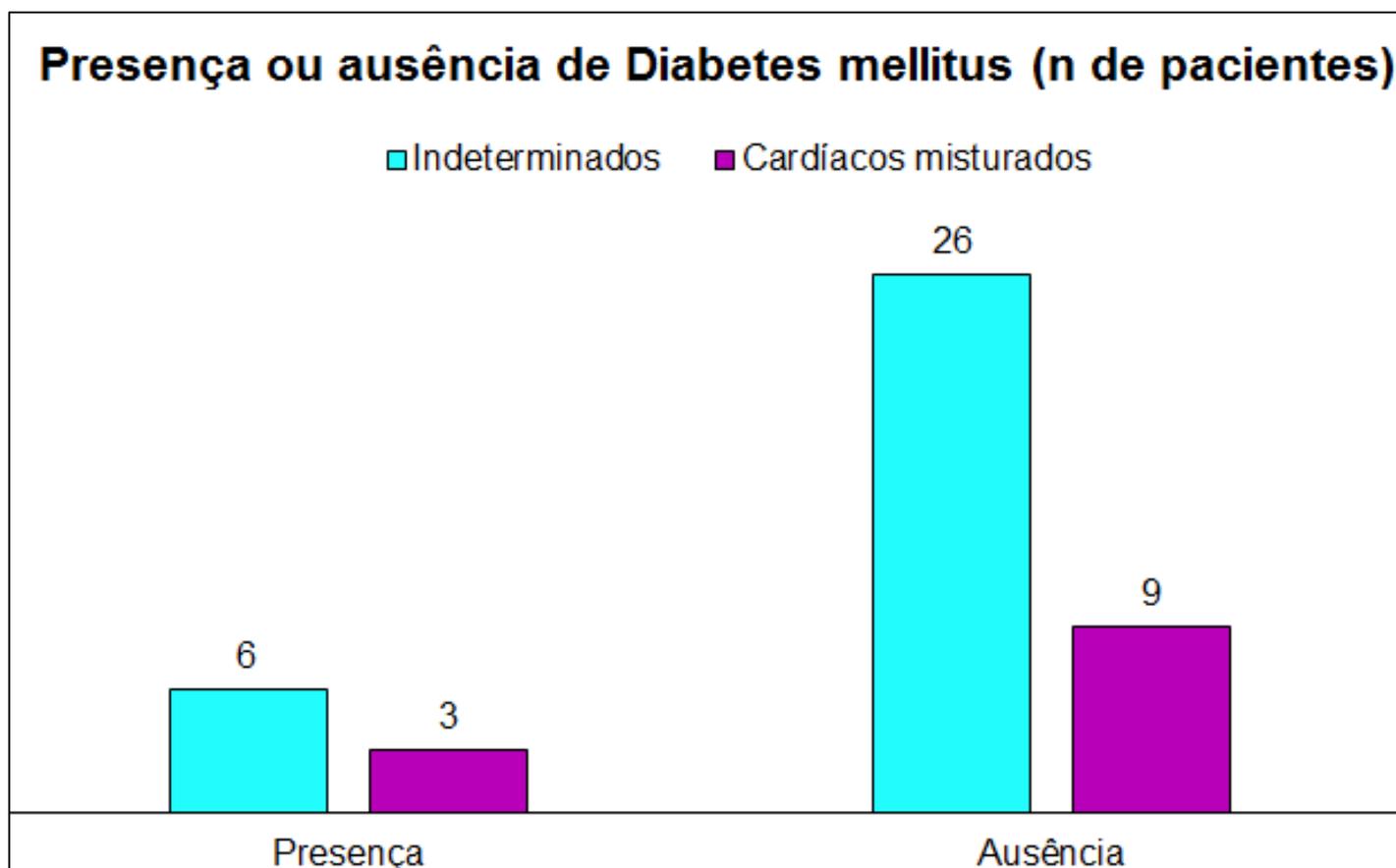


GRÁFICO 11 - PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DIABETES MELLITUS ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS SEPARADOS NO PCA.



