

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
IMUNOLOGIA

PRISCILLA ALMEIDA DA COSTA

**ASPECTOS MOLECULARES ASSOCIADOS À
CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA E À REATIVAÇÃO DA
INFECÇÃO EM PACIENTES CARDIOPATAS
TRANSPLANTADOS**

Belo Horizonte

2019

PRISCILLA ALMEIDA DA COSTA

**ASPECTOS MOLECULARES ASSOCIADOS À
CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA E À REATIVÇÃO DA
INFECÇÃO EM PACIENTES CARDIOPATAS
TRANSPLANTADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Andréa Mara Macedo

Coorientador: Dr. Erich Birelli Tahara

Belo Horizonte

2019

043 Costa, Priscilla Almeida da.
Aspectos moleculares associados à cardiomiopatia chagásica e à reativação da infecção em pacientes cardiopatas transplantados [manuscrito] / Priscilla Almeida da Costa. - 2019.
174 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Andréa Mara Macedo. Coorientador: Dr. Erich Birelli Tahara.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica. 2. Doença de Chagas. 3. Trypanosoma cruzi. 4. Transplante de Coração. 5. Patologia Molecular. 6. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Macedo, Andréa Mara. II. Tahara, Erich Birelli. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE PRISCILLA ALMEIDA DA COSTA.
 Aos três dias do mês de abril de 2019 às 13h30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Aspectos moleculares associados à cardiomiopatia chagásica e à reativação da infecção em pacientes cardiopatas transplantados"", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Andréa Mara Macedo, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Alfredo Inácio Fiorelli (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da U), aprovada; Dr. Luciana de Oliveira Andrade (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Rosália Moraes Torres (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Silvane Maria Fonseca Murta (Centro de Pesquisa Rene Rachou-FIOCRUZ-BH), aprovada; Dr. Erich Birelli Tahara - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Andréa Mara Macedo - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 03 de abril de 2019.

Dr. Alfredo Inácio Fiorelli (Incor - USP)

Dr. Luciana de Oliveira Andrade (UFMG)

Dr. Rosália Moraes Torres (UFMG)

Dr. Silvane Maria Fonseca Murta (Centro de Pesquisa Rene Rachou-FIOCRUZ-BH)

Dr. Erich Birelli Tahara - Coorientador (UFMG)

Dr. Andréa Mara Macedo - Orientadora (UFMG)

Leda Quêrcia Vieira
 Prof^a Leda Quêrcia Vieira
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Agradecimentos

Agradeço à Deus pela oportunidade concedida, força, cuidado e amparo inexplicável em todos momentos,

à Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Bioquímica e Imunologia pela oportunidade, suporte e infraestrutura que permitiu a concretização deste trabalho;

à CAPES pela concessão da bolsa;

ao suporte financeiro concedido pela FAPEMIG, CAPES e CNPq que permitiram a realização deste projeto;

à professora Andréa Mara Macedo pelo acolhimento em seu laboratório, confiança e por partilhar comigo seus conhecimentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho;

ao meu coorientador Erich Birelli Tahara pela ajuda e pelas contribuições imprescindíveis a tese;

a todos os pacientes, que mesmo na busca por ajuda, possibilitaram-nos, além da realização desse estudo, crescimento acadêmico e científico nessa área do conhecimento, aos médicos do HC-UFMG colaboradores deste trabalho, Geraldo Brasileiro Filho e Maria da Consolação Vieira Moreira, pela disponibilidade, colaboração, ensinamentos e também pelo incentivo na realização deste trabalho. Ao Fábio Castilho e Wagner do Nascimento por toda contribuição nos resultados dos diagnósticos clínicos;

às colaboradoras, professora Walderez Dutra e à doutoranda Carolina Koh pelas grandes contribuições a este trabalho, especialmente na parte imunológica;

ao grupo de pesquisa do professor Alejandro Schjiman pela grande colaboração a este trabalho na parte de transmissão congênita experimental;

ao Serviço de Arquivo Médico e Estatística do HC-UFMG, pela contribuição na disponibilização dos prontuários e ao Laboratório de Anatomia Patológica, por nos conceder os resultados dos exames laboratoriais dos pacientes, e assim contribuir de forma grandiosa para o projeto;

aos demais professores do Laboratório de Genética e Bioquímica, Carlos Renato Machado, Glória Franco e Sérgio Pena, pelas orientações, pelo suporte e por toda ajuda;

aos amigos do LGB que estiveram comigo neste longo trajeto, pelo convívio, aprendizado e apoio, em especial ao Wagson Moreira também pela ajuda e colaboração nos experimentos,

de forma especial à minha família, avós, tios e primos, pelo incentivo, apoio e torcida;

aos meus amados pais Moreira e Vera pelo amor incondicional, pelo apoio constante neste e em outros desafios por mim assumidos,
aos meus irmãos Esdras e Vitória pelos momentos únicos que temos quando estamos juntos, por todas as palavras de incentivo e por sempre acreditarem em mim,
ao Ivan por todo amor e companheirismo, que de forma carinhosa me incentivou e transmitiu confiança e força em todos os momentos;
à minha família em Belo Horizonte, Héllida e Mayra pelo suporte, companhia, amizade e bons momentos vividos nesses anos;
às minhas amigas Marina, Tatielle e Bruna pela amizade, apoio e torcida de sempre,
a todos aqueles que, direta ou indiretamente, têm contribuído para minha formação pessoal, profissional e científica, minha gratidão.

Resumo

Cerca de 20 a 30% das pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* manifestam a forma cardíaca da doença de Chagas, desenvolvendo complicações que podem conduzir à insuficiência cardíaca congestiva e morte súbita, tornando a cardiomiopatia chagásica crônica, em seu estágio mais avançado, a terceira principal indicação para o transplante cardíaco no Brasil. Todavia, a imunossupressão, necessária ao controle da rejeição do transplante, configura um aspecto complicador para pacientes chagásicos, porquanto aumenta a chance de reativação da infecção. O diagnóstico diferencial de rejeição do transplante e reativação da infecção chagásica é também considerado difícil, impossibilitando muitas vezes o tratamento correto. Ademais, o motivo pelo qual alguns dos pacientes chagásicos submetidos ao transplante cardíaco apresentam a reativação da doença é ainda desconhecido. Estima-se que esses fatores estejam relacionados tanto à variabilidade genética do parasito quanto do hospedeiro. Nesse sentido, no presente trabalho investigamos: (i) a possibilidade de utilização de metodologias baseadas em PCRs direcionadas para marcadores nucleares (rDNA 24S α) e mitocondriais (kDNA) para diagnóstico precoce da presença do *T. cruzi* em corações de pacientes chagásicos transplantados; (ii) a ocorrência de subpopulações de *T. cruzi* mais associadas à reativação da infecção, utilizando um triplo ensaio para determinação de DTUs (análise dos genes COII, espaçador intergênico do miniéxon e rDNA 24S α) e análises de polimorfismos de microssatélites (TcCAA10, TcTAT20, TcAAAT6, TcGAG10, TcATT14, TcTAT15); e (iii) a existência de associação de polimorfismos genéticos dos pacientes (genes codificadores de IL-1 α , IL-6, IL-10 e IL-17A) com a reativação chagásica e/ou rejeição pós-transplante. Para isso, foram analisadas 991 biópsias endomiocárdicas (BEMs), derivadas do acompanhamento pós-transplante cardíaco de 98 pacientes chagásicos, além de 14 biópsias de pele e três obtidas de sistema nervoso central (SNC), em casos de reativação cutânea ou neurológica. A presença de DNA de *T. cruzi* foi detectada em 205 BEMs, oriundas de 70 pacientes, oito biópsias de pele e nas três biópsias de SNC. No decorrer dos 10 anos de acompanhamento, dos 70 pacientes que apresentaram alguma PCR positiva para o DNA do parasito, cerca de 73% apresentaram algum episódio de reativação clínica da doença de Chagas. Quando comparada a outras técnicas de diagnóstico (esfregaço sanguíneo, análises histopatológicas da BEM, convencional ou com imuno-histoquímica), observamos que a técnica de PCR, proposta neste trabalho, revelou sensibilidade superior, com boa especificidade, tendo sido capaz de antecipar a reativação clínica da doença de Chagas entre 1,5 e 36 meses (mediana 6, média 9,1 meses). Assim, a adoção dessa metodologia, além de contribuir para o diagnóstico precoce da reativação da infecção, apresenta potencial para auxiliar os médicos nas decisões de tratamento. Em relação aos fatores genéticos do parasito possivelmente associados à reativação, a genotipagem de 184/216 amostras positivas para presença de *T. cruzi* demonstrou que a maioria dos pacientes teve reativação por TcII, reforçando o fato de que essa é a principal DTU associada à forma cardíaca e às diferentes formas clínicas de reativação chagásica pós-transplante, pelo menos na região geográfica estudada. Todavia, foi observado um caso de infecção inicial por TcI com reativação por TcVI, indicando que as linhagens do parasito podem variar durante os episódios de reativação e que outras DTUs também podem estar associadas à cardiopatia chagásica no Sudeste brasileiro. Curiosamente, a comparação entre amostras obtidas de corações explantados e transplantados demonstraram, em todos os casos analisados, que a população do parasito predominante nos episódios de reativação era diferente daquela detectada no coração do paciente na ocasião do transplante. Em relação a análise dos polimorfismos genéticos do hospedeiro, obtivemos resultados intrigantes para os genes codificadores de IL-10 e IL-17. No que concerne o polimorfismo IL10 (-1082 G/A), a

presença do alelo G, associado à maior produção da citocina anti-inflamatória IL-10, no doador e no receptor, correlacionou-se com uma maior rejeição ao enxerto cardíaco. Já para o polimorfismo IL17A (-197 A/G), a presença do alelo A, associado à maior produção da citocina pró-inflamatória IL-17, no doador, correlacionou-se com uma maior susceptibilidade à reativação precoce da doença de Chagas nos pacientes transplantados. Dados inusitados que revelam a importância dos genótipos dos receptores e dos doadores nesse contexto, assim como a complexidade da resposta imune nos processos de rejeição e reativação chagásica. Paralelamente a estes estudos, nosso último objetivo foi investigar, com uma abordagem de doença de Chagas experimental, contribuições de fatores do parasito e do hospedeiro no tropismo tecidual diferencial, mais especificamente para a placenta, e a transmissão congênita. Para isso, investigamos os efeitos, no ambiente placentário, da infecção de camundongos C57Bl/6J com duas cepas de *T. cruzi* de diferentes DTUs – VD (TcVI) e K98 (TcI) — analisando a expressão gênica e a persistência parasitária neste tecido. Foi verificado um maior desenvolvimento de resposta imune contra à infecção por VD, possivelmente consequente do tropismo mais forte ao órgão placentário observado para essa cepa, reiterando a ideia de que a DTU VI está associada ao aumento do risco para a transmissão vertical da doença de Chagas.

Abstract

About 20 to 30 percent of people infected with *Trypanosoma cruzi* develop Chagas heart disease, showing cardiac complications that can lead to heart failure or sudden death and establish chronic chagasic cardiomyopathy in its most advanced stage, being the third leading indication for heart transplant in Brazil. However, immunosuppression – necessary for the control of transplant rejection – is a complicating aspect for chagasic patients, since it increases the chance of reactivation of the infection. The differential diagnosis between implant rejection and reactivation of Chagas disease has been considered difficult, preventing thus the correct treatment. In addition, the reason why some chagasic patients undergoing heart transplantation have reactivation of the disease is still unknown. It is estimated that these factors are related to both the genetic variability of the parasite and the host. In this sense, in the present work we investigated (i) the possibility of using methodologies based on PCRs directed to nuclear (rDNA 24S α) and mitochondrial (kDNA) markers for early diagnosis of the presence of *T. cruzi* in transplanted chagasic patients; (ii) the occurrence of *T. cruzi* subpopulations most associated with reactivation of infection, using a triple assay for determination of DTUs (COII gene analysis, miniexon intergenic spacer and 24S α rDNA) and microsatellite polymorphisms (TcCAA10, TcTAT20, TcAAAT6, TcGAG10, TcATT14, TcTAT15); and (iii) the existence of association of genetic polymorphisms of the patients (genes encoding IL-1 α , IL-6, IL-10 and IL-17) with chagasic reactivation and/or rejection of post-transplant. For this, 991 endomyocardial biopsies (EMB), derived from the cardiac transplantation follow-up of 98 chagasic patients, were analyzed in addition to 14 skin biopsies, and three obtained from the central nervous system (CNS) – the latter in cases of cutaneous or neurological reactivation. The presence of *T. cruzi* DNA was detected in 205 EMB from 70 patients, eight skin biopsies and in three of the CNS biopsies. During the 10 years of follow-up, from the 70 patients who had some PCR positive for the DNA of the parasite, approximately 73% had some clinical reactivation episode of Chagas disease. When compared to other diagnostic techniques (blood smear, histopathological analysis of EMB, conventional or with immunohistochemistry), we observed that the PCR technique proposed in this study revealed superior sensitivity with good specificity and was able to anticipate reactivation of Chagas disease between 1.5 and 36 months (median 6, mean 9.1 months). Thus, the adoption of this methodology, besides contributing to the early diagnosis of the reactivation of the infection, presents potential to assist the doctors in the treatment decisions. Regarding the genetic factors of the parasite possibly associated with reactivation, the genotyping of 184/216 positive samples for the presence of *T. cruzi* demonstrated that most patients had reactivation by TcII, reinforcing the fact that this is the main DTU associated with the form cardiac disease and the different clinical forms of post-transplant chagasic reactivation, at least in the geographic region studied. However, a case of initial TcI infection with TcVI reactivation was observed, indicating that parasite strains may vary during reactivation episodes, and that other DTUs may also be associated with Chagas heart disease in southeastern Brazil. Interestingly, the comparison between samples obtained from explanted hearts and transplanted hearts showed, in all analyzed cases, that the population of the predominant parasite in the reactivation episodes was different from that detected in the heart of the patient at the time of transplantation, even among those patients who maintained the same DTU during reactivation. In relation to host genetic polymorphisms, we obtained intriguing results for the genes encoding IL-10 and IL-17. Regarding the IL10 polymorphism (-1082 G/A), the presence of the G allele associated with the increased production of the anti-inflammatory cytokine IL-10, in the donor and recipient was correlated with greater rejection of the cardiac graft. For the IL17A polymorphism (-197

A/G), the presence of the A allele associated with increased production of the pro-inflammatory cytokine IL-17, in the donor was correlated with a greater susceptibility to early reactivation of Chagas disease in transplant patients. In parallel with these studies, our ultimate goal was to investigate with an experimental Chagas disease approach, contributions of parasite and host factors in differential tissue tropism, more specifically to the placenta, and congenital transmission. For this, we investigated the effects in the placental environment of the infection of C57Bl/6J mice with two strains of *T. cruzi* of different DTUs, VD (TcVI) and K98 (TcI), analyzing the gene expression and parasite persistence in this tissue. There was a greater development of an immune response against VD infection, possibly due to the stronger placental tropism displayed for this strain, reiterating the idea that DTU VI is associated with an increased risk for vertical transmission of Chagas disease.