Conforme já mencionado, a DC resulta em inúmeras alterações em diversos processos metabólicos, bem como, pode se apresentar com diferentes graus de acometimentos e em diferentes sistemas do organismo (EPTING et al., 2010; OSORIO et al., 2012; TORRECILHAS et al., 2012; BARRIAS et al., 2013). Por isso cada indivíduo portador da DC é acompanhado de maneira individualizada e moldada a própria necessidade que apresenta. Essa individualização do monitoramento traz benefícios principalmente para os pacientes que apresentam as formas mais graves da doença, pois necessitam de acompanhamento constante. Porém, para os pacientes nos quais a doença se manifesta com menor gravidade, o acompanhamento menos frequente – semestral ou até mesmo anual – dificulta o monitoramento e acompanhamento dos hábitos de vida desses indivíduos pelos profissionais, tais como, alimentação adequada, prática de

exercícios físicos e uso de medicamentos para finalidades que não a própria DC, tornando assim difícil o controle e monitoramento do desenvolvimento de doenças metabólicas.

Apesar de não ter havido diferença estatística significativa entre pacientes indeterminados e cardíacos, tanto para a variável hipertensão arterial bem como, para a variável diabetes mellitus, é importante ressaltar a necessidade da realização de avaliações laboratoriais e periódicas dos parâmetros que compõe o diagnóstico dessas doenças metabólicas, bem como, o monitoramento dos hábitos desses pacientes, uma vez que a presença do *T. cruzi* leva a uma série de modificações metabólicas no curso da DC (EPTING et al., 2010; OSORIO et al., 2012; TORRECILHAS et al., 2012; BARRIAS et al., 2013).

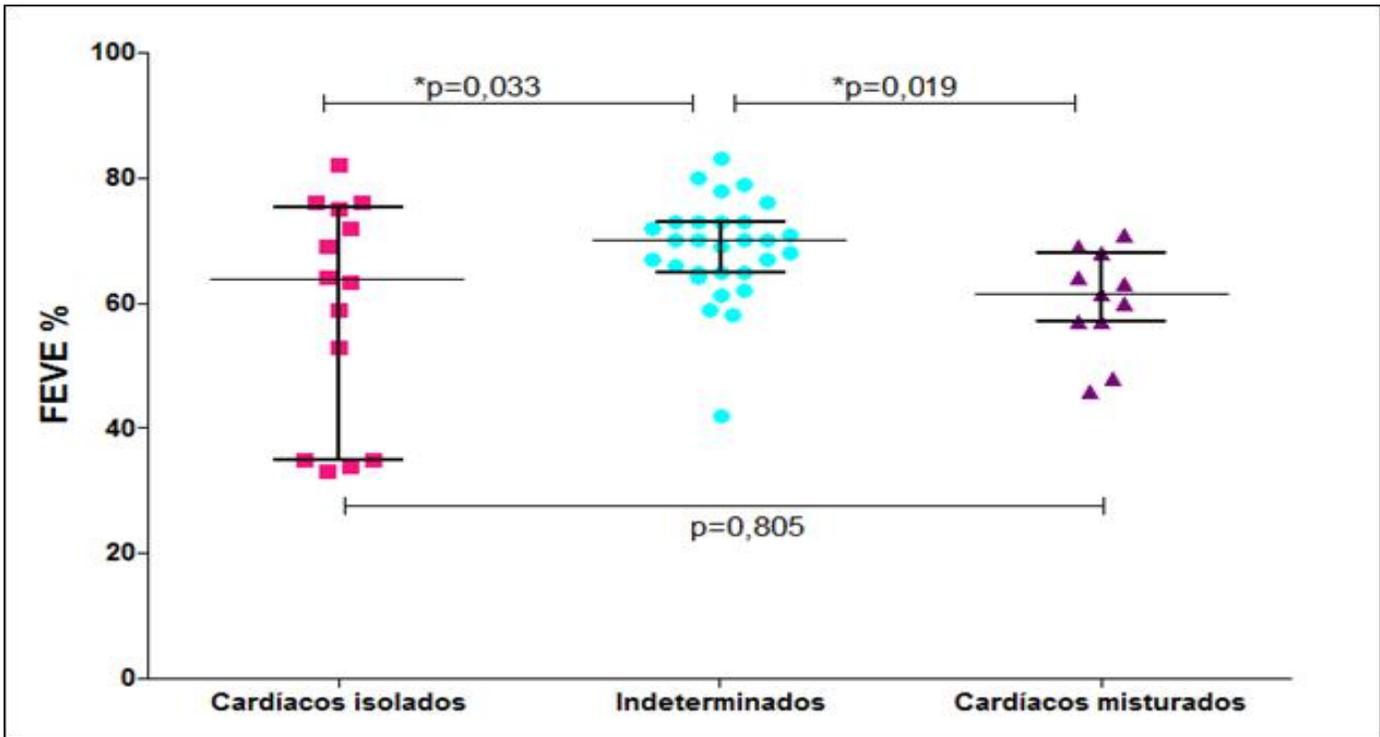
A CCC é uma das formas clínicas mais graves da DC, provocando destruição tecidual e extensa e progressiva fibrose. Ainda, uma das consequências dessa progressão é a perda da autonomia do sistema parassimpático e simpático cardíaco pela depopulação neuronal nesses sistemas. Essa perda neuronal não ocorre somente após o desenvolvimento da doença cardíaca: estudos relatam a presença dessa diminuição neuronal também na fase indeterminada e digestiva da doença (ADAD et al., 2001; SILVEIRA et al., 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011). O principal marcador para estabelecimento do prognóstico da forma cardíaca é a disfunção ventricular. Essa forma, geralmente, inicia-se após um longo período de infecção caracterizado como forma clínica indeterminada. A atividade de contratatura ventricular pode ser avaliada através do exame de ecocardiograma, sendo esse procedimento realizado na rotina de acompanhamento de pacientes chagásicos crônicos, independente da forma clínica que apresentam, pois tais pacientes possuem risco aumentado de desenvolvimento de insuficiência cardíaca e anormalidades de contractura miocárdica (ACQUATELLA, 2007, 2008).

A insuficiência cardíaca é uma síndrome ocasionada por múltiplos fatores que acarreta em uma anormalidade na função cardíaca, ocasionando a ejeção inadequada do volume sanguíneo que atende as necessidades metabólicas do organismo. Um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento da insuficiência cardíaca é o prejuízo da contratibilidade do miocárdio, caracterizado pela relação do Fator de Ejeção do Ventrículo

Esquerdo (FEVE) diminuída. A insuficiência cardíaca pode ser resultante de um processo crônico (GOLDMAN; AUSIELLO, 2005), como no caso da CCC .

Ainda, vale ressaltar que, alterações de contração do ventrículo esquerdo, avaliadas pela FEVE ou pelo diâmetro do ventrículo, são preditores prognósticos de CCC. Os resultados de associação com FEVE demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos cardíacos isolados e indeterminados ($p=0,033$, OR 1,190), bem como, entre os grupos cardíacos mistos e indeterminados ($p=0,019$, OR 1,130) (gráfico 12). Para confirmar se a significância encontrada para FEVE poderia estar sofrendo interferência das variáveis hipertensão arterial, idade e tempo de evolução, análises de regressão logística multivariada foram efetuadas confirmando a significância estatística. Considerando-se que a FEVE é um dos parâmetros preditores de diagnóstico e prognóstico do acometimento cardíaco, os resultados obtidos através da estatística dos dados de FEVE obtidos nos prontuários dos pacientes demonstram que os grupos de indivíduos chagásicos cardíacos têm alterações mais significativas que indivíduos indeterminados. Contudo, não houve diferença significativa para insuficiência cardíaca entre os grupos cardíacos isolados e cardíacos mistos ($p=0,907$), possivelmente devido ao baixo número de amostras analisadas (gráfico 13).