Lista de Tabelas e Gráficos

Tabela 1.1 - Protocolo da periodicidade das revisões ambulatoriais e biópsias.....	12
Tabela 1.2 - Classificação de rejeição celular em enxerto cardíaco.....	14
Tabela 1.3 - Número anual de transplantes cardíacos realizados no Brasil e HC- UFMG	17
Tabela 1.4 - Distribuição do número de pacientes com reativação chagásica de acordo com o tempo pós-transplante	25
Tabela 2.1 - Sequências dos iniciadores utilizados.....	66
Tabela 2.2 - Identificação das DTUs de <i>T. cruzi</i> em biópsias de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.....	70
Tabela 3.1 - Identificação dos polimorfismos analisados neste trabalho.....	89
Tabela 3.2 – Polimorfismos genéticos e produção das interleucinas analisadas neste trabalho	90
Tabela 3.3 - Equilíbrio de <i>Hardy- Weinberg</i> para os polimorfismos gênicos estudados	91
Tabela 3.4 - Frequências genotípicas e dos alelos para IL1- α em relação a rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante.....	94
Tabela 3.5 - Frequências genotípicas e dos alelos para IL1- α em relação a reativação chagásica precoce pós-transplante.....	95
Tabela 3.6 - Frequências genotípicas e dos alelos para IL-6 em relação a rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante	97
Tabela 3.7 - Frequências genotípicas e dos alelos para IL1-6 em relação a reativação chagásica precoce pós-transplante.....	98
Tabela 3.8 – Frequências genotípicas e dos alelos para IL-10 em relação a rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante	100
Tabela 3.9 – Combinação das frequências genotípicas para IL-10 em relação a rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante	101
Tabela 3.10 – Frequências genotípicas e dos alelos para IL-10 em relação a reativação chagásica precoce pós-transplante	103
Tabela 3.11 – Frequências genotípicas e dos alelos para IL-17 em relação a rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante	105
Tabela 3.12 – Frequências genotípicas e dos alelos para IL-17 em relação a reativação chagásica precoce pós-transplante	106
Tabela 3.13 – Combinação das frequências genotípicas para IL-17 em relação a rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante	107
Gráfico 1.1 - Distribuição dos pacientes por sexo, segundo os grupos de idade	26

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Perfil das principais manifestações clínicas e/ou subclínicas da reativação chagásica após transplante cardíaco	29
Figura 1.2 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier após transplante cardíaco realizado no HC-UFMG	32
Figura 1.3 - Curvas ROC para comparação.....	34
Figura 1.4 - Comparação dos resultados entre o diagnóstico molecular e a reativação clínica da doença de Chagas pós-transplante cardíaco.....	35
Figura 2.1 - Esquema do ensaio triplo utilizado para discriminação das seis DTUs principais de <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Figura 2.2 - Distribuição epidemiológica das seis principais DTUs de <i>T. cruzi</i>	62
Figura 2.3 - Padrões típicos de RFLP gerados a partir de produtos amplificados do gene mitocondrial COII diretamente dos tecidos dos pacientes depois da digestão com <i>AluI</i>	69
Figura 2.4 - Amplificação do espaçador intergênico dos genes miniéxon de <i>T. cruzi</i> diretamente dos tecidos dos pacientes	69
Figura 2.5 - Amplificação do gene rDNA24Sa de <i>T. cruzi</i> diretamente dos tecidos dos pacientes.....	70
Figura 3.1 - Curso da infecção pelo <i>T. cruzi</i> e o desenvolvimento da doença de Chagas em humanos	77
Figura 3.2 - Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	78
Figura 3.3 - Resumo da imunopatogênese da infecção por <i>T. cruzi</i> e alterações da resposta imune causando reativação da doença.....	80
Figura 3.4 - Distribuição do número de pacientes com reativação chagásica de acordo com o tempo pós-transplante.....	92

Lista de Abreviaturas

BEM: biópsia endomiocárdica
CAM: molécula de adesão celular
CD4+: cluster de diferenciação 4
COII: citocromo oxidase subunidade II
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: desoxinucleotídeos trifosfato
DTU: *discrete typing or taxonomic units*
ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
EWH: Equilíbrio de *Hardy- Weinberg*
GDE: genes diferencialmente expressos
GPI: glicose-6-fosfato isomerase
HC-UFGM: Hospital das Clinicas da UFGM
HE: Hematoxilina/ eosina
HI: Hemaglutinação Indireta
HSP60: proteína de choque térmico 60
IC: intervalo de confiança de 95%
IFI: imunofluorescência indireta
IFN- γ : interferon- γ
Ig: anti-imunoglobulina
IL1: gene da interleucina 1
IL-1: interleucina 1
IL-1 α : interleucina 1 α
IL-1 β : interleucina 1 β
IL-1ra: receptor antagonista da interleucina 1
IL-2: interleucina-2
IL-4: interleucina 4
IL6: gene da interleucina 6
IL-6: interleucina 6
IL10: gene da interleucina 10
IL-10: interleucina 10
IL-12: interleucina 12
IL-13: interleucina 13
IL17: gene da interleucina 17

IL-17: interleucina 17
IL-17A: interleucina 17A
IL-17F: interleucina 17F
IL-18: interleucina 18
kDNA: DNA do cinetoplasto
LSSP-PCR: *Low Stringency Single Specific Primer Polymerase Chain Reaction*
MHC: complexo de histocompatibilidade principal
MLEE: análise de variantes eletroforéticas de isoenzimas
MLS- PCR: *minicircle lineage specific- PCR*
ng: nanograma
NK: célula *natural killer*
OR: *Odds Ratio*
PCR: *polymerase chain reaction*
RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*
rDNA: DNA ribossomal
RFLP: *restriction Fragment Length Polymorphisms*
rpm: rotação por minuto
rRNA: RNA ribossomal
SNC: sistema nervoso central
SNP: *single nucleotide polymorphism*
STR - *short tandem repeats*
T. cruzi: Trypanosoma cruzi
Tc: *Trypanosoma cruzi*
TGF- β : fator de transformação do crescimento β
Th1: subpopulação de células T CD4+ auxiliares 1
Th17: subpopulação de células T CD4+ auxiliares 17
TNF- α : fator de necrose tumoral- α
TNF- β : fator de necrose tumoral- β
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
 X^2 : qui-quadrado
 μL : microlitro

Sumário

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Lista de Tabelas e Gráficos	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Prefácio	xiii
CAPÍTULO 1 – Utilização de diagnóstico molecular para acompanhamento de pacientes chagásicos cardiopatas transplantados	vii
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	8
1.2. Apresentação clínica da doença de Chagas	8
1.3. Transplante cardíaco	10
1.4. Imunossupressão e reativação da doença de Chagas.....	11
1.5. Acompanhamento ambulatorial pós-transplante cardíaco.....	14
1.6. Métodos diagnósticos da doença de Chagas	14
1.6.1. Diagnóstico de reativação.....	16
1.6.2. Diagnóstico bioquímico-molecular	17
1.7. Justificativa e objetivos	19
1.8. Material e métodos	20
1.8.1. Pacientes e amostras.....	20
1.8.2. Diagnóstico molecular do <i>T. cruzi</i>	21
1.8.2.1. Preparação do DNA genômico do <i>T. cruzi</i>	21
1.8.2.2. PCR para controle da extração do DNA	21
1.8.2.3. PCR kDNA.....	21
1.8.2.4. PCR em tempo real do gene rDNA 24Sa.....	22
1.8.2.5. Métodos de análise dos produtos da PCR	22
1.8.3. Análises estatísticas	23
1.8.4. Estudo imuno-histoquímico	23
1.8.4.1. Preparação do anticorpo	23
1.8.4.2. Reação imuno-histoquímica	23
1.8.4.3. Amostras e controles	24
1.9. Resultados e discussão	25
1.9.1. Perfil dos pacientes.....	25
1.9.2. Reativação chagásica após o transplante.....	27
1.9.3. Diagnóstico molecular.....	32
1.9.4. Diagnóstico por imuno-histoquímica	35
1.10. Publicações da autora relacionadas ao capítulo	37
CAPÍTULO 2– Genotipagem e estudo da variabilidade genética do <i>Trypanosoma cruzi</i> presente em amostras biológicas de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados	55
2.1. Diversidade intraespecífica do <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
2.2. Genotipagem das seis principais DTUs de <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
2.3. Epidemiologia e implicações clínicas das DTUs de <i>T. cruzi</i>	61
2.4. Justificativa e objetivos	63
2.5. Material e métodos	64
2.5.1. Pacientes e amostras.....	64
2.5.2. Métodos utilizados para a caracterização das subpopulações de <i>T. cruzi</i>	64
2.5.2.1. PCR-RFLP do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II	65
2.5.2.2. Amplificação da região intergênica dos genes miniéxon	66
2.5.2.3. Amplificação da região 3' do gene rDNA 24 Sa	67
2.5.2.4. Métodos de análise dos produtos da PCR	67
2.5.2.5. PCR de microssatélites diretamente em tecidos de pacientes chagásicos	67
2.6. Resultados e discussão	68

2.6.1. Caracterização das seis DTUs principais de <i>T. cruzi</i> diretamente de amostras de tecidos de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.	68
2.6.2. Análise de polimorfismos de microssatélites	73
CAPÍTULO 3- Genotipagem e estudo dos polimorfismos genético do hospedeiro associados à evolução da cardiomiopatia chagásica	76
3.1. Aspectos gerais da resposta imune na doença de Chagas	77
3.2. Polimorfismos genéticos e seus possíveis envolvimento na cardiomiopatia chagásica crônica	80
3.3. Polimorfismos genéticos e seus possíveis envolvimento na rejeição do transplante	83
3.4. Interleucinas	84
3.4.1. IL-1	84
3.4.2. IL-6	84
3.4.3. IL-10	85
3.4.4. IL-17	86
3.5. Justificativa e objetivos	87
3.6. Metodologia	88
3.6.1. Pacientes e amostras	88
3.6.2. Extração do DNA	88
3.6.3. Determinação da concentração de DNA das amostras	88
3.6.4. Genotipagem dos polimorfismos	88
3.6.5. Análise estatística	90
3.7. Resultados e discussão	90
3.7.1. IL-1 α	93
3.7.2. IL-6	96
3.7.3. IL-10	99
3.7.4. IL-17A	103
CAPÍTULO 4- Estudo de mecanismos moleculares envolvidos no tropismo placentário diferencial de populações de <i>Trypanosoma cruzi</i>	108
4.1. Tropismo tecidual	109
4.2. Transmissão congênita	110
4.3. Justificativa e objetivos	111
4.4. Material e métodos	112
4.4.1. Abordagem experimental e coleta de amostras	112
4.4.2. Estoques de <i>T. cruzi</i>	112
4.4.3. Microarray	113
4.4.4. Determinação da carga parasitária e caracterização de <i>T. cruzi</i> nas amostras	113
4.4.5. Análise de polimorfismo nas assinaturas de kDNA e de polimorfismos de microssatélites	113
4.5. Resultados e discussão	114
4.6. Publicação da autora relacionada ao capítulo:	116
CAPÍTULO 5- Considerações finais	137
CAPÍTULO 6- Conclusão geral	153
CAPÍTULO 7- Referências Bibliográficas	157

Prefácio

Os mecanismos patogênicos envolvidos na evolução diferencial da doença de Chagas são complexos e ainda não foram totalmente esclarecidos, mas tanto fatores associados ao parasito quanto ao hospedeiro possuem papel importante nesse desfecho. Por um lado, é certo que a ocorrência de tropismo diferencial do *Trypanosoma cruzi* desempenha um papel fundamental na patogenia durante as fases aguda e crônica da doença, embora ainda não se saiba por que alguns pacientes evoluem para a forma clínica mais grave da doença de Chagas (forma cardíaca) enquanto outros permanecem na forma indeterminada. Por outro lado, devido à importância dos mecanismos inflamatórios para a patogênese dessa enfermidade, a susceptibilidade genética à cardiomiopatia pode ser resultado de polimorfismos genéticos do hospedeiro que levem a variações na intensidade da resposta imune e em níveis de citocinas e quimiocinas envolvidas na patogênese da doença. No estágio mais avançado da cardiopatia chagásica crônica, o transplante de coração pode ser a única opção terapêutica válida. No entanto, após o transplante, o diagnóstico diferencial de rejeição celular do implante ao da reativação chagásica, tem sido considerado difícil pelas metodologias convencionais, dificultando o tratamento correto. Deste modo, estratégias bioquímico-moleculares surgem como ferramentas promissoras para o diagnóstico diferencial e estudos de epidemiologia molecular da cardiopatia chagásica. Nesse sentido, o presente trabalho tem quatro objetivos principais: (i) o desenvolvimento e aprimoramento de metodologias para o diagnóstico da reativação chagásica; (ii) o estudo dos fatores genéticos relacionados ao parasito e (iii) ao hospedeiro associados à cardiomiopatia chagásica humana; (iv) a investigação, por meio de abordagem experimental, das contribuições de fatores do parasito e do hospedeiro no tropismo tecidual diferencial placentário e a transmissão vertical. Assim, para o bem da clareza, o presente trabalho foi organizado em capítulos. Em cada capítulo há uma breve introdução específica sobre o tema a ser abordado, um pequeno relato sobre a metodologia utilizada, os principais achados e sua relevância para o conhecimento da área, assim como resultados posteriores àqueles publicados. O Capítulo 1 trata da utilização de ferramentas bioquímico-moleculares para o diagnóstico precoce da reativação chagásica em pacientes cardiopatas chagásicos transplantados no Hospital das Clínicas da UFMG. O Capítulo 2 trata da variabilidade intraespecífica das DTUs de *Trypanosoma cruzi* diretamente associados à cardiopatia chagásica. A variabilidade genética do paciente e seu papel na reativação chagásica e na rejeição pós-transplante cardíaco é o alvo do estudo do Capítulo 3. Por fim, no Capítulo 4, a análise de alguns

fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro durante a transmissão congênita experimental da infecção por *T. cruzi* é abordada. Ao longo do texto, para facilitar a sua identificação, referências a artigos desta autora e resultantes do presente trabalho são apresentados em negrito e estão anexados ao fim de cada capítulo. Alguns desses manuscritos foram realizados em colaboração com outros alunos de graduação e pós-graduação, e outros grupos de pesquisa, conforme identificados. No Capítulo 5 são apresentadas considerações finais sobre os principais achados obtidos ao longo deste trabalho e as perspectivas resultantes. Por último, no Capítulo 6 são pontuadas as principais conclusões deste estudo.

CAPÍTULO 1 – Utilização de diagnóstico molecular para acompanhamento de pacientes chagásicos cardiopatas transplantados

1.1. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Em 1909, Carlos Chagas descreveu a biologia desse parasito, assim como seus transmissores, seus reservatórios, sua epidemiologia, além da patologia e as manifestações clínicas dessa doença (Chagas, 1909).

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado, classificado na ordem Kinetoplastida e família *Trypanosomatidae*. Apresenta um ciclo de vida relativamente complexo, com algumas formas de desenvolvimento em hospedeiros vertebrados e invertebrados (Rey, 2001). Assim, desenvolve-se em insetos hematófagos da família *Reduviidae* e em dezenas de mamíferos silvestres e domésticos, incluindo o homem (Brenner, 1997). Pode se apresentar sob as formas amastigota, epimastigota e tripomastigota. Estas formas são definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e da presença ou ausência de flagelo livre e membrana ondulante (Hoare, 1964).

As formas de transmissão desse protozoário podem ser vetorial (através do contato do hospedeiro suscetível com as fezes do triatomíneo hematófago infectado), transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão congênita, acidentes de laboratório ou via oral (Jackson *et al.*, 2010). Apesar dos incontestáveis avanços alcançados nas últimas décadas em relação ao controle da transmissão vetorial e transfusional dessa infecção, ainda há incidência de 29 mil novos casos e morte de 12.000 indivíduos por ano, com 6.000 apenas no Brasil (Martins-Melo *et al.*, 2014, Dias *et al.*, 2016).

Mesmo tendo sido descoberta há mais de 100 anos, a doença de Chagas ainda representa um sério problema de saúde pública em 21 países da América Latina, onde estima-se que 5,7 milhões de pessoas estão infectadas (1,2 milhões no Brasil) e cerca de 25 milhões de pessoas estão em situações de risco (WHO 2010; 2015). Além disso, o fenômeno migratório tem globalizado essa enfermidade, sendo crescente o número de casos relatados na América do Norte, Europa e Ásia, gerando implicações não somente do ponto de vista epidemiológico, mas também para os grandes centros de transplante de órgãos e hemocentros (Milei *et al.*, 2009; Guerri-Guttenberg *et al.*, 2009; Kransdorf *et al.*, 2013; Yasukawa *et al.*, 2014; Traina *et al.*, 2015).

1.2. Apresentação clínica da doença de Chagas

A análise de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes portadores da doença de Chagas permite subdividir o curso da infecção em fase aguda e fase crônica. A fase aguda classicamente está associada à infecção primária mas uma forma similar a essa fase

também pode ser identificada no processo de reatização ou reativação da fase crônica da infecção. Na fase crônica, a evolução do quadro clínico pode ocorrer de quatro diferentes formas: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (Andrade *et al.*, 2011).

A fase aguda da doença de Chagas ocorre depois de um curto período de incubação, cerca de sete a dez dias, e persiste por quatro a oito semanas (Rassi Jr *et al.*, 2010). É caracterizada pela elevada parasitemia circulante, alto parasitismo tissular, e o quadro clínico manifesta-se por mal-estar, febre, sudorese, dores musculares, irritação, anorexia, edema e, às vezes, vômitos e diarreia. Embora menos frequente, também pode ocorrer taquicardia, esplenomegalia, hepatomegalia, erupções cutâneas e, em alguns casos, sinais de envolvimento do sistema nervoso central (meningoencefalite aguda) (Laranja *et al.*, 1956; Andrade *et al.*, 2011).

Quando decorrente de transmissão por via vetorial, a infecção inicial pode ser, ainda, acompanhada por sinais e sintomas locais resultantes da invasão do parasito. O sinal de porta de entrada é geralmente uma lesão inflamatória da pele, denominada chagoma de inoculação. Caso o local de penetração seja a região ocular, pode ocorrer conjuntivite acompanhada de edema palpebral unilateral e adenopatia satélite preauricular (sinal de Romana), considerado por muito tempo como sinal característico da doença de Chagas aguda (Prata, 2001).