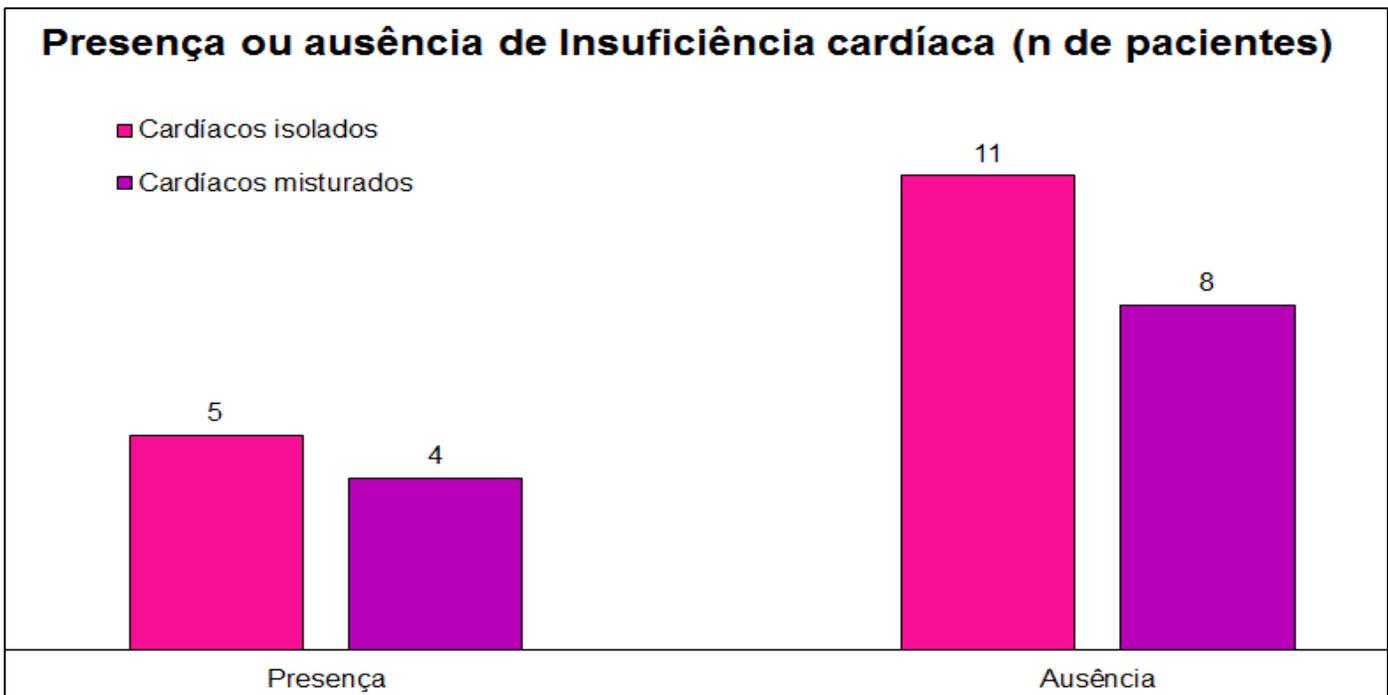
GRÁFICO 12- FRAÇÃO DE EJEÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS SEPARADOS NO PCA.



Nota: Barra central referente a mediana.

Barras das extremidades referentes aos intervalos interquartis.

GRÁFICO 13- FREQUÊNCIA DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA ENTRE OS SUBGRUPOS SEPARADOS NO PCA.



Diferentes autores relataram que os índices FEVE em pacientes chagásicos são menores que em indivíduos não chagásicos (MADY et al., 1994; RINCON et al., 2006). No estudo de Rincon et al. (2006), indivíduos chagásicos apresentaram FEVE de 55% ($\pm 20\%$). No presente trabalho, a média de FEVE encontrada foi de 64,4% ($\pm 12\%$) para o grupo total dos pacientes chagásicos, de 60,4% ($\pm 8\%$) para o grupo de pacientes cardíacos mistos e 59,03% ($\pm 18\%$) para o grupo de pacientes cardíacos isolados. Esses valores de FEVE dos pacientes cardíacos foram significativamente menores que a do grupo indeterminado (69,62% $\pm 6\%$) ($p=0,033$ e $p=0,019$).

Sabe-se que existe uma relação entre a presença de autoanticorpos direcionadas para diferentes componentes do tecido cardíaco, incluindo proteínas contráteis como actina, miosina e troponina, e que tal interação tem significativo papel na indução de processos apoptóticos potenciais para o desenvolvimento da CCC (NUSSINOVITCH; SHOENFELD, 2010, 2012, 2013a, 2013b). Sendo assim, é possível que modificações nessas proteínas possam ter alguma relação com a significância do índice FEVE encontrado entre os grupos de pacientes cardíacos e indeterminados discriminados pela PCA deste estudo.

Dessa maneira, a significância entre tal parâmetro deve ser analisada como um dado importante no monitoramento da DC, porém não pode ser relacionada de maneira direta aos resultados iônicos encontrados na espectrometria de massas.

6 CONCLUSÕES

A pesquisa inédita de Análise de Componentes Principais dos íons resultantes de análise DIMS do soro de pacientes chagásicos crônicos e controles e as análises do perfil proteico através da eletroforese bidimensional demonstrou que:

- a) Diferenças na expressão de proteínas entre os grupos de pacientes chagásicos cardíacos, assintomáticos e indivíduos do grupo controle ocorreu através da técnica de eletroforese bidimensional. Proteínas com expressões diferenciadas devem ser identificadas e avaliadas em estudos futuros como possíveis biomarcadores diagnósticos ou prognósticos da DC.
- b) A PCA foi capaz de discriminar os grupos controle de pacientes, bem como os grupos de pacientes com as diferentes formas clínicas cardíaca e indeterminada da DC crônica, utilizando os dados de íons e suas intensidades obtidos através da espectrometria de massas.
- c) Foi verificada a presença de vários íons, através da análise de *LOADINGS*, considerados responsáveis pelos agrupamentos observados nos gráficos de *SCORES*.
- d) Houve diferença estatística significativa dos valores de FEVE entre os pacientes chagásicos crônicos cardíacos e indeterminados separados na PCA. Todavia, não houve relação direta dos resultados iônicos encontrados na análise de *LOADINGS* da PCA para a variável.
- e) Houve diferença estatística significativa para a presença de Hipertensão Arterial entre os grupos cardíacos separados na PCA, todavia não houve relação direta dos resultados iônicos encontrados na análise de *LOADINGS* da PCA com a presença de hipertensão arterial entre esses pacientes.

7 REFERÊNCIAS

- ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas Heart Disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1124–1131, 2007.
- ACQUATELLA, H. Predicting Heart Failure and Mortality in Chronic Chagas' Heart Disease. A Novel Disorder in Spain. **Revista Española de Cardiología**, v. 61, n. 2, p. 105–107, 2008.
- ADAD, S. J.; CANÇADO, C. G.; ETCHEBEHERE, R. M.; et al. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. **Virchows Archiv**, v. 438, n. 3, p. 254–258, 2001.
- AYO, C. M.; DALALIO, M. M. D. O.; VISENTAINER, J. E. L.; et al. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. **BioMed research international**, v. 2013, p. 284729, 2013.
- BARALDI, E.; CARRARO, S.; GIORDANO, G.; et al. Metabolomics: moving towards personalized medicine. **Italian journal of pediatrics**, v. 35, n. 1, p. 30, 2009.
- BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M.; et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366–375, 2012.
- BARRIAS, E. S.; CARVALHO, T. M. U. DE; SOUZA, W. DE. Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. **Frontiers in immunology**, v. 4, n. August, p. 186, 2013.
- BAYNE, C. K. Multivariate Analysis of Quality: An Introduction. **Technometrics**, v. 44, n. 2, p. 186–187, 2002.
- BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 121–7, 1999.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1537–1547, 2015.
- BOSCARDIN, S. B.; TORRECILHAS, A. C. T.; MANARIN, R.; et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 6B, p. 1373–84, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 1976.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca²⁺-signaling factor for mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 10, p. 5172–5180, 1995.

CALLIGARIS, D.; VILLARD, C.; LAFITTE, D. Advances in top-down proteomics for disease biomarker discovery. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 7, p. 920–934, 2011.

CAMPANELLA, L.; ANGELIS, G. DE; VISCO, G. Chemometric investigation of the efficiency of different TiO₂-based catalysts as principal components of TOC photochemical sensors under development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **Anais** . v. 376, p.467–475, 2003.

CARLOS, J.; DIAS, P.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control : in search of a realistic analysis Problemas e perspectivas para o controle da doença de Chagas : a busca de uma análise realística. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 193–196, 2008.

CAROD-ARTAL, F. J.; GASCON, J. Chagas disease and stroke. **Lancet neurology**, v. 9, n. 5, p. 533–42, 2010.