Na maioria dos indivíduos infectados, as manifestações clínicas da fase aguda da doença desaparecem entre dois a quatro meses após o seu início, e o parasito passa a ser raramente detectado no sangue periférico, caracterizando a fase crônica da doença (Prata, 2001). Nessa fase, cerca de 60 a 70% dos pacientes não desenvolvem uma forma clínica aparente da doença. Esses pacientes apresentam a forma indeterminada da doença, que se caracteriza por possuir positividade para sorologia e/ou exames parasitológicos para *T. cruzi*, mas não apresentar sintomas clínicos específicos, sinais físicos ou evidências de lesões orgânicas (alteração anatômica) ao eletrocardiograma e na radiografia do tórax, bem como nos exames radiológicos para o peito, esôfago e cólon (Andrade *et al.*, 2011). No entanto, por motivos ainda não esclarecidos, cerca de 30 a 40% dos indivíduos infectados desenvolvem ao longo dos anos, manifestações clínicas relacionadas a certos órgãos, tais como coração, esôfago e cólon, e eventualmente, ao sistema nervoso central, caracterizando as formas clínicas da doença chagásica crônica.

A forma digestiva possui prevalência de sete a 10% e é representada por alterações estruturais e funcionais do intestino e/ou esôfago, tendo como manifestação mais comum

o megaesôfago e/ou megacólon. A forma nervosa é considerada rara e manifesta-se principalmente em pacientes imunossuprimidos. Já a cardíaca, constitui a forma mais importante e grave da doença de Chagas, em função de sua frequência significativa – desenvolve-se em 20 a 30% dos indivíduos – mas, sobretudo, pelas graves consequências médico-sociais dela decorrentes: insuficiência cardíaca congestiva, arritmias e tromboembolismo (Rassi Jr *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011).

1.3. Transplante cardíaco

Em 1967, na África do Sul, Christian Barnard realizou o primeiro transplante cardíaco humano no mundo (Barnard, 1967). Embora o paciente tenha vivido apenas 18 dias (devido a infecções) esse feito histórico despertou grande interesse nos centros de cirurgia cardíaca de todo o mundo. Assim, apenas seis meses do primeiro transplante cardíaco no mundo, o cardiologista brasileiro Euryclides Zerbini realizou o primeiro transplante cardíaco no Brasil, sendo o quinto país no mundo a realizar este procedimento cirúrgico (Noedir *et al.*, 2012).

Atualmente, o transplante cardíaco é a abordagem cirúrgica considerada padrão-ouro no tratamento da insuficiência cardíaca refratária, situação na qual o paciente apresenta grande limitação funcional e elevada mortalidade (Mangini *et al.*, 2015). O transplante traz melhoras significativas na qualidade de vida e aumenta a sobrevida dos pacientes em 12- 13 anos (Alba *et al.*, 2016).

Dentre as diversas etiologias da insuficiência cardíaca, a miocardiopatia chagásica é considerada a mais agressiva (Rassi Jr *et al.*, 2009; Dinardi *et al.*, 2012). Ela é caracterizada por infiltrado inflamatório focal ou disseminado, citólise e necrose de cardiomiócitos com fibrose progressiva, que resultam em danos à matriz extracelular e substituição de miócitos cardíacos e células vasculares por tecido fibroso, com a remodelação do miocárdio (Andrade & Andrade, 1955; Andrade & Lopes, 1963). O exame clínico desses pacientes revela cardiomegalia significativa. Os ventrículos apresentam-se dilatados e com aneurismas de ponta, além da elevada prevalência de fibrilação atrial em estágios mais avançados (Punukollu *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2011). Nesses estágios, o único meio de reverter o quadro dos pacientes cardiopatas, e restaurar suas condições hemodinâmicas, é o transplante de coração (Dinardi *et al.*, 2012).

Em 1985, foi realizado o primeiro transplante cardíaco em paciente com cardiopatia chagásica crônica no Brasil (Benatti *et al.*, 2017). E, embora seja necessário um seguimento diferenciado quando esse procedimento cirúrgico é realizado nos

pacientes cardiopatas chagásicos, devido ao maior número de comorbidades, incluindo neoplasia e reativação da infecção, esse tipo de transplante tem mostrado benefícios iguais, ou até mesmo superiores, comparado às outras cardiopatias (Montera *et al.*, 2013). Um dos motivos aventados para esse inicialmente inesperado achado, é que os pacientes chagásicos geralmente são mais jovens e possuem menores taxas de reoperações ou hipertensão pulmonar grave (Bestetti *et al.*, 2009). Dessa forma, na Europa Central e na América do Sul, a presença da doença de Chagas no destinatário não representa mais contraindicação para o transplante de órgãos (Prata, 2001).

O Brasil tem ocupado cada vez mais destaque no campo dos transplantes, principalmente na América Latina, além de ser referência no transplante cardíaco de etiologia chagásica, guiando condutas que são incorporadas no mundo todo (Bacal *et al.*, 2009). A doença de Chagas é a causa de cerca de 20% dos casos de insuficiência cardíaca refratária nos grandes centros e é a terceira principal indicação para o transplante cardíaco no país (Bocchi *et al.*, 1996; 2001a).

Na década de 2008 a 2018, ocorreram 2894 transplantes de coração no Brasil, e existe uma perspectiva de aumento progressivo deste número (ABTO, 2018). Somente em 2017, houve um crescimento de 14% na taxa de doadores efetivos no país e foi alcançado um recorde histórico, a realização de 380 transplantes cardíacos em um único ano (ABTO, 2018).

Mesmo com os recordes observados, o Brasil ocupa nível intermediário de doações, com 16,9 doações por milhão de população (pmp) por ano, comparado aos países mais desenvolvidos, que possuem, em média, 35 doações pmp por ano. Entretanto, alguns estados como Paraná e Santa Catarina já apresentam taxas semelhantes às dos países desenvolvidos (ABTO, 2018).

Minas Gerais possui um nível de doadores efetivos de 9,7 pmp por ano, muito a baixo da média do país. Esse dado é ainda mais significativo, considerando que, atualmente, Minas Gerais possui o terceiro maior número de transplantes cardíacos por ano no Brasil (ABTO, 2018). E nesse cenário, o Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), credenciado em 2006 para esse tipo de transplante, é o hospital referência em transplantes cardíacos no Estado.

1.4. Imunossupressão e reativação da doença de Chagas

Os primeiros transplantes realizados no mundo apresentavam resultados insatisfatórios, com elevada mortalidade decorrente principalmente de rejeições. Assim,

no final dos anos 1970, com o surgimento da ciclosporina (droga imunossupressora) e o melhor controle da rejeição, ocorreu um grande desenvolvimento na realização dos transplantes, incluindo o transplante cardíaco (Mangini *et al.*, 2015).

Atualmente, o esquema tríplice de imunossupressores, incluindo o uso de corticosteroide (prednisona ou metilprednisolona), de inibidor de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus) e de antiproliferativo (micofenolato ou azatioprina), é o mais utilizado na rotina da maioria dos centros de transplantes (Taylor *et al.*, 2008), seguindo as recomendações apresentadas na Tabela 1.1 (Lund *et al.*, 2015).

Tabela 1.1 - Principais imunossupressores utilizados pós-transplante e recomendações de uso

<i>Drogas</i>	<i>Via de administração</i>	<i>Dose</i>
Prednisona	Oral	1 mg/kg
Metilprednisolona	Venosa	500-1000 mg até 3° PO
Ciclosporina	Oral	3-8 mg/kg/dia
	Venosa	1-2 mg/kg/dia
Tacrolimus	Oral	0,05-0,1 mg/kg/dia
Azatioprina	Oral	1,5-2,5 mg/kg/dia
Micofenolato de mofetila	Oral	500-1.000 mg a cada 12 horas
Micofenolato sódico	Oral	360-720 mg a cada 12 horas
Sirolimus	Oral	Dose inicial 6 mg, depois 2 mg/dia
Everolimus	Oral	0,5-1,5 mg a cada 12 horas

Legenda: PO: pós-operatório. **Fonte:** Adaptado de Lund *et al.* 2015.

Os corticosteroides são agentes anti-inflamatórios não-específicos que interrompem a apresentação de antígenos, a produção de citocinas e a proliferação de linfócitos. Embora altamente efetivos na prevenção e no tratamento da rejeição, seu uso prolongado pode causar diversos efeitos adversos. Assim, os corticosteroides são administrados em altas doses logo após o transplante, e em doses progressivamente menores, até a sua descontinuação, que geralmente ocorre entre o sexto e 12° mês pós-transplante (Bacal *et al.*, 2018).

Os inibidores de calcineurina bloqueiam a ativação dos linfócitos T e sua proliferação, visto que, a calcineurina é responsável pela transcrição de interleucina-2 (IL-2), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator estimulador do crescimento de

macrófagos e interferon- γ (IFN- γ). Já os antiproliferativos, inibem a proliferação dos linfócitos T e B, interferindo na síntese dos ácidos nucleicos (Bacal *et al.*, 2018).

Devido à persistência parasitária em alguns órgãos do receptor, um fator preocupante do uso dos imunossupressores por pacientes chagásicos transplantados é o risco da reativação da infecção (Benvenuti *et al.*, 2005).

Dados diversos demonstram que a maior incidência de reativação da doença de Chagas em pacientes transplantados ocorre no primeiro ano pós-transplante, quando a imunossupressão está mais acentuada para prevenção de rejeição celular (Dinardi *et al.*, 2012). Além disso, alguns estudos associam as maiores taxas de reativação com o uso do micofenolato (Bacal *et al.*, 2005; Bestetti *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2008). Assim, parte da comunidade médica recomenda que os pacientes chagásicos recebam imunossupressão na menor dose possível e que se considere a utilização de azatioprina ou doses menores de micofenolato, e que apenas em situações de rejeição grave ou persistente de pacientes, que já utilizavam azatioprina cronicamente, haja a conversão por micofenolato (Bacal *et al.*, 2018). Todavia, devido a experiência acumulada e aos bons resultados alcançados, no HC-UFG os pacientes recebem preferencialmente tratamento com prednisona, ciclosporina e micofenolato mofetil.

Em geral, cerca de 30 a 90% dos pacientes chagásicos apresentam pelo menos um episódio de reativação chagásica da doença após o transplante (Bocchi *et al.*, 1996; Souza *et al.*, 2001; Bestetti *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2017), sendo o número médio de episódios de reativação ao longo da vida de aproximadamente 2,5 por paciente (Revisado por Machado *et al.*, 2012). Apesar da frequente reativação da infecção, esta raramente constitui causa de óbito, e, em longo prazo, a sobrevida dos pacientes chagásicos transplantados é considerada muito boa (Bocchi *et al.*, 2001b).

A reativação da infecção pelo *T. cruzi* em pacientes chagásicos transplantados pode ocorrer em qualquer tecido do organismo, sendo, em geral, mais frequente no coração, tecido subcutâneo, cérebro, sangue e outros (Bacal *et al.*, 2010; Marchiori *et al.*, 2007). A reativação clínica, por sua vez, pode apresentar manifestações cardíacas como miocardite, disfunção ventricular, arritmias, bloqueios atrioventriculares ou intraventriculares no eletrocardiograma e/ou manifestações extracardíacas como lesões cutâneas, febre, acometimento de medula óssea ou ocorrências neurológicas (Bacal *et al.*, 2018).

1.5. Acompanhamento ambulatorial pós-transplante cardíaco

Após o transplante cardíaco, é necessária a monitoração continuada dos pacientes em decorrência das potenciais comorbidades do transplante, que são: rejeição, infecção, doença coronariana, neoplasia e complicações relacionadas à imunossupressão.

Os pacientes transplantados devem ser avaliados conforme critério médico, visitas ambulatoriais, ecocardiograma, eletrocardiograma, radiografia de tórax, dosagem de inibidor de calcineurina, dosagem de eletrólitos, enzimas hepáticas, hemograma e biópsias endomiocárdicas (Bacal *et al.*, 2009). No caso dos chagásicos, também se recomenda exames laboratoriais para monitoramento da reinfeção do parasito.

A periodicidade das avaliações ambulatoriais e biópsias endomiocárdicas é razoavelmente similar entre os diferentes centros de transplante e está relacionada na Tabela 1.2, de acordo com o protocolo seguido pelo HC-UFG.

Tabela 1.2 - Protocolo da periodicidade das revisões ambulatoriais e biópsias endomiocárdicas

<i>Período pós-transplante</i>	<i>Revisão Ambulatorial</i>	<i>Biópsias</i>
0–4 semanas	Semanal com revisão completa*.	Semanal
4–12 semanas	Semanal com laboratório Quinzenal com revisão completa*.	Quinzenal
3–6 meses	Quinzenal/Mensal com revisão completa.	Mensal
6–12 meses	Mensal com revisão completa*.	Trimestral.
> 12 meses	Trimestral com revisão completa*.	Anual.

Nota. *Revisão completa: eletrocardiograma, ecocardiograma, hemograma, leucograma, eletrólitos, níveis séricos de imunossupressor. **Fonte:** Modificado de Bacal *et al.*, 2009.

1.6. Métodos diagnósticos da doença de Chagas

O diagnóstico clínico-laboratorial da doença de Chagas pode ser realizado por meio da busca do parasito ou de anticorpos dirigidos contra o mesmo, sendo orientado em função da fase clínica da infecção.

Na fase aguda da doença, observa-se alta parasitemia, sendo que o parasito pode ser encontrado em quase todos os órgãos e em vários tipos celulares (Lana *et al.*, 1998). Assim, convencionalmente, recomenda-se a pesquisa direta de tripomastigotas sanguíneos (por meio de exame de sangue a fresco, esfregaço ou gota espessa), busca pela detecção do parasito em tecidos, além do emprego de métodos parasitológicos indiretos, como xenodiagnóstico e hemocultura (Avila *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 2009).

Na pesquisa direta de tripomastigotas sanguíneos (exame de sangue a fresco), uma gota de sangue é coletada e examinada em um microscópio óptico com aumento de 400X, sendo necessário examinar pelo menos 200 campos microscópicos para se concluir pela negatividade (Gomes, 1996). O xenodiagnóstico consiste em investigar a presença do parasito nas fezes e/ou conteúdo intestinal de insetos vetores alimentados com sangue dos indivíduos que serão diagnosticados (Brumpt, 1914). Na técnica de hemocultura, é realizada a coleta de 30 mL de sangue periférico na presença de heparina e, posteriormente, a amostra é centrifugada e o sedimento lavado em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), por meio de nova centrifugação. Após 15, 30 e 45 dias de incubação, as amostras são analisadas para a presença de parasitos por microscopia (Chiari *et al.*, 1989).

A fase crônica da doença de Chagas caracteriza-se por baixo nível de parasitemia e alto nível de anticorpos, então, nessa fase, há alta indicação da utilização dos testes sorológicos para o diagnóstico. Esses se baseiam na detecção de imunoglobulinas específicas contra o parasito, tais como os testes de imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação (HI) e *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) (Fife & Muschel, 1959; Neal & Miles, 1970; Voller *et al.*, 1975).

A IFI é baseada na interação das formas epimastigotas de *T. cruzi* com anticorpos específicos anti-*T. cruzi* que podem estar presentes no soro do paciente. Os anticorpos anti-*T. cruzi* são revelados com o uso de anticorpos anti-imunoglobulina (Ig) humana conjugados a fluoresceína, e observados ao microscópio de fluorescência (Fife & Muschel, 1959). A HI baseia-se na aglutinação de hemácias de mamíferos ou aves previamente sensibilizadas com antígenos *T. cruzi* em presença de soro que contenha anticorpos específicos para este parasito. Na presença de anticorpos anti-antígenos de *T. cruzi*, os mesmos formam ligações entre as hemácias, interagindo com os antígenos na sua superfície e visualmente pode se observar um manto nas placas de microtitulação (Neal & Miles, 1970). A ELISA, por sua vez, é um teste imunoenzimático que se baseia na interação antígeno-anticorpo revelada por um cromógeno ativado pela reação específica entre enzima e substrato.

O Ministério da Saúde recomenda a realização um teste de elevada sensibilidade em conjunto com outro de alta especificidade, considerando o resultado positivo quando os dois testes são reagentes, sendo preferencialmente um destes o de ELISA (MS, 2013). Isso se faz necessário porque, embora, os testes imunológicos exibam considerável sensibilidade, é comum a observação de problemas de especificidade devido às reações

cruzadas com antígenos de outros parasitos, principalmente com os do gênero *Leishmania* e com *Trypanosoma rangeli* (Almeida *et al.*, 2012).

No contexto do transplante cardíaco, os testes sorológicos são úteis para o diagnóstico da doença de Chagas em potenciais doadores, receptores — para o estabelecimento da etiologia da cardiopatia —, e em receptores que recebem órgãos de doadores soropositivo (Bacal *et al.*, 2018).

1.6.1. Diagnóstico de reativação

No caso dos pacientes chagásicos transplantados, além do protocolo de vigilância de rejeição, é realizada a monitoração laboratorial afim de se identificar qualquer sinal subclínico de reativação chagásica, antes do estabelecimento das manifestações clínicas (Andrade *et al.*, 2011).

Para isso, a biópsia endomiocárdica (BEM) é considerada o método de rastreio padrão-ouro na detecção da rejeição e reativação chagásica após o transplante cardíaco. Trata-se de um procedimento percutâneo que consiste na obtenção de quatro a seis fragmentos, com tamanho de um a dois milímetros, do septo interventricular direito para análise microscópica, por meio de punção de veia jugular ou femoral, guiado por fluoroscopia.

Por ser um método invasivo, a BEM não é isenta de complicações, embora essas sejam raras e habitualmente sem sequelas a longo prazo, como: perfuração, tamponamento cardíaco, arritmias, pneumotórax, dano à valva tricúspide, dentre outras (Cooper *et al.*, 2007). O risco de complicações graves é, em geral, baixo (menor que 1%) e os pacientes recebem alta após duas horas de observação clínica (Fowles *et al.*, 1982; Moreno *et al.*, 2004).

Na presença de lesões cutâneas, acometimento de medula óssea ou manifestações neurológicas pós transplante, também são recomendados a análise de biópsias de pele e medula e o exame de líquido (Andrade *et al.*, 2011).

Para o diagnóstico da reativação chagásica, utilizam-se, geralmente, os métodos parasitológicos — pesquisa direta de tripomastigotas sanguíneos e hemocultura — e histológicos — procura de amastigotas nas biópsias —, apesar destes serem testes com alta especificidade, mas com baixa sensibilidade (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003; Gomes *et al.*, 2009).

A rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante, por sua vez, pode ser mediada por anticorpos (humoral) ou por células (celular). Do ponto de vista histológico, a rejeição

humoral, caracteriza-se principalmente pela presença de lesão dos capilares miocárdicos com edema das células endoteliais e acúmulo de macrófagos ativados no interior. Já a rejeição aguda celular é determinada pelo infiltrado inflamatório predominante linfocitário no miocárdio, que pode estar associado a evidências de injúria miocárdica. A rejeição do enxerto mediada por células pode ser classificada em quatro graus, por meio da análise histopatológica da BEM (Stewart *et al.*, 2005) (Tabela 1.3).

Quando é verificada a presença de ninhos de amastigotas durante a análise histopatológica da BEM, o diagnóstico de reativação chagásica é afirmado. Todavia, o diagnóstico diferencial entre rejeição aguda celular e reativação chagásica ainda é considerado um desafio, pois o infiltrado inflamatório em ambas as situações é morfolologicamente indistinguível e as formas intracelulares do parasito, por serem escassas, raramente são encontradas (Andrade *et al.*, 2011, Benvenuti *et al.*, 2005).

Dessa forma, permanece o risco de que a miocardite chagásica possa ser equivocadamente diagnosticada como rejeição do enxerto e ser tratada com intensificação do tratamento imunossupressor, ao invés de terapia específica contra *T. cruzi*, agravando a reativação.

Tabela 1.3 - Classificação de rejeição celular em enxerto cardíaco

<i>Classificação</i> (2005)	<i>Achados histopatológicos</i>
Grau 0R	Ausência de infiltrado inflamatório
Grau 1R	Infiltrado inflamatório linfo-histiocitário ou intersticial geralmente discreto, sem dano celular ou com foco único de agressão dos cardiomiócitos
Grau 2R	Infiltrado inflamatório linfo-histiocitário multifocal com dois ou mais focos de agressão dos cardiomiócitos
Grau 3R	Infiltrado inflamatório linfo-histiocitário difuso, geralmente com presença de polimorfonucleares associado a múltiplos focos de agressão dos cardiomiócitos

Fonte: Adaptado de Stewart *et al.*, 2005

1.6.2. Diagnóstico bioquímico-molecular

O desenvolvimento de métodos alternativos no campo bioquímico-molecular vem modificando e aperfeiçoando o diagnóstico da doença de Chagas, representando opções para complementar ou estabelecer o diagnóstico das infecções pelo *T. cruzi*, incluindo os casos de reativação chagásica pós-transplante.

A imuno-histoquímica tem sido utilizada há mais de 30 anos para o diagnóstico de Chagas, principalmente na fase aguda da doença e nos casos de fase crônica com inflamação ativa, e se baseia no princípio da ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico. Este método facilita a identificação do parasito, sobretudo de ninhos pequenos e escassos, quando comparado ao exame anatomopatológico convencional (Barbosa *et al.*, 1985; 1986). Estudos anteriores demonstraram que antissoro policlonal anti-*T. cruzi* evidencia o parasito tanto em tecidos humanos quanto de outros animais (Pittella *et al.* 1990; Caliari *et al.* 2002; Fuenmayor *et al.* 2005). Considerando a perspectiva do uso da imuno-histoquímica para o diagnóstico de reativação da infecção chagásica pós-transplante cardíaco esta técnica pode ser útil na detecção do parasito em BEMs de acompanhamento após a cirurgia. Todavia, a falta de anticorpos comerciais disponíveis para esse diagnóstico ainda representa um obstáculo para a incorporação da imuno-histoquímica como um método de rotina.

Similarmente, a detecção do *T. cruzi* em tecidos de pacientes chagásicos crônicos, por meio de técnicas de biologia molecular, se apresenta como uma estratégia promissora. Isso, em parte, é facilitado visto que o genoma desse parasito é caracterizado pela abundância de sequências repetidas de DNA, que podem ser amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e utilizadas como alvo para a detecção e identificação do mesmo (Carriazo *et al.*, 1998). Assim, PCRs baseadas em diferentes abordagens, que visam amplificar o DNA do cinetoplasto (kDNA), o DNA nuclear ou DNA satélite, têm sido utilizadas com êxito para diagnosticar a infecção por *T. cruzi* (WHO, 2002). Além disso, a técnica de PCR tem mostrado alta sensibilidade associada a razoável especificidade (Luquetti & Rassi, 2000).

Devido ao seu alto número de cópias, os minicírculos do kDNA têm sido utilizados como alvos preferenciais para a detecção de *T. cruzi* por meio da PCR em diversos tipos de amostras, tais como sangue de animais experimentalmente infectados (Sturm *et al.*, 1989), fezes de triatomíneos (Britto *et al.*, 1995; Brenière *et al.*, 1995) sangue e soro de pacientes chagásicos (Avila *et al.*, 1991, 1993; Russomando *et al.*, 1992; Wincker *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 1998), além de tecidos cardíaco, esofágico e cólon de pacientes chagásicos crônicos (Vago *et al.*, 2000; 2003; Lages-Silva *et al.*, 2006; Schijman *et al.*, 2011). Entretanto, já foi questionado se sua utilização pode provocar resultados falso-positivos por supostamente evidenciar a amplificação de sequências de minicírculos de kDNA integradas no genoma do hospedeiro, ao invés do DNA do *T. cruzi* parasitando o hospedeiro (Teixeira *et al.*, 1994). Por outro lado, alguns ensaios que

amplificam outros genes já foram relatados, tendo mostrado melhor especificidade, mas, geralmente, com menor sensibilidade (Diez *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2005; Herwaldt *et al.*, 2000; Virreira *et al.*, 2003).

Nesse contexto, embora a utilização de técnicas moleculares para detecção do parasito no sangue periférico e no miocárdio dos pacientes transplantados venha sendo considerada, a maior parte dos trabalhos envolvendo o diagnóstico molecular foi realizada com um número pequeno de amostras e em curto período de acompanhamento, de forma que a sensibilidade e especificidade dos métodos utilizados ainda não puderam ser adequadamente avaliadas (Maldonado *et al.*, 2004, Diez *et al.*, 2007, Benvenuti *et al.*, 2011).

1.7. Justificativa e objetivos

No estágio mais avançado da cardiopatia chagásica crônica, o transplante de coração é uma opção terapêutica válida. No entanto, após o transplante, o diagnóstico diferencial de rejeição celular do implante *versus* da reativação da infecção chagásica, tem sido considerado difícil pelas metodologias convencionais, dificultando o tratamento correto.

Estratégias bioquímico-moleculares, tais como imuno-histoquímica e PCR têm surgido como ferramentas promissoras para a realização desse diagnóstico diferencial. Entretanto, apesar dos prováveis benefícios dessas estratégias comparado aos exames parasitológicos convencionais, barreiras ainda não contornadas limitam a utilização destas estratégias.

Por exemplo, não há anticorpos comerciais disponíveis para as análises de imuno-histoquímica e sua eficácia como exame de rotina ainda não está determinada.

Em relação aos diagnósticos baseados em PCR, eles têm revelado níveis variáveis de sensibilidade e especificidade, dependendo de uma série de fatores técnicos, tais como, o volume/tamanho da amostra coletada, as condições de conservação da amostra, os métodos utilizados para isolar o DNA, as sequências do parasito e iniciadores selecionados, os reagentes utilizados, bem como as condições dos ciclos de amplificação (Sturm *et al.*, 1989; Avila *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 1999; Maldonado *et al.*, 2004; Diez *et al.*, 2007; Benvenuti *et al.*, 2011; Schijman *et al.*, 2011)

Assim, visando contornar estas limitações no diagnóstico de reativação da infecção chagásica após o transplante, nosso objetivo, nesta fase do projeto, foi o

desenvolvimento e o aprimoramento de ferramentas de diagnóstico para a detecção do *T. cruzi* em amostras biológicas.

Para isso, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- I- Avaliar a possibilidade de utilização da técnica de PCR voltada para marcadores nucleares (rDNA 24S α) e mitocondriais (kDNA) como diagnóstico molecular da presença de *T. cruzi* em amostras biológicas oriundas de pacientes cardiopatas chagásicos submetidos a transplante cardíaco.
- II- Avaliar a possibilidade de utilização do diagnóstico molecular proposto para a identificação precoce de reativação da infecção chagásica em pacientes cardiopatas transplantados.
- III- Comparar a acurácia do diagnóstico molecular proposto com métodos parasitológicos de rotina e imuno-histoquímica na detecção da reativação da infecção pelo *T. cruzi* em amostras biológicas de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.

1.8. Material e métodos

1.8.1. Pacientes e amostras

Neste estudo, foi realizada a análise de 991 BEMs oriundas do monitoramento de 98 pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica, que foram submetidos a transplante cardíaco no HC- UFMG, no período entre 2008 e 2018.

Conforme mencionado anteriormente, a BEM é considerada padrão-ouro para a vigilância da rejeição do enxerto cardíaco. Assim, após o transplante, os pacientes foram submetidos a procedimentos periódicos para coletas de BEMs, conforme as bases de protocolo de vigilância de rejeição: semanais no primeiro mês após o transplante, quinzenais no segundo mês, mensais até o sexto mês e, a seguir trimestrais até completar um ano de transplante. Além disso, este procedimento foi adicionalmente realizado sempre que houve suspeita clínica de rejeição ou reativação da doença de Chagas (Bacal *et al.*, 2009).

Para o diagnóstico de reativação chagásica, foram considerados os sinais clínicos, laboratoriais e histológicos, tais como lesões cutâneas (nódulos subcutâneos, paniculite, entre outros), manifestação neurológica, disfunção ventricular, arritmias, bloqueios atrioventriculares/ intraventriculares, parasitemia e/ou ninhos de amastigotas nos tecidos

biológicos, seguindo as recomendações da Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco (Bacal *et al.*, 2018).

Como parte do protocolo para prevenção de rejeição do enxerto, os pacientes receberam preferencialmente tratamento com ciclosporina, micofenolato mofetil e prednisona seguindo as recomendações de uso contidas na Tabela 1.1.

Além disso, nenhuma terapia profilática anti-*T. cruzi*, pré ou pós-transplante, foi administrada aos pacientes. O tratamento com benzonidazol, na dose de 5 a 10mg/kg/dia, durante 60 dias, foi instituído apenas para os pacientes que tiveram diagnóstico confirmado de reativação da doença de Chagas.

Os pacientes participantes do presente estudo assinaram termo de consentimento livre esclarecido. Os objetivos e procedimentos constantes deste projeto foram submetidos e aprovados pelo CONEP (1570/2002) e COEP/UFMG (0564/2011).

1.8.2. Diagnóstico molecular do *T. cruzi*

1.8.2.1. Preparação do DNA genômico do *T. cruzi*

A extração do DNA de amostras embebidas em parafina ou conservadas em etanol foi realizada utilizando o kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Valencia, CA) ou o kit QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen, Valencia, CA), respectivamente. No caso das amostras parafinadas, para a extração de DNA foram realizadas 5 a 12 secções de 10 µm de espessura nos blocos. No caso das amostras conservadas em etanol, todo o fragmento da BEM foi utilizado.

1.8.2.2. PCR para controle da extração do DNA

Para o controle do procedimento e verificação da integridade do DNA extraído, foi realizada a amplificação de uma região polimórfica do DNA humano, utilizando os iniciadores MID-768-F (5'-CATTACCAGTAGAGTGGGGA-3') e MID-768-R (5'-CTATGCCCTACTGGATCTAGG-3') conforme descrito por Weber *et al.*, 2002. DNA extraído de *pool* humano foi utilizado como controle positivo e reagentes da PCR, sem adição de DNA, constituíram o controle negativo.

1.8.2.3. PCR kDNA

Para a detecção do DNA do *T. cruzi* foi realizada a amplificação específica do fragmento de 330 pb correspondente à região variável do minicírculo do kDNA empregando os iniciadores S35 (5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3') e S36 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3') (Wincker *et al.*, 1994).

Os produtos da amplificação foram visualizados por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata, de acordo com o protocolo descrito por Santos *et al.*, 1993 (item 1.8.2.5). DNA da cepa JG de *T. cruzi* foi incluído como controle positivo e componentes das reações de PCR, sem adição de DNA, como controle negativo.

1.8.2.4. PCR em tempo real do gene rDNA 24S α .

A amplificação do gene do rDNA foi realizada por meio de uma *hemi nested* PCR, como preconizada por Freitas *et al.*, 2005.

A primeira etapa de amplificação foi realizada usando os iniciadores D75 (5'-CAGATCTTGGTTGGCGTAG-3') e D72 (5'-TTTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3') e 5 μ L da solução contendo o DNA extraído (Souto *et al.*, 1993). As reações da segunda etapa de amplificação foram realizadas em aparelho de PCR em tempo real (ABI7900-Applied Biosystems) utilizando SYBR Green® PCR Master Mix Master (Applied Biosystems), com os iniciadores D71 (5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3') e D72, e 2 μ L do produto da primeira PCR como molde, seguido por identificação dos produtos a partir de curvas de dissociação (Freitas *et al.*, 2005).

Os controles positivos utilizados foram DNA de *T. cruzi* das DTUs TcI e TcII, constituídos pelo clone Col 1.7G2 (TM ~ 81°C) e cepa JG (TM ~ 76°C), respectivamente (para maiores informações ver capítulo 2). Já os controles negativos foram formados pelos componentes da PCR, sem adição de DNA.

1.8.2.5. Métodos de análise dos produtos da PCR

Os produtos da amplificação obtidos por meio das PCRs convencionais foram analisados em géis de poliacrilamida a 6%, corados pela prata (Santos *et al.*, 1993).

Uma alíquota de 5 μ L do produto amplificado, diluído com igual volume do tampão de amostra 2X foi aplicado no gel. Após a eletroforese, os géis foram transferidos primeiramente para a solução fixadora (10% etanol e 0,5% ácido acético) e posteriormente para solução de nitrato de prata (0,1%), sendo mantidos sob agitação lenta durante 15 minutos em cada etapa. Em seguida, o gel foi lavado rapidamente com água milli-Q e incubado em solução reveladora (3% NaOH (p/v) e 0,3% de formaldeído a 37%) durante tempo suficiente para o aparecimento das bandas. Então, a revelação foi interrompida com solução fixadora e o gel foi fotografado para documentação.

1.8.3. Análises estatísticas

O índice *kappa* foi calculado para avaliar a concordância entre as duas PCR's que foram utilizadas para o diagnóstico molecular (Fleiss, 1981). As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste exato de Fisher.

O programa MedCalc foi utilizado para a construção das curvas ROC de acordo com DeLong *et al.* (1988). As curvas de sobrevivência foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier pelo programa IBM SPSS Statistics 21.0.

1.8.4. Estudo imuno-histoquímico

Esta parte do trabalho foi realizada sob a coordenação do Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Federal de Minas Gerais, em colaboração com o Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

1.8.4.1. Preparação do anticorpo

Para a produção do anticorpo policlonal anti-*T. cruzi*, foram utilizados 3 coelhos da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 60 dias de idade, mantidos em gaiolas individuais no Centro de Ciência Animal da UFOP, com oferta de alimento e água *ad libitum*. A utilização, a manutenção e a manipulação dos animais seguiram as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com 10^7 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* obtidas de camundongos previamente infectados por essa cepa. Seis meses após o inóculo, os animais foram submetidos a anestesia geral, sendo realizada coleta de sangue total por punção cardíaca, com posterior eutanásia. O sangue permaneceu em temperatura ambiente em tubos de vidro de 10 ml cada por uma hora para formação de coágulo, sendo a seguir centrifugado a 3.500 RPM/10 min. O *pool* de soros obtido foi homogeneizado, aliquotado, identificado e armazenado a -80 °C até o momento dos testes.