CASTRO, E. Chagas' disease: lessons from routine donation testing. **Transfusion medicine (Oxford, England)**, v. 19, n. 1, p. 16–23, 2009.

CESTARI, I.; ANSA-ADDO, E.; DEOLINDO, P.; INAL, J. M.; RAMIREZ, M. I. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. **Journal of immunology**, v. 188, n. 4, p. 1942–52, 2012.

CESTARI, I.; EVANS-OSSES, I.; SCHLAPBACH, L. J.; MESSIAS-REASON, I. DE; RAMIREZ, M. I. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Molecular immunology**, v. 53, n. 4, p. 328–34, 2013.

CORTEZ, J.; RAMOS, E.; VALENTE, C.; SEIXAS, J.; VIEIRA, A. A Expressão Global da Doença de Chagas – Oportunidades Emergentes e. **Acta Medica Portuguesa**, v. 25, n. 5, p. 332–339, 2012.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl, n. August, p. 113–22, 2007.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease . What is known and what should be improved : a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286–296, 2012.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl, p. 31–40, 2009.

CUNHA-NETO, E.; BILATE, A. M.; HYLAND, K. V.; et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. **Autoimmunity**, v. 39, n. 1, p. 41–54, 2006.

CUNHA-NETO, E.; TEIXEIRA, P. C.; NOGUEIRA, L. G.; KALIL, J. Autoimmunity. **Advances in parasitology**, v. 76, p. 129–52, 2011.

DAVIES, A. M. C.; FEARN, T. Back to Basics: The Principles of Principal Component Analysis. **Spectroscopy Europe**, v. 16, p. 20–23, 2005.

DHIMAN, M.; NAKAYASU, E. S.; MADAIHAH, Y. H.; et al. Enhanced nitrosative stress during *Trypanosoma cruzi* infection causes nitrotyrosine modification of host proteins: implications in Chagas' disease. **The American journal of pathology**, v. 173, n. 3, p. 728–40, 2008.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 3, p. 283–91, 2010.

FERNIE, A. R.; TRETHERWEY, R. N.; KROTZKY, A. J. *To Systems Biology*, v. 5, n. September, p. 1–7, 2004.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724–731, 1999.

GIRONÈS, N.; CARBAJOSA, S.; GUERRERO, N. A.; et al. Global Metabolomic Profiling of Acute Myocarditis Caused by *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil - Tratado de Medicina Interna**. 22nd ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2005.

GUERRI-GUTTENBERG, R. A.; GRANA, D. R.; AMBROSIO, G.; MILEI, J. Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared! **European heart journal**, v. 29, n. 21, p. 2587–91, 2008.

IPCS. Biomarkers in risk assessment: validity and validation. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>>. .

JOLLIFFE, I. Principal Component Analysis. **Wiley StatsRef: Statistics Reference Online**, Springer Series in Statistics., 2014. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

KIERSZENBAUM, F. Chagas ' Disease and the Autoimmunity Hypothesis. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 2, p. 210–223, 1999.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? **Trends in parasitology**, v. 21, n. 11, p. 513–6, 2005.

KOKOT, S.; GRIGG, M.; PANAYIOTOU, H.; PHUONG, T. D. Data Interpretation by some Common Chemometrics Methods. **Electroanalysis**, v. 10, n. 16, p. 1081–1088, 1998.

LAU, S. K. P.; LEE, K.-C.; LO, G. C. S.; et al. Metabolomic Profiling of Plasma from Melioidosis Patients Using UHPLC-QTOF MS Reveals Novel Biomarkers for Diagnosis. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, 2016.

LIAW, L.; PRUDOVSKY, I.; KOZA, R. A.; et al. Lipid Profiling of In Vitro Cell Models of Adipogenic Differentiation: Relationships with Mouse Adipose Tissues. **Journal of cellular biochemistry**, 2016.

LIN, H.; PI, Z.; MEN, L.; et al. Urinary metabolomic study of Panax ginseng in deficiency of vital energy rat using ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Ethnopharmacology**, 2016.

LIU, Y.; QING, H.; DENG, Y. Biomarkers in Alzheimer's disease analysis by mass spectrometry-based proteomics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 7865–7882, 2014.