1.8.4.2. Reação imuno-histoquímica

Os cortes histológicos das BEMs foram desparafinados em estufa a 56° C *overnight*, re-hidratados com banhos em xilol (três vezes por cinco minutos), álcool etílico 100% e 80% (três vezes por cinco minutos) e água corrente por cinco minutos. A recuperação antigênica induzida por calor foi realizada com solução de citrato de sódio 0,01M (pH = 6,0), a 90° C, por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram submetidos a bloqueio da peroxidase endógena em banho de metanol/peróxido de hidrogênio (100 ml de metanol e 3,5 ml de peróxido de hidrogênio a 30%), por 30 minutos, à temperatura ambiente, seguido de dois banhos em

solução de PBS a 10%, cinco minutos cada. Na sequência, as lâminas foram submetidas ao bloqueio de ligações inespecíficas pela imersão em banho de leite em pó desnatado diluído em PBS a 10% (seis gramas de leite desnatado em 100 ml de PBS), por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário diluído 1:400.000 em PBS/albumina bovina 1% (1870, Inlab, Diadema, Brasil), em câmara úmida, à temperatura ambiente, por uma hora, seguindo-se dois banhos em solução de PBS a 10%, cinco minutos cada. A seguir, os cortes foram incubados em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG (Novolink), seguindo-se dois banhos em solução de PBS a 10%, 5 minutos cada. Posteriormente, aplicou-se o complexo estreptavidina-peroxidase (Kit Dako, LSAB, K0675), sendo a preparação incubada por 30 minutos em câmara úmida, a 37° C. A revelação da reação da peroxidase foi feita mediante incubação em solução de DAB (50 mg de 3,3'-diaminobenzidina tetra-hidroclorato em 200 ml de PBS e 400µl de peróxido de hidrogênio 30%), durante cinco minutos. Para interromper a revelação, os cortes foram lavados em PBS por cinco minutos e, posteriormente, contra corados com hematoxilina de Harris diluída por três segundos. Depois, foram lavados em água corrente por cinco minutos, desidratados, diafanizados em xilol e montados com Entellan (Merck).

Após a reação, todos os cortes de cada fragmento de cada biópsia foram cuidadosamente analisados ao microscópio, inicialmente em visão panorâmica, em seguida em aumentos de 100X e 400X, à procura de sinais indicativos de antígenos-alvo do anticorpo testado. Cada sinal positivo de *T. cruzi* foi topografado e, posteriormente, comparado com os cortes corados pela hematoxilina e eosina (HE).

1.8.4.3. Amostras e controles

Como controles positivos foram selecionados 26 casos de exames anatomopatológicos corados por HE, contendo ninhos de amastigotas de *T. cruzi*: 13 BEMs, 12 biópsias de pele e cortes do ventrículo esquerdo e do septo interventricular de um coração explantado. Também foram selecionados 28 casos como controles negativos, constituídos de 10 fragmentos de corações explantados de pacientes não-chagásicos, 10 BEMs derivadas de pacientes transplantados não-chagásicos, seis biópsias positivas para leishmaniose, uma biópsia positiva para toxoplasmose e uma biópsia positiva para histoplasmose. Como casos de investigação foram utilizadas 31 BEMs, derivados de pacientes chagásicos transplantados, sem ninhos do parasito ao exame convencional em HE mas positivos para a metodologia de PCR proposta neste trabalho.

1.9. Resultados e discussão

1.9.1. Perfil dos pacientes

No Brasil, 12 estados abrigam os 34 centros atuantes no ramo de transplante cardíaco do país, sendo que Minas Gerais é, atualmente, o terceiro estado com maior número de transplantes de coração do país por ano, atrás apenas de São Paulo e Pernambuco (ABTO, 2018). Nesse cenário, o HC-UFMG é o centro de referência no estado de Minas Gerais, tendo além de grande volume, ótimos resultados pós-transplante, especialmente entre pacientes chagásicos (Moreira, 2011).

Entre 2008 e 2018, foram realizados 2893 transplantes cardíacos no país, sendo cerca de 10% (280) no HC-UFMG. Dos pacientes cardiopatas transplantados no HC-UFMG, nesse período, 115 eram pacientes chagásicos (41%), o que dá uma dimensão da relevância deste centro no transplante cardíaco associado à doença de Chagas (Tabela 1.4).

Dentre os pacientes chagásicos transplantados, 98 foram avaliados pelo nosso estudo (85,22%). Não foi possível a realização do monitoramento pós-transplante de 17 pacientes (14,78%), visto que 11 pacientes (9,56%) faleceram em até um mês após a cirurgia, e tivemos perda de acompanhamento em seis casos (5,22%).

Tabela 1.4 - Número anual de transplantes cardíacos realizados no Brasil e HC- UFMG

<i>Ano</i>	<i>N° de transplantes cardíacos no Brasil (Total)</i>	<i>N° de transplantes cardíacos no HC-UFMG (Total)</i>	<i>Porcentagem do n° de transplantes cardíacos (HC-UFMG/Brasil)</i>	<i>N° de transplantes cardíacos no HC-UFMG (Chagas)</i>	<i>Porcentagem do n° de transplantes cardíacos HC-UFMG (Chagas/Total)</i>
2008	201	25	12,44%	11	44,00%
2009	201	18	8,96%	9	50,00%
2010	166	24	14,46%	8	33,33%
2011	160	11	6,88%	6	54,55%
2012	228	27	11,84%	10	37,04%
2013	271	26	9,59%	15	57,69%
2014	311	32	10,29%	12	37,50%
2015	353	32	9,07%	10	31,25%
2016	356	26*	7,30%	13*	50,00%
2017	380	28	7,37%	11	39,29%
2018	266	31	11,65%	10	32,26%
TOTAL	2893	280	9,68%	115	41,07%

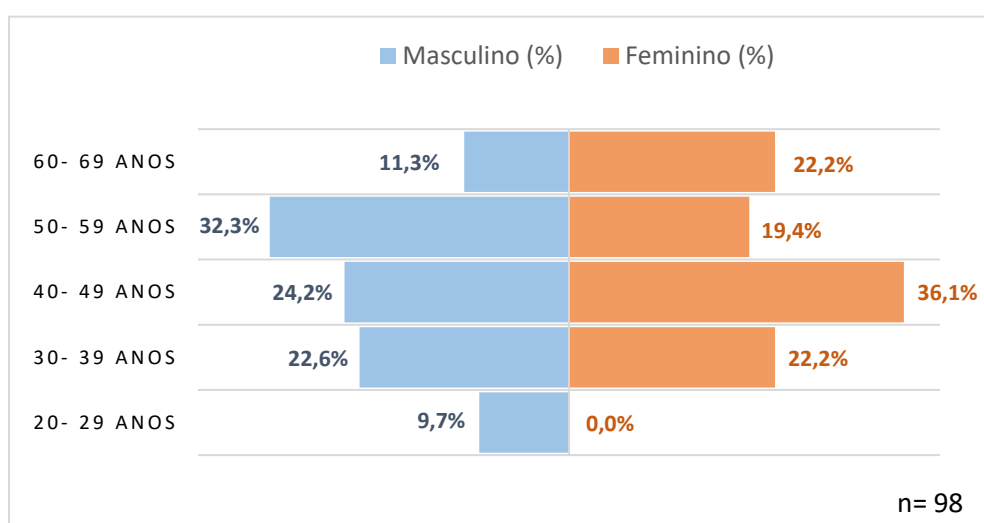
*Um paciente foi submetido ao transplante cardíaco duas vezes nesse período (2012 e 2016). Retransplantes não foram contabilizados nestes dados.

Em relação ao perfil dos pacientes acompanhados no presente estudo, 62 (63,27%) foram do sexo masculino. A média de idade, na data do transplante, entre homens e

mulheres, foi de 45,6 e 49 anos, respectivamente, sendo a faixa etária de maior prevalência de 50 a 59 entre os homens e 40 a 49 anos entre as mulheres (Gráfico 1.1).

Esses dados corroboram os relatos que mostram como alguns dos fatores de pior prognóstico para a cardiopatia chagásica crônica a idade entre 30-59 anos e sexo masculino (Laranja *et al.*, 1956; Coura *et al.*, 1985), uma vez que, por motivos ainda desconhecidos, a doença se mostra mais agressiva e há maior comprometimento miocárdico em pacientes chagásicos desse sexo (Barreto *et al.*, 1993; Bestetti, *et al.*, 2001).

Gráfico 1.1 - Distribuição dos pacientes por sexo, segundo os grupos de idade.



Os pacientes analisados possuem naturalidade e procedência majoritariamente de Minas Gerais. Apenas três deles têm naturalidade em outros estados como, Rio de Janeiro (Serra das Araras), Bahia (Bom Jesus da Lapa) e Mato Grosso (Alto Araguaia), embora atualmente residam em Minas Gerais.

O primeiro estudo, com revisão sistemática e metanálise para estimativa da prevalência da doença de Chagas no Brasil, foi publicado em 2014. Esse estudo estimou que 4,6 milhões de pessoas estariam infectadas por *T. cruzi* no Brasil na época. A prevalência agrupada da doença de Chagas foi de 4,2% da população na década de 1980 a 2,4% após os anos 2000, encontrando as maiores prevalências nas regiões Nordeste e Sudeste (Martins-Melo *et al.*, 2014).

Todavia, com o controle das transmissões vetorial e transfusional, houve diminuição da incidência da doença aguda na região Sudeste, de maneira que o maior número de casos agudos relatados no país, nos dias atuais, é na Região Amazônica, principalmente no Pará, devido especialmente ao aumento de casos relacionados à transmissão oral (Dias & Amato Neto, 2011; PAHO, 2009). Entre 2008 e 2017, foram

notificados 2185 casos de doença de Chagas aguda no Brasil, 2080 (95,2%) na Região Norte, 63 (28,8%) no Nordeste, 31 (16,76%) no Centro-Oeste, sete (3,8%) no Sudeste e quatro (2,2%) no Sul (DATASUS, Ministério da Saúde/SVS, 2019). Ainda assim, o Sudeste, com ênfase nos estados de São Paulo e Minas Gerais, continua sendo a região considerada de maior risco de mortalidade por doença de Chagas por apresentar alto número de pessoas com pior prognóstico — pacientes portadores da forma crônica cardíaca acima de 50 anos de idade (Simões *et al.*, 2018, Martins-Melo *et al.*, 2014). Isto se deve, em parte, por ter sido o Sudeste uma área de alta endemicidade no passado, além de receber alto fluxo migratório de indivíduos de regiões endêmicas (Simões *et al.*, 2018). Ademais, prevalecem nessa região as linhagens *T. cruzi* II e *T. cruzi* VI, que frequentemente estão associadas às formas mais graves da doença cardíaca (Macedo & Segatto, 2010).

1.9.2. Reativação chagásica após o transplante

Dos 98 pacientes acompanhados, 65 (66,3%) tiveram pelo menos um episódio de reativação chagásica após o transplante cardíaco durante o período do estudo, sendo o número médio de episódios de reativação de 1,25 (variando de 1 a 5 episódios). É relevante destacar que em todas as vezes que foi afirmado o diagnóstico de reativação, iniciou-se o tratamento etiológico imediatamente.

Em média, a primeira reativação clínica ocorreu 215,7 dias após o transplante, com mediana de 125 dias após a cirurgia, sendo que 75,4% dos pacientes apresentaram reativação em até 240 dias, cerca de 8 meses, pós-transplante (Tabela 1.5). Estes dados não apenas ratificam estudos anteriores que mostram que a maioria dos casos de reativação ocorre no primeiro ano pós-transplante (Revisado por Bacal *et al.*, 2010), como especificam a fase de maior risco para essa reativação.

Tabela 1.5 - Distribuição do número de pacientes com reativação chagásica, de acordo com o tempo pós-transplante

<i>Dias após Transplante</i>	<i>Nº de Pacientes com Reativação Chagásica</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
0- 120	31	47,7%
121- 240	18	27,7%
241- 360	6	9,2%
>360	10	15,4%
Total	65	100,0%

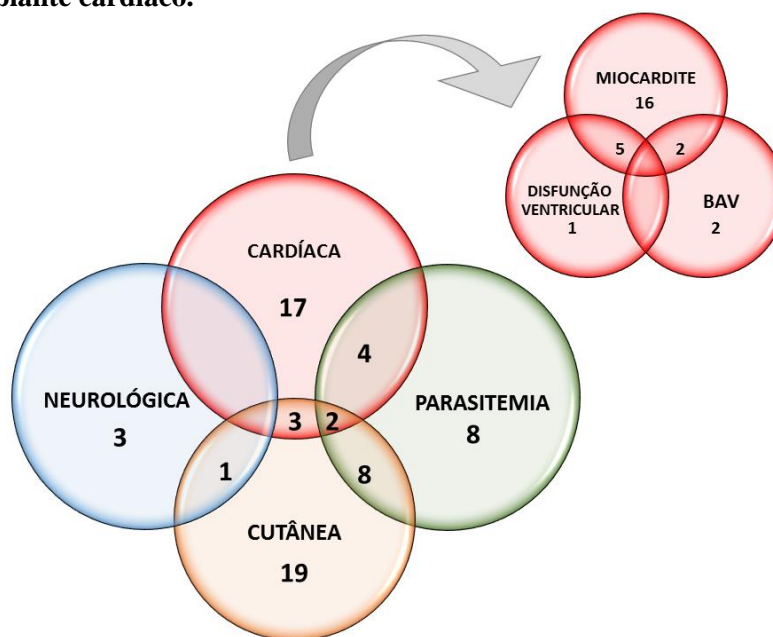
As principais manifestações clínicas associadas à reativação foram a cutânea (33 dos 65 pacientes - 50,8%) e a cardíaca (26 dos 65 pacientes- 41,5%). Além desses, 4 pacientes apresentaram reativação neurológica (6,2%). Sendo que alguns pacientes apresentaram mais de um tipo de manifestação clínica (ou subclínica), conforme mostrado na Figura 1.1.

Essa alta incidência de pacientes com lesões cutâneas ratifica estudos antecedentes, além de levantar a hipótese de que essa talvez seja uma nova forma clínica da doença de Chagas, que acomete pacientes chagásicos crônicos imunossuprimidos. De fato, desde o final da década de 90, casos de aparecimento de lesões cutâneas, tais como placas eritematosas endurecidas, áreas de necrose, nódulos, paniculite e úlceras vêm sendo relatados como expressão da reativação do parasitismo pelo *T. cruzi* em pacientes chagásicos após transplante (Almeida *et al.* 1996, Amato *et al.*, 1997; D' Avila *et al.*, 2005; Gallerano *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010; Kocher *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017). Nesses estudos, o diagnóstico de reativação chagásica cutânea pôde ser confirmado por meio do exame histopatológico de biópsia da lesão e/ou estudo imuno-histoquímico, sendo que a histopatologia geralmente revelou dermatite superficial e profunda associada a paniculite septal, caracterizada por intenso infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, macrófagos, plasmócitos e polimorfonucleares, permeando as fibras colágenas e em torno dos vasos na derme, além de visualização de formas amastigotas livres no interstício ou no citoplasma de macrófagos (Almeida *et al.* 1996; Amato *et al.*, 1997; D'Avila *et al.*, 2005).

No presente estudo, além da análise histopatológica das biópsias das lesões, em alguns casos também foram realizadas as técnicas de diagnóstico molecular para detecção do *T. cruzi*. Das 14 biópsias de pele analisadas, oito confirmaram a presença de DNA de *T. cruzi* ratificando o diagnóstico de reativação chagásica. Ademais, as seis biópsias em que as análises apresentaram resultados negativos para a presença de *T. cruzi* são amostras mais antigas cujo DNA foi extraído a partir de blocos de parafina, o que pode ter contribuído para a diminuição da sensibilidade da PCR, conforme abordado por Fernandes *et al.*, 2004.

Em relação ao tratamento, as drogas anti-*T. cruzi* têm se mostrado eficientes, com regressão total das lesões cerca de 40 dias após o início da medicação (Almeida *et al.* 1996; Amato *et al.*, 1997; D' Avila *et al.*, 2005).

Figura 1.1 - Perfil das principais manifestações clínicas e/ou subclínicas da reativação chagásica após transplante cardíaco.



Nota. (1) n=65 pacientes; (2) BAV= Bloqueio atrioventricular

Dos 26 pacientes que apresentaram reativação cardíaca, o bloqueio atrioventricular (BAV) esteve presente em quatro pacientes (15,4%), a disfunção ventricular em seis (23,1%) e a miocardite em 23 (88,5%), dos quais, sete também apresentaram outro tipo de comprometimento cardíaco (Figura 1.1).

O diagnóstico de miocardite chagásica foi comprovado pela presença de ninhos de amastigotas na análise histopatológica da BEM, o de BAV foi definido através da análise de alterações na frequência, formação e/ou condução do impulso elétrico através do miocárdio, por meio do eletrocardiograma, e o de disfunção ventricular por meio do ecocardiograma (fração de ejeção — FEVE < 50%). A parasitemia foi determinada por meio da pesquisa direta de tripomastigotas sanguíneos, tendo tido positividade de 33,8% (22 dos 65 pacientes com reativação chagásica).