LUQUE-GARCIA, J. L.; NEUBERT, T. A. Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 259–276, 2007.

MACÊDO, V. Indeterminate Form of Chagas Disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 311–316, 1999.

MADY, C.; CARDOSO, R. H.; BARRETTO, A C.; et al. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. **Circulation**, v. 90, p. 3098–3102, 1994.

MARTINS-MELO, F. R.; ALENCAR, C. H.; RAMOS, A. N.; HEUKELBACH, J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 2, p. e1508, 2012.

MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. **Epidemiology and infection**, v. 136, n. 9, p. 1153–64, 2008.

MASUMORI, N.; THOMAS, T. Z.; CHAURAND, P.; et al. A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential. **Cancer Research**, v. 61, n. 5, p. 2239–2249, 2001.

MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Revista Analítica**, v. 06, p. 38–50, 2003.

MAYEUX, R. Biomarkers: potential uses and limitations. **NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 1, n. 2, p. 182–188, 2004.

MCDONALD, W. H.; YATES, J. R. Proteomic tools for cell biology. **Traffic** (, v. 1, n. 10, p. 747–754, 2000.

MEDEI, E. H.; NASCIMENTO, J. H. M.; PEDROSA, R. C.; CARVALHO, A. C. C. Envolvimento de Auto-Anticorpos na Fisiopatologia da Doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, n. 4, p. 281–286, 2008.

MUÑOZ-SARAVIA, S. G.; HABERLAND, A.; WALLUKAT, G.; SCHIMKE, I. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart failure reviews**, v. 17, n. 1, p. 45–64, 2012.

NDAO, M.; SPITHILL, T. W.; CAFFREY, R.; et al. Identification of novel diagnostic serum biomarkers for Chagas' disease in asymptomatic subjects by mass spectrometric profiling. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1139–49, 2010.

NICHOLSON, J. K.; CONNELLY, J.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, n. 2, p. 153–161, 2002.

NORDSTRÖM, A.; LEWENSOHN, R. Metabolomics: Moving to the clinic. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 4–17, 2010.

NUNES, M. C. P.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A. L. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767–76, 2013.

NUSSINOVITCH, U.; SHOENFELD, Y. Anti-troponin autoantibodies and the cardiovascular system. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 96, n. 19, p. 1518–24, 2010.

NUSSINOVITCH, U.; SHOENFELD, Y. The diagnostic and clinical significance of anti-muscarinic receptor autoantibodies. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 42, n. 3, p. 298–308, 2012.

NUSSINOVITCH, U.; SHOENFELD, Y. The clinical significance of anti-beta-1 adrenergic receptor autoantibodies in cardiac disease. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 44, n. 1, p. 75–83, 2013a.

NUSSINOVITCH, U.; SHOENFELD, Y. The clinical and diagnostic significance of anti-myosin autoantibodies in cardiac disease. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 44, n. 1, p. 98–108, 2013b.

OKAMOTO, E. E.; SHERBUK, J. E.; CLARK, E. H.; et al. Biomarkers in Trypanosoma cruzi-Infected and Uninfected Individuals with Varying Severity of Cardiomyopathy in Santa Cruz, Bolivia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2014.

OSORIO, L.; RÍOS, I.; GUTIÉRREZ, B.; GONZÁLEZ, J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: Who is who? **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1390–1402, 2012.

PARKER, E. R.; SETHI, A. Chagas disease: coming to a place near you. **Dermatologic clinics**, v. 29, n. 1, p. 53–62, 2011.

PASSOS, A. D. C.; SILVEIRA, C. Summary of results from the national surveys. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 2, p. 47–50, 2011.

PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 19, n. 1, p. 34, 2013.

PROST, J. O.; VILLANUEVA, H. R.; MORIKONE, A. N. A. M.; POLO, G.; BOSCH, A. N. A. M. Evidencias de compromiso cerebral en el estadio crónico de la enfermedad de Chagas obtenidas por medio del potencial P 300 y de electroencefalografía cuantificada. **Archivos de Neuropsiquiatria**, v. 58, n. 2-A, p. 262–271, 2000.

PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R. M.; KHAN, I. A.; NAVARRO, V. S.; VASAVADA, B. C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International journal of cardiology**, v. 115, n. 3, p. 279–83, 2007.