Em relação aos imunossuppressores, além dos corticosteroides — predominantemente prednisona — e antiproliferativos — micofenolato mofetil ou micofenolato de sódio —, como inibidor de calcineurina, 37 pacientes (56,9%) estavam em uso de ciclosporina na época da reativação, com níveis séricos, em média, de 1071,2 ng/mL (mediana 1090,7 ng/mL, intervalo de 659-1500,4 ng/mL) e cerca de 41,5% dos pacientes estavam em uso de tacrolimus, tendo o nível sérico de 10,6 ng/mL em média (mediana 9,6 ng/mL, intervalo de 6,8-14,9 ng/mL). Em 1,6% dos casos (1 paciente) não foi possível obter essa informação.

Por outro lado, dos pacientes que não apresentaram nenhum episódio de reativação chagásica durante o estudo, 72,7% estavam em uso de tacrolimus, apresentando níveis séricos de 9,2 ng/mL em média (mediana 8,5 ng/mL, intervalo de 3,6 - 17,4 ng/mL), 12,1% em uso de ciclosporina e 6,1% de sirolimus, com nível sérico de 921,3 e 11,7 ng/mL em média, respectivamente. Em 9,1% dos casos (3 pacientes) essa informação não pode ser obtida.

Comparando o uso dos imunossupressores utilizados pós-transplante e a reativação chagásica, foi possível observar que 37 dos 41 pacientes (90,2%) em uso de ciclosporina apresentaram reativação, enquanto que essa proporção para os pacientes em uso de tacrolimus foi de 52,9% (27 de 51 pacientes). Essas proporções foram estatisticamente diferentes ao nível de significância de 5%.

Os níveis dos imunossupressores detectados no sangue dos pacientes transplantados acompanhados neste presente estudo, podem ser considerados dentro da normalidade, tanto para o grupo de pacientes que reativou a infecção, quanto para àqueles em que esta observação não foi identificada. De fato, de forma geral, é recomendado que se mantenha os níveis plasmáticos de ciclosporina (coletado duas horas após a ingestão) entre 800 e 1.200 ng/mL até o primeiro ano pós-transplante e redução dos níveis após esse período (Oellerich *et al.*, 1998), e para tacrolimus é sugerido a manutenção de níveis séricos entre 10 e 15 ng/mL na fase de zero a seis meses pós-transplante e entre 5 e 10 ng/mL após essa fase (Bacal *et al.*, 2018). Todos os pacientes avaliados neste estudo mantiveram-se dentro dessas faixas recomendadas para ambos os imunossupressores.

Nesse aspecto, vale ressaltar que diversos fatores podem influenciar o nível sérico ótimo desses imunossupressores para cada indivíduo como, por exemplo, a complexidade do estado clínico do paciente, tempo pós-transplante, sensibilidade aos fármacos, efeitos tóxicos e nefrotóxicos dessas drogas, além da coadministração com outros imunossupressores. Mais especificamente, no caso de pacientes chagásicos é recomendado manter a menor imunossupressão tolerada sem rejeição (Bacal *et al.*, 2009).

Estudos anteriores observaram maior incidência de rejeição em pacientes tratados com ciclosporina em comparação aos pacientes tratados com tacrolimus (Kobashigawa *et al.*, 2006; Grimm *et al.*, 2006). Todavia, em relação a reativação chagásica ainda não há estudos duplo-cego comparando os dois tipos de imunossupressores. De fato, é conhecido que protocolos de imunossupressão realizados antes de 1992, que incluíam altas doses de ciclosporina e sustentação de altas doses de esteroides estavam associados a maior risco de

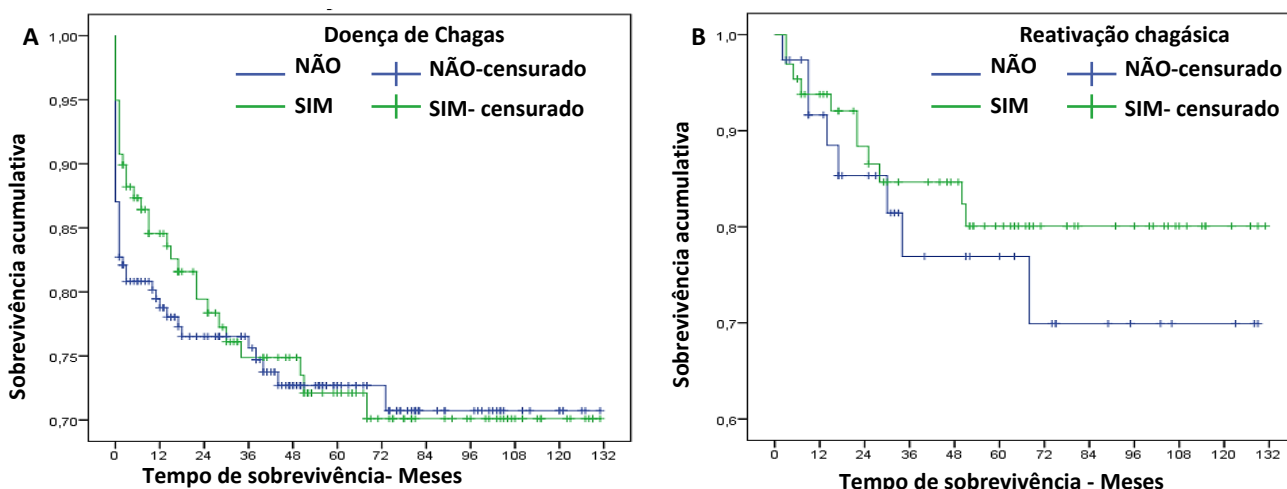
reativação quando comparado aos protocolos posteriores que recomendavam doses mais baixas de ciclosporina e redução rápida dos esteroides (Fiorelli *et al.*, 2011).

Apesar da alta taxa de reativação observada em nossos estudos, durante os 10 anos de acompanhamento, dos 98 pacientes chagásicos transplantados 21 pacientes faleceram. Alguns devido a choque séptico, choque cardiogênico, falência aguda do enxerto, outros devido a infecções diversas, como infecção pulmonar, varicela ou infecção por citomegalovírus. Apenas dois pacientes tiveram o seu óbito relacionado à reativação ou complicações associadas à doença de Chagas, tendo como causa do falecimento a reativação neurológica e a cardíaca (um paciente cada).

Esses achados reiteram estudos anteriores, que já mostravam que a mortalidade diretamente relacionada à reativação da infecção pós-transplante é baixa e que há adequada sobrevida em longo prazo, chegando a propor que poderia ser superior às obtidas com transplantes cardíacos de outras etiologias (Campos *et al.*, 2008, Bestetti *et al.*, 2009). De fato a sobrevivência em um, quatro e oito anos pós-transplante, respectivamente, para receptores com cardiopatia isquêmica foi de 59%, 44% e 34%, para a cardiomiopatia dilatada idiopática de 69%, 57% e 40% e de 71%, 57% e 55% ($p < 0,027$) para a cardiomiopatia chagásica (Bocchi *et al.*, 2001b). Já em nosso estudo, encontramos boa taxa de sobrevivência para toda a coorte, sendo estimada em cerca de 70% em 10 anos. Não foram observadas diferenças entre a sobrevivência pós-transplante cardíaco para pacientes chagásicos em relação às outras causas de cardiopatia, constituindo-se cerca de 80% no primeiro ano e maior que 75% no segundo ano para ambos os grupos (Figura 1.2A).

Resultados similares foram obtidos comparando a sobrevivência dos pacientes com e sem reativação, quando também não foram encontradas diferenças para os dois grupos (Figura 2B). Assim, é possível sugerir que, mesmo em casos de reativação chagásica, se os pacientes são rapidamente tratados com droga anti-*T. cruzi*, a sobrevivência pós-transplante cardíaco é alta.

Figura 1.2 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier após transplante cardíaco realizado no HC-UFGM.



Nota. (1) A) Curvas obtidas pela análise de Kaplan-Meier para a sobrevida dos pacientes cardiopatas de outras etiologias em relação aos pacientes chagásicos, após transplante cardíaco; n= 280; p= 0,741= não-significante (Teste de Log-Rank); B) Curvas obtidas pela análise de Kaplan-Meier para a sobrevida dos pacientes cardiopatas chagásicos sem reativação em relação aos pacientes chagásicos com reativação chagásica, após transplante cardíaco; n= 98; p=0,455= não-significante (Teste de Log-Rank) (2) Dado censurado: Indivíduo que não sofreu o evento durante o período de estudo, de modo que o tempo exato de sobrevida não é conhecido.

1.9.3. Diagnóstico molecular

Devido à importância da introdução rápida do tratamento anti-*T. cruzi*, nos casos de reativação chagásica, para que haja melhora do bem estar dos pacientes e para se evitar formas graves de reinfecção, que levem ao comprometimento neurológico e/ou cardíaco, é imprescindível a utilização de um diagnóstico rápido com alta acurácia. Nesse sentido, estratégias moleculares têm surgido como ferramentas promissoras para o diagnóstico diferencial entre rejeição e reativação pós-transplante cardíaco, auxiliando na escolha do tratamento correto.

No presente estudo, avaliamos a possibilidade de utilização de metodologias baseadas em PCRs direcionadas para marcadores nucleares (rDNA 24S α) e mitocondriais (kDNA), para o diagnóstico precoce da presença de *T. cruzi* nos tecidos de pacientes chagásicos transplantados. De 2008 a 2018, foram analisadas 991 BEMs, derivadas do acompanhamento pós-transplante cardíaco de 98 pacientes chagásicos, além de 14 biópsias de pele e três biópsias de sistema nervoso central (SNC), derivadas de casos de reativação cutânea ou neurológica. O DNA de *T. cruzi* foi detectado em 216 dessas amostras biológicas: 205 BEMs, oito biópsias de pele e três biópsias de SNC.

Com a realização das duas metodologias de diagnóstico molecular, verificamos que a técnica da PCR tendo o alvo o kDNA é mais sensível do que a amplificação do rDNA — 184 BEMs positivas oriundas de 63 pacientes *versus* 117 BEMs positivas oriundas de 52 pacientes —, resultado que pode ser explicado tendo em vista a biologia do *T. cruzi*. Os minicírculos do kDNA estão presentes em múltiplas cópias, de 5.000 a 20.000, em cada célula do parasito (Simpson, 1987), enquanto o rDNA 24 S α faz parte do DNA nuclear, possuindo cerca de 100 a 200 cópias no genoma (Simpson, 1987; Agabian, 1990).

Técnicas de PCR tendo como o alvo o kDNA já foram recusadas como estratégia diagnóstica para detecção de *T. cruzi* em BEMs de pacientes chagásicos em trabalhos anteriores, pois alguns pacientes sem sinais clínicos de reativação da doença de Chagas foram positivos para esse marcador. No entanto, como esses pacientes foram acompanhados por apenas 12 meses, não foi possível concluir se esses dados discrepantes representavam resultados de PCR falso-positivos ou antecipação de reativação clínica da doença (Benvenuti *et al.*, 2011). Sendo assim, nós optamos pela associação de duas PCRs para o diagnóstico de *T. cruzi*, PCR do kDNA e PCR em tempo real do rDNA 24S α , visando aumentar a sensibilidade diagnóstica sem perder especificidade, e também aumentamos o período de acompanhamento.

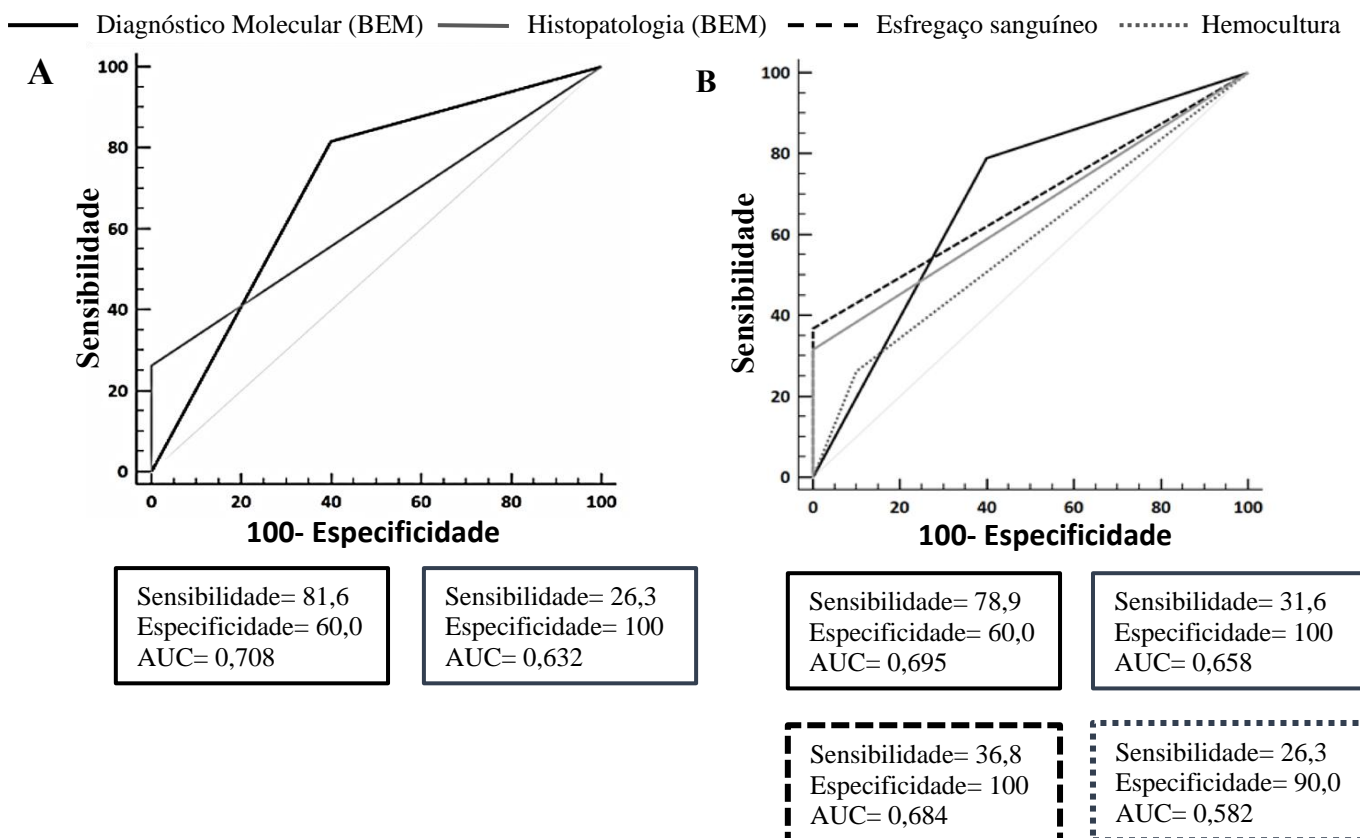
Todavia, uma boa correlação entre os resultados gerados pelas duas técnicas de PCR foi observada, como demonstrado pelo índice de correlação de Kappa=0,557 e $p < 0,001$. Valores kappa variando de 0,75 a 0,40 são considerados como bom a razoável (Fleiss, 1981). Além disso, a utilização das duas metodologias foi essencial para o diagnóstico de todas as amostras positivas, visto que alguns pacientes que já apresentaram reativação clínica poderiam ter sido diagnosticados incorretamente utilizando apenas uma das técnicas. Sendo que 6,2% (4/65) e 10,8% (7/65) dos pacientes com reativação clínica foram diagnosticados apenas por rDNA 24S α ou PCR do kDNA, respectivamente.

Os resultados das análises das primeiras 500 BEMs derivadas de 58 pacientes chagásicos submetidos ao transplante cardíaco, e a comparação da acurácia do diagnóstico molecular e dos métodos parasitológicos convencionais — análise histopatológica da BEM, esfregaço sanguíneo e hemocultura — resultaram na **PUBLICAÇÃO 1** (Costa *et al.*, 2017).

Neste trabalho, pudemos ver que os resultados para a metodologia de PCR adotada apresentaram considerável sensibilidade (82%) e especificidade (60%). Em contraste, apenas 26% dos pacientes com reativação da doença de Chagas pós-transplante foram

positivos para a análise histopatológica convencional, mostrando a baixa sensibilidade desta técnica. A área sob a curva ROC, considerando os 58 pacientes, para o diagnóstico molecular e para histopatologia foram de 0,71 e 0,63 respectivamente (Figura 1.3A). Quando comparamos os resultados obtidos apenas para os pacientes que foram submetidos aos quatro tipos de métodos de diagnóstico analisados (29 dos 58 pacientes) observamos que a técnica de PCR também revelou sensibilidade superior a todas elas, apresentando valor de 0,79, enquanto análise histopatológica da BEM, esfregaço sanguíneo e hemocultura mostraram sensibilidade de 0,32, 0,37 e 0,26, respectivamente. A área sob a curva (AUC) ROC para o diagnóstico molecular, histopatologia, esfregaço sanguíneo e hemocultura foram de 0,695, 0,658, 0,684 e 0,582, respectivamente, indicando que o método descrito no presente estudo possui maior acurácia em relação aos outros testes (Figura 1.3B).

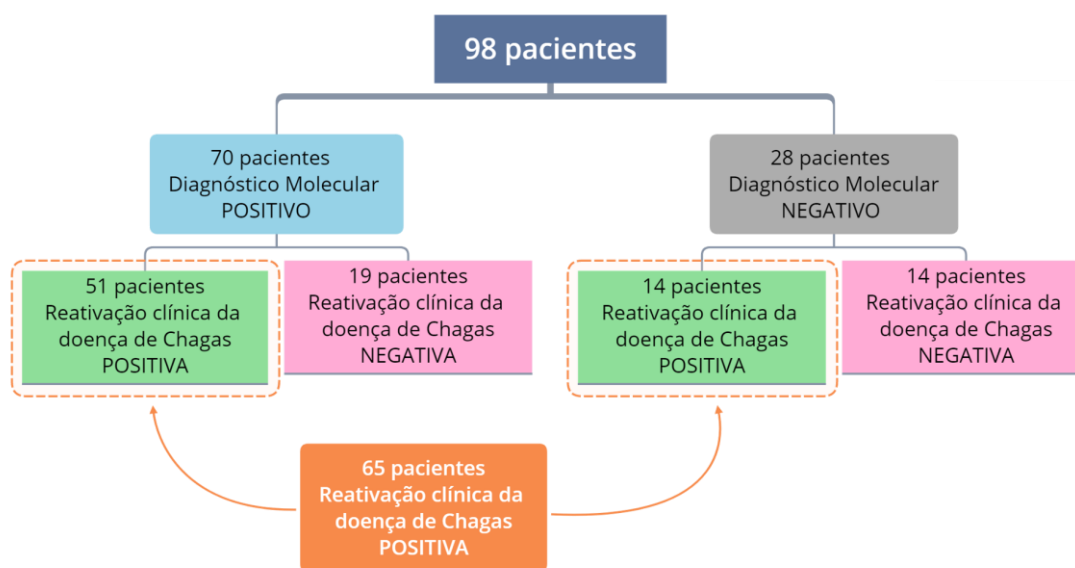
Figura 1.3 - Curvas ROC para comparação



Resultados semelhantes foram observados, quando a nossa análise foi ampliada para quase o dobro das amostras iniciais (991 BEMs). Considerando ambas os alvos para PCR, 205 BEMs positivas (20,7%) foram obtidas de 70 pacientes que apresentaram

algum resultado afirmativo para pelo menos um dos testes moleculares realizados para diagnóstico. Desses pacientes, 51 (73%) já apresentaram pelo menos um episódio de reativação clínica da doença de Chagas ao decorrer dos anos de acompanhamento (variando entre 4 semanas e 4,4 anos), o que demonstra uma boa associação entre os resultados gerados em conjunto pelas PCRs com a reativação clínica da doença, conforme resumido na Figura 1.4.

Figura 1.4- Comparação dos resultados entre o diagnóstico molecular e a reativação clínica da doença de Chagas pós-transplante cardíaco.



Além disso, os primeiros resultados positivos para o diagnóstico molecular ocorreram entre uma semana e 20 meses pós-transplante, com média de 3,1 meses e mediana de um mês, antecipando a reativação clínica da doença de Chagas entre 1,5 e 36 meses, com mediana de 6 meses (9,1 meses, em média). Esses achados nos permitiram propor um algoritmo para vigilância da reativação chagásica baseada nos testes moleculares, que certamente contribuirá para o diagnóstico precoce de reativação chagásica com potencial para auxiliar nas decisões dos clínicos sobre as melhores opções de tratamento (Costa *et al*, 2017- **PUBLICAÇÃO 1**).

1.9.4. Diagnóstico por imuno-histoquímica

Nossos resultados mostraram que a metodologia de PCR proposta neste trabalho apresenta maior sensibilidade do que os métodos parasitológicos utilizados como rotina no diagnóstico da reativação da doença de Chagas em pacientes cardiopatas transplantados. Como já abordado, foi possível identificar a presença de *T. cruzi* em 73-

82% (dependendo do conjunto de amostras analisadas) dos pacientes com reativação da doença de Chagas, comparado com 23,5-26% pela histologia convencional.

Todavia, há relatos na literatura de que a associação da reação com anticorpo anti *T. cruzi* à análise histopatológica convencional (imuno-histoquímica) aumenta a sensibilidade do diagnóstico (Barbosa 1985, 1986). Assim, nesta etapa do trabalho nós comparamos os resultados obtidos com a utilização das análises histopatológica convencional, imuno-histoquímica e diagnóstico molecular (Azevedo *et al.*, 2018 - **PUBLICAÇÃO 2**).

Para as análises de imuno-histoquímica, foi usado, como anticorpo primário, soro hiperimune de coelhos infectados pelo *T. cruzi*, preparado pelo grupo da Dra Glenda Nicioli da Silva, da Escola de Farmácia da UFOP. Usando este soro, foi possível detectar a presença de antígenos de *T. cruzi* em 21 das 26 biópsias (80,8%) que apresentaram ninho de amastigotas na histologia convencional — controles positivos — e em um dos oito casos de biópsias de tecidos infectados com Leishmania, Toxoplasma ou Hialoplasma, revelando para essa técnica valores de sensibilidade e especificidade de 80,8% e 96,2%, respectivamente, considerando como padrão-ouro o encontro de ninhos de *T. cruzi* na coloração convencional por HE.

Quando as análises por meio de histopatologia convencional e pela imuno-histoquímica são avaliadas isoladamente, os achados sugerem que as técnicas possuem nível de sensibilidade semelhantes, visto que em cinco BEMs (19,2% do total de casos positivos), os ninhos de amastigotas identificados na coloração de HE não foram marcados nos cortes da reação imuno-histoquímica, mas, por outro lado, foi possível a detecção do parasito em quatro (12,9%) das 31 BEMs negativas para histologia convencional e positivas apenas para o diagnóstico molecular.

Já em relação a metodologia de PCR proposta neste trabalho, apenas 11 das 26 (42,3%) amostras selecionadas como controle positivo pela HE foram também positivas para o diagnóstico molecular. A aparente baixa sensibilidade da PCR neste caso pode ser atribuída exatamente à escolha das amostras do controle positivo. Como o objetivo principal aqui foi o de comparar os métodos de histologia convencional e da imuno-histoquímica, foram selecionadas amostras antigas, fixadas em formol não tamponado e emblocadas em parafina, que haviam apresentado ninhos de amastigotas na HE. Essas foram exatamente as amostras onde a técnica de PCR proposta neste trabalho apresentou pior desempenho, pelos motivos já abordados anteriormente, mais especificamente o *crosslink* de DNA (Fernandes *et al.*, 2004).

Assim, tomados em conjunto os resultados das duas técnicas histológicas, a inclusão de novos casos positivos, que não haviam sido identificados pela análise histopatológica convencional, justifica a indicação do método imuno-histoquímico como avaliação complementar às BEMs de pacientes chagásicos transplantados.

Todavia, infelizmente neste trabalho, não avaliamos casos em que tanto a histopatologia convencional quanto a PCR foram negativas, mas que os pacientes já apresentaram alguma evidência clínica para a reativação da doença de Chagas (12 casos dos 98 pacientes analisados). Assim não podemos afirmar se a implementação do uso da imuno-histoquímica em uma rotina laboratorial em que já esteja sendo empregado os métodos de histopatologia convencional e de diagnóstico molecular traria grandes contribuições ao diagnóstico.

1.10. Publicações da autora relacionadas ao capítulo

Publicação 1- Costa, P. A.; Segatto, M.; Durso, D.F; Moreira, M. C. V; Macedo, A. M. *et al.*, **Early PCR detection of Chagas disease reactivation in heart-transplanted patients**. The Journal Heart and Lung transplantation, v. 36, n.7, p.797-805, 2017.

Publicação 2- Azevedo, P. H. R; Xavier, M. A. P.; Silva, G. N.; Costa, P. A.; Carneiro, C. M.; Brasileiro Filho, G. **Anti-serum validation for use in immunohistochemistry for *Trypanosoma cruzi* detection**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 51, n.4, p.467-474, 2018.

Early polymerase chain reaction detection of Chagas disease reactivation in heart transplant patients



Priscilla Almeida da Costa, MS,^{a,1} Marcela Segatto, PhD,^{b,1}
Danielle Fernandes Durso, PhD,^a Wagson José de Carvalho Moreira, BSc,^a
Lucas Lodi Junqueira, MD, PhD,^c Fábio Morato de Castilho, MD, MS,^c
Silvio Amadeu de Andrade, MD,^c Cláudio Léo Gelape, MD, PhD,^d
Egler Chiari, PhD,^e Andréa Teixeira-Carvalho, PhD,^f
Sergio Danilo Junho Pena, MD, PhD,^a Carlos Renato Machado, PhD,^a
Gloria Regina Franco, PhD,^a Geraldo Brasileiro Filho, MD, PhD,^g
Maria da Consolação Vieira Moreira, MD, PhD,^h and Andréa Mara Macedo, PhD^a

From the ^aDepartamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ^bDepartamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil; ^cHospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ^dDepartamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ^eDepartamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ^fCentro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz-Minas, Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ^gDepartamento de Patologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; and the ^hDepartamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

KEYWORDS:

Chagas disease reactivation;
endomyocardial biopsy;
heart transplantation;
molecular diagnostics;
polymerase chain reaction

BACKGROUND: Heart transplantation is a valuable therapeutic option for Chagas disease patients with severe cardiomyopathy. During patient follow-up, the differential diagnosis between cardiac transplant rejection and Chagas disease infection reactivation remains a challenging task, which hinders rapid implementation of the appropriate treatment. Herein we investigate whether polymerase chain reaction (PCR) strategies could facilitate early detection of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) in transplanted endomyocardial biopsies (EMBs).

METHODS: In this study we analyzed 500 EMB specimens obtained from 58 chagasic cardiac transplant patients, using PCR approaches targeted to nuclear (rDNA 24S α) and kinetoplastid (kDNA) markers, and compared the efficiency of these approaches with that of other tests routinely used.

RESULTS: *T. cruzi* DNA was detected in 112 EMB specimens derived from 39 patients (67.2%). The first positive result occurred at a median 1.0 month post-transplant. Conventional histopathologic, blood smear and hemoculture analyses showed lower sensitivity and higher median time to the first positive result. Patient follow-up revealed that 31 of 39 PCR-positive cases presented clinical reactivation of

¹The first 2 authors (P.A.d.C. and M.S.) contributed equally to this work.

Reprint requests: Priscilla Almeida da Costa, MS, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270901, Brazil. Telephone: +55-31-3409-2641. Fax: +55-31-3409-2984.

E-mail address: andrea@ufmg.br

Chagas disease at different time-points after transplantation. PCR techniques showed considerable sensitivity (0.82) and specificity (0.60), with area under the receiver operating characteristic (ROC) curves of 0.708 ($p = 0.001$). Moreover, PCR techniques anticipated the clinical signs of Chagas disease reactivation by up to 36 months, with a median time of 6 months and an average of 9.1 months.

CONCLUSIONS: We found a good association between the PCR diagnosis and the clinical signs of the disease, indicating that the PCR approaches used herein are suitable for early diagnosis of Chagas disease reactivation, with high potential to assist physicians in treatment decisions. For this purpose, an algorithm is proposed for surveillance based on the molecular tests.

J Heart Lung Transplant 2017;36:797–805

© 2017 International Society for Heart and Lung Transplantation. All rights reserved.

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T cruzi*), is the third most common parasitic infection in the world after malaria and schistosomiasis, with 28,000 new cases and approximately 12,000 deaths each year in Central and South America.^{1,2} Increasing cases have been reported in the United States and Europe, mainly due to immigration,^{3–5} generating implications not only from an epidemiologic point of view but also for transplant centers.

In the acute phase of Chagas disease, most people present high parasitemia, fever, and other non-specific symptoms. About two thirds of those infected will evolve to a chronic asymptomatic phase, which lasts throughout their lifetime. The remaining one third will generally develop heart or gastrointestinal complications 10 to 30 years after the initial infection. Of these, approximately 30% develop the chronic form of Chagas heart disease, which can lead to heart failure or sudden death.⁶

Heart transplantation is the ultimate therapeutic option for patients with severe Chagas cardiomyopathy.⁷ However, the immunosuppressive treatment that accompanies transplant increases the likelihood of infections, including reactivation of Chagas disease.^{8–10}

The main drugs used for specific anti-*T cruzi* treatment are benznidazole and nifurtimox; however, due to the occurrence of substantial side effects, the benefits of prophylactic use of these agents in transplanted patients just before or after transplantation remain to be determined.¹¹

Microscopic examination of endomyocardial biopsy (EMB) is a widely accepted method for assessment of post-transplant myocardial injury, but differentiating between inflammation caused by immunologic rejection and Chagas disease reactivation is still a challenge. EMB histopathologic analysis, blood smear examination, xenodiagnosis and hemoculture are the methods currently used for the direct diagnosis of *T cruzi* reactivation. Although highly specific, these methods have shown low sensitivity due to low circulating parasitemia and rare parasite nests (intracellular amastigotes) in heart tissues. In addition, both xenodiagnosis (diagnosis via detection of infective forms *T cruzi* in the feces of triatomine bugs fed directly or indirectly on the patient's blood) and hemoculture take a long time to provide results.^{12,13} Serologic tests, on the other hand, are useful only for seronegative patients receiving organs from seropositive donors. Thus, it is crucial to develop a diagnosis method that can specifically detect Chagas disease reactivation in heart transplant patients.

We aimed to demonstrate that molecular diagnosis by polymerase chain reaction (PCR): (i) can successfully identify the presence of *T cruzi* in EMB specimens of patients with chagasic cardiomyopathy submitted to heart transplant; and (ii) assists in early identification of patients at risk of developing reactivation of the infection. Ultimately, such information would help physicians to decide whether and at what point transplanted patients should receive anti-*T cruzi* drug treatment.

Methods

Patients and sample selection

Our study protocol complied with the Helsinki Declaration and was approved by the institutional review board at the Universidade Federal of Minas Gerais (UFMG). All patients provided written informed consent.

A total of 58 consecutive adult chagasic patients were analyzed, all of whom underwent heart transplantation in the cardiology department of Hospital das Clínicas of the UFMG (HC-UFMG) during the period from 2008 to 2014. Each of these patients had at least 2 positive serology tests for Chagas disease.

Post-operative immunosuppression

All patients received standard therapy with calcineurin inhibitors (cyclosporine or tacrolimus), mycophenolate mofetil and prednisone. After 6 months, prednisone was weaned whenever possible.

Post-operative EMB

EMB was performed routinely according to Costanzo et al.¹⁴ For histopathologic study, 500 EMB specimens from all 58 patients were examined. A minimum of 4 endomyocardial fragments, 1 to 3 mm in diameter, were harvested under sterile conditions from the right ventricle. Two or 3 biopsy specimens were fixed in 4% buffered formaldehyde and embedded in paraffin. The remaining 2 specimens were quick frozen.

For molecular analyses, EMB specimens were grouped into 2 categories: (1) 155 samples obtained from the sample bank of the HC-UFMG that had been collected before beginning the present investigation, all of which were fixed in buffered formalin and then embedded in paraffin and then used for the retrospective analysis; and (2) 345 samples specifically collected for this work and preserved in absolute ethanol, then used in the prospective analysis.

Post-transplant follow-up

After transplantation, all patients were followed regularly by a cardiologist and the monitoring of *T cruzi* reactivation was performed routinely during monthly medical visits or whenever necessary during the first year, and then every 3 months and during suspected clinical or laboratory-supported reactivation episodes when there was:

1. Clinical suspicion of *T cruzi* reactivation, defined as signs and symptoms similar to allograft dysfunction associated with episodes of fever, new skin lesions, arrhythmias or new conduction blocks on electrocardiography, left ventricular dysfunction on echocardiography or neurologic manifestations.
2. Positive results during laboratory monitoring, as detected by direct microscopy of blood smear, hemoculture or histopathologic or PCR analysis of the EMB.

Patients suspected of clinical reactivation underwent the following: skin biopsy in the presence of skin lesions; EMB if myocarditis was suspected; computed tomography scan; magnetic resonance imaging of the brain and cerebrospinal fluid analysis in the presence of neurologic manifestations; and myelogram or bone marrow biopsy in cases of suspected bone marrow involvement.

Detection of parasitemia in serial samples or presence of amastigotes in the implanted heart or other tissues confirmed reactivation.

Six patients died during the study: one due to acute graft failure, two due varicella pulmonary or cytomegalovirus infections, and two of unknown causes. Only one death was related to reactivation or complications associated with Chagas disease, and the cause of death was suspected to be neurologic reactivation of Chagas. No other loss occurred.

Diagnostic techniques

Histopathology

The degree of cellular rejection each the specimen was graded according to International Society for Heart Transplantation criteria.^{15,16} At least 15 sections, stained with hematoxylin and eosin, from each endomyocardial or skin biopsy were carefully examined for inflammatory reaction and parasite nests.