PY, M. O. Neurologic manifestations of Chagas disease. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 11, n. 6, p. 536–42, 2011.

RANI, L.; MINZ, R. W.; ARORA, A.; et al. Serum proteomic profiling in granulomatosis with polyangiitis using two-dimensional gel electrophoresis along with matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. **International journal of rheumatic diseases**, v. 17, n. 8, p. 910–9, 2014.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010. Elsevier Ltd.

REQUENA-MÉNDEZ, A.; LÓPEZ, M. C.; ANGHEBEN, A.; et al. Evaluating Chagas disease progression and cure through blood-derived biomarkers: a systematic review. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 9, p. 957–76, 2013.

RINCON, L. G.; OTÁVIO, M.; TÚLIO, M.; et al. Perfil clínico de pacientes chagásicos e não-chagásicos portadores de marca-passo cardíaco artificial Clinical profile of Chagas and non-Chagas' disease patients with cardiac pacemaker. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 245–249, 2006.

ROSSI, MARCOS A.; MENGEL, J. O. Patogênese da miocardite chagásica crônica: o papel de fatores autoimunes e microvasculares. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 593–599, 1992.

- SCHMEE, J. An Introduction to Multivariate Statistical Analysis. **Technometrics**, v. 28, n. 2, p. 180–181, 1986.
- SCHWARTZ, S. A.; WEIL, R. J.; THOMPSON, R. C.; et al. Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Cancer Research**, v. 65, n. 17, p. 7674–7681, 2005.
- SILVEIRA, A. B. M.; ARANTES, R. M. E.; VAGO, A. R.; et al. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology**, v. 131, n. Pt 5, p. 627–34, 2005.
- SILVEIRA, A. B. M.; LEMOS, E. M.; ADAD, S. J.; et al. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Human pathology**, v. 38, n. 8, p. 1256–64, 2007.
- SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168–74, 2006.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. , 2011.
- SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U. DE. Active penetration of *Trypanosoma cruzi* into host cells: Historical considerations and current concepts. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JAN, p. 2–4, 2013.
- STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Curr Opin HIV AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463–466, 2011.
- TAN, H.; ANDREWS, N. W. Don't bother to knock--the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 10, p. 427–428, 2002.
- TÁVORA, M. Z.; MEHTA, N.; SILVA, R. M.; et al. Characteristics and identification of sites of chagasic ventricular tachycardia by endocardial mapping. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 72, n. 4, p. 451–74, 1999.
- TORRECILHAS, A. C.; SCHUMACHER, R. I.; ALVES, M. J. M.; COLLI, W. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1465–1474, 2012.
- TRYGG, J. .; HOLMES, E. .; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in Metabonomics. **ournal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 469–479, 2007.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472–81, 2001.

WEN, J.-J.; GARG, N. J. Proteome Expression and Carbonylation Changes During *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease in Rats. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 4, p. 1–17, 2012.

WHO. **CONTROL OF CHAGAS DISEASE** Second report of the WHO Expert Committee World Health Organization. 2003.

WHO. **Control and prevention of Chagas disease in Europe**. Geneva, Switzerland, 2010.

WHO. **SUMMARY THE 17 NEGLECTED TROPICAL DISEASES**. 2012.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) Fact sheet N°340. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 18/1/2016.

WILKINS, M. R.; CHEMISTRY, C. C. THINKING BIGPROTEOME STUDIES IN A POST-GENOME. .

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, n. 1-3, p. 37–52, 1987.

XU, B. J.; SHYR, Y.; LIANG, X.; et al. Proteomic patterns and prediction of glomerulosclerosis and its mechanisms. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 10, p. 2967–2975, 2005.

YAO, Y.; JIANG, Y.; HAN, M.; et al. Screening and identification of potential predictive biomarkers for Down's syndrome from second trimester maternal serum. **Expert review of proteomics**, v. 12, n. 1, p. 97–107, 2015.

ZHAO, L.; YANG, S.; ZHANG, Y.; et al. New Analytical Tool for the Detection of Ractopamine Abuse in Goat Skeletal Muscle by Potential Gene Expression Biomarkers. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 8, p. 1861–7, 2016.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–4, 2009.