Hemoculture

Peripheral blood (30 ml) was collected into sodium heparin tubes and centrifuged at 4°C to harvest the plasma. The packed cells were washed twice by centrifugation at 4°C in liver infusion tryptose (LIT) medium, distributed among 6 tubes containing 3 ml of LIT, and incubated at 28°C in a biochemical oxygen demand incubator. Procedures were done in sterile conditions and processed <6 hours after blood was drawn. All tubes were mixed gently once per week and examined by microscopy, searching for motile trypanosomes once per for up to 3 months.

Blood smear

Blood smears were prepared from fresh ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA)-anti-coagulated blood. At least 400 microscopic fields (1,000× magnification) were examined before the sample was declared free of the parasite.

Molecular diagnosis of *T cruzi*

Preparation of *T cruzi* genomic DNA

DNA extraction was performed using tissue kits (QIAamp DNA FFPE or QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA) for paraffin-embedded and fresh EMB specimens, respectively, according to the manufacturer's instructions.

As a control procedure and to verify DNA integrity after extraction, a polymorphic region of the human genome was amplified by PCR using the primers MID-768-F (5'-CATTAC-CAGTAGAGTGGGA-3') and MID-768-R (5'-CTATGCCCTACTGGATCTAGG-3'), as described by Weber et al.¹⁷ A pool of human DNA was used as positive control and only the reagents of the PCR constituted the negative control.

Mitochondrial DNA PCR

T cruzi DNA detection was accomplished by specific amplification of a 330-bp fragment corresponding to the variable region of the mitochondrial (kDNA) minicircle. Each reaction with a final volume of 20 µl was composed of 1.5 mmol/liter MgCl₂, Green Go Taq buffer (Promega, Madison, WI), 250 mmol/liter of each deoxynucleotide triphosphate, 1 mmol/liter of primers S35 (5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3') and S36 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA-3'),¹⁸ 1 U Go Taq Flexi DNA polymerase (Promega) and 3 µl of total extracted DNA.

Reaction conditions were initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of annealing at 60°C, extension at 72°C, denaturation at 94°C for 1 minute for each step and a final extension to 10 minutes. Five microliters of each PCR product was subjected to electrophoresis in 6% polyacrylamide gel and then silver stained.¹⁹ DNA of *T cruzi* JG strain was included as a positive control and the negative control comprised all PCR reagents without DNA addition.

Real-time PCR of 24Sα rDNA

The protocol was performed as described by Freitas and colleagues based on a hemi-nested PCR amplification of the D7 region of 24Sα ribosomal DNA (rDNA),²⁰ followed by identification of the products using real-time PCR denaturation curves. In the first round of amplification, 5 µl of the total extracted DNA was used as template and D75 (5'-CAGATCTTGGTTGGCGTAG-3') and D72 (5'-TTTTGAGAATGGCCGAACAGT-3')²¹ as primers. A second round was performed in real time (ABI7900; Applied Biosystems) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), primers D71 (5'-AAGGTGCGTGCACAGTGTGG-3')²¹ and D72 and 2 µl of the first PCR product as template. DNA of *T cruzi* JG strain and clone Col1.7G2 were included as positive control, whereas components of the PCR reaction with no DNA were used as negative control.

Primers used in both molecular methodologies were designed to match conserved regions of parasite DNA, being able to amplify the target DNA in all *T cruzi* populations.

Statistical analysis

The kappa index was calculated to evaluate the correlation between the 2 PCRs used for molecular diagnosis. Values >0.75 were considered indicative of excellent agreement, 0.75 to 0.40 as good

to reasonable and <0.40 as poor.²² $p < 0.05$ was considered statistically significant.

The MEDCALC program was used to build receiver operating characteristic (ROC) curves, according to DeLong et al.²³ For analysis of specificity, sensitivity and area under the ROC curve, positive results (from PCR or histopathology analyses) were denoted by 1 and negative results by 0, with >0 selected as the criterion value. We used the clinical manifestation of patients as the “gold standard” reference. Significant p -values ($p < 0.05$) indicated that that area under the ROC curve could statistically distinguish positive and negative groups.

Results

Using 2 molecular approaches and conventional histopathology, we analyzed 500 samples of EMB specimens collected from 58 chagasic patients submitted to heart transplantation at the HC-UFGM. Some of these patients also had samples analyzed by hemoculture and blood smear. Clinical follow-up was completed in all of the patients.

Molecular analysis

Using a conventional PCR targeted to *T. cruzi* kDNA, we identified the positive samples by the presence of 330- and 660-bp bands, which correspond to 1 or 2 contiguous

variable regions of the minicircles (Figure 1A). We also performed quantitative PCR to amplify the *T. cruzi* rDNA 24S α , and used the melting-curve program to distinguish the infected tissues qualitatively. The positive results were those presenting high amplification peaks with a melting temperature (MT) between 76° and 81°C, whereas the negative results and unspecific products showed irregular peaks exhibiting MT outside of this range (Figure 1B).

Thirty-nine of the 58 patients assessed (67.2%) were positive on at least 1 of the 2 molecular tests performed at different time-points post-transplant. Considering the results from both methods, on average, these positive patients took 3.1 ± 4.4 months post-transplant (median 1 month) to show their first positive EMB, with a range of 7 days to 20 months (Table 1).

We compared the sensitivity of the 2 molecular approaches in detecting *T. cruzi* DNA in the EMB specimens. Although kDNA PCR proved to have greater sensitivity compared with rDNA 24S α quantitative PCR (102 positive samples from 36 patients vs 73 samples from 30 patients, respectively), there was good correlation between the results generated by both approaches, as demonstrated by the correlation index kappa = 0.663 and $p < 0.001$. Moreover, a combination of the techniques was essential to diagnose all of the positive samples. Using only kDNA PCR, 3 (10%) of the 30 infected patients would be misidentified as

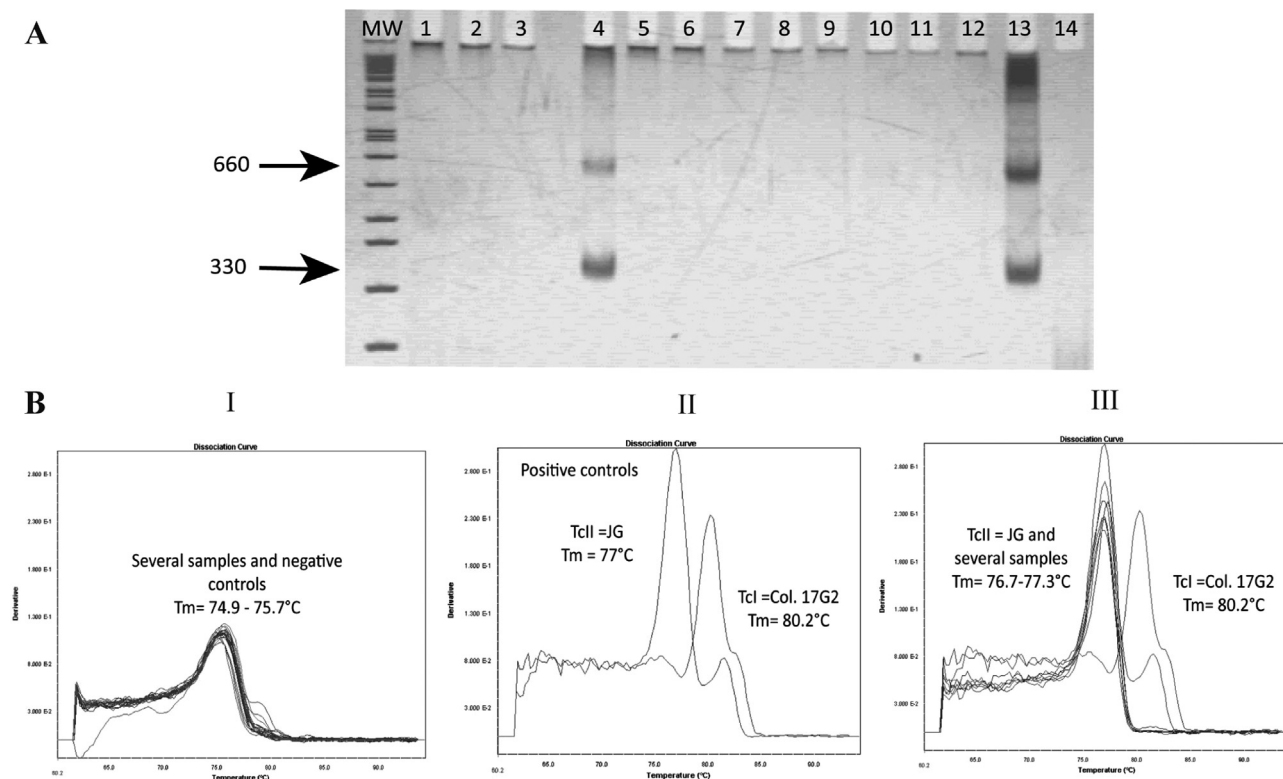


Figure 1 Representative results of the PCR techniques. (A) Amplification of variable 330/660-bp regions of the *T. cruzi* kDNA minicircle from endomyocardial biopsies of heart transplant patients: 1 to 12: EMB specimens of patients, where 4 showed positive amplification products; 13: DNA from *T. cruzi* JG strain (positive control); 14: no DNA template (negative control). MW, standard molecular weight (1-kb Plus DNA Ladder; Invitrogen). (B) Dissociation curves obtained by the melting curve program for the rDNA 24S α gene from biopsies of heart transplant patients. (I) Unspecific peaks obtained from negative EMB specimens in contrast to negative controls (without DNA). (II) Typical peaks derived from *T. cruzi* DNA of JG (TcII) and Col.1.7G2 (TcI) populations (positive controls). (III) Peaks obtained from positive EMB specimens in contrast to positive controls.

Table 1 Percentage of Positive Results and Time After Transplantation of the First Positive Result (Average and Median Times) for Each Test.

Test	Number of patients	Positive patients	Average time (months)	Median time (months)
Molecular diagnostic (EMB)	58	65.5%	3.1 ± 4.4	1.0
Histopathology (EMB)	58	17.2%	11.6 ± 11.07	5.5
Blood smear	42	26.2%	3.5 ± 2.87	3.0
Hemoculture	29	20.7%	6.8 ± 5.11	6.5

EMB, endomyocardial biopsy.

negatives, whereas the exclusive use of rDNA 24Sα quantitative PCR would fail to detect the *T. cruzi* in 25% of the kDNA-positive patients (Table 2).

Other parasitologic analyses

All 500 EMB specimens were also submitted to histopathologic analysis, where *T. cruzi* was found in 10 patients (17.2%) at 11.6 ± 11.07 months post-transplant (median 5.5 months) (Table 1).

Some patients were further submitted to direct analysis of blood smear exam (89 samples from 42 patients) and hemoculture (50 samples from 29 patients). Although these analyses were performed after patients presented the first clinical signs of Chagas disease reactivation, only 26.2% and 20.7% of patients analyzed were positive for blood smear or hemoculture, respectively, on direct examination. On average, these techniques were able to detect *T. cruzi* after 3.5 or 6.8 months post-transplant, respectively (Table 1).

Molecular analyses and clinical follow-up comparison

During follow-up of all 58 patients, 38 presented with clinical reactivation of Chagas disease at different time-points post-surgery. The main clinical signs were skin lesions (panniculitis with *T. cruzi* amastigotes) and

myocarditis. Two patients presented with signs of neurologic reactivation of Chagas disease.

Patients performed, on average, 5 post-transplant echocardiograms during the study period. The mean of left ventricular ejection fraction (LVEF) in these exams was 64% (21% to 87%). LVEF >50% may be considered normal or preserved and <50% may be considered reduced. Only 9 of the 58 patients presented at least 1 echocardiogram with LVEF <50% and no link between reduction of LVEF and chagasic reactivation was detected.

Despite the aforementioned findings, there was a good association between the PCR results and clinical reactivation of the disease, as 31 of the 38 patients with clinical reactivation (81.6%) also showed positive results for at least 1 of the molecular tests (Figure 2).

Taking together the results of both PCR techniques, the molecular assay used presented considerable sensitivity (0.82) and specificity (0.60). In contrast, only 10 of the 38 (26%) patients with Chagas disease reactivation were diagnosed by histopathologic analysis of their EMB, showing lower sensitivity (0.26). Areas under the ROC curve for molecular and histopathologic assessment of EMBs from all 58 patients were 0.708 and 0.632, respectively (Figure 3A).

When we compared the results obtained only from those patients who underwent all 4 diagnostic methods (29 of 58 patients), the molecular diagnosis showed a sensitivity of 0.79, whereas histopathology, blood smear and hemoculture

Table 2 Comparison of Contingency of Results for 2 PCR Methods of Molecular Diagnostics of *T. cruzi* Reactivation After Heart Transplant.

		rDNA quantitative PCR	
		Positive	Negative
Samples ^a	Positive	63	39
	Negative	10	388
Patients ^b	Positive	27	9
	Negative	3	19

^aNumber of endomyocardial biopsy specimens from heart transplant patients with chagasic cardiopathy presenting positive or negative results for the polymerase chain reaction (PCR) methods tested ($\kappa_{\text{samples}} = 0.668$, $p < 0.001$, chi-square test).

^bNumber of heart transplant patients with chagasic cardiopathy presenting positive or negative results for the PCR methods tested ($\kappa_{\text{patients}} = 0.653$; $p < 0.001$, chi-square test).

		Clinical reactivation of Chagas disease	
		Present	Absent
Molecular diagnostic	Positive	a 31	b 8
	Negative	c 7	d 12

Figure 2 Comparison of reactivation results between clinical and PCR molecular diagnostic procedures using EMB specimens (paraffin-embedded or fresh biopsies) from heart transplant patients with chagasic cardiopathy. (1) ^aTrue positive; ^bfalse positive; ^cfalse negative; ^dtrue negative; (2) $N = 58$; (3) total number of positive tests ($a + b$) = 39; (4) total number of clinical reactivations ($a + c$) = 38.

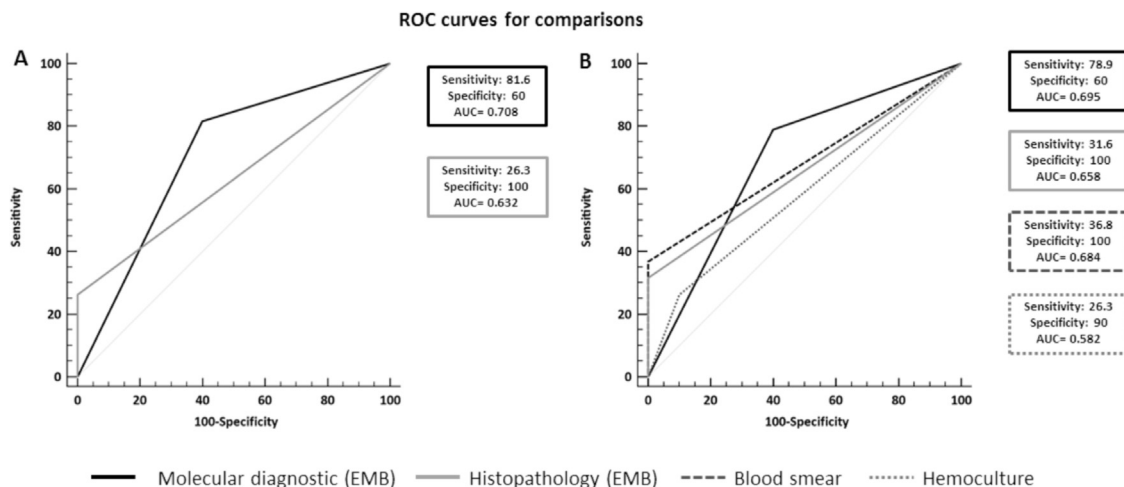


Figure 3 ROC curves for different diagnosis approaches compared with clinical reactivation of Chagas disease. (A) Molecular diagnosis and histopathologic analysis of 500 EMB specimens from 58 patients (B) Molecular diagnosis, histopathologic analysis, blood smear and hemoculture of samples from 29 patients. Criterion >0 (positive = 1, negative = 0); AUC, area under the receiver operating characteristic (ROC) curve ($p \leq 0.001$).

showed sensitivities of 0.32, 0.37 and 0.26, respectively. The areas under the ROC curves for this subgroup of patients for molecular diagnosis, histopathology, blood smear and hemoculture were 0.695, 0.658, 0.684 and 0.582, respectively, indicating that the molecular method described herein is more efficient at detecting *T cruzi* in patient samples (Figure 3B).

To assess whether both PCR methodologies could equally anticipate the clinical diagnosis of Chagas disease reactivation, we performed a retrospective study in which we analyzed EMB specimens embedded in paraffin blocks from patients transplanted at least 5 years early. For this analysis, the first 6 biopsies of 24 patients were compared with clinical data regarding disease reactivation (Table 3). In general, the sooner the biopsy samples showed PCR-positive results, the earlier the clinical reactivation of the disease occurred. Patients who had clinical reactivation before 1 year post-transplant had the first positive biopsy <1 month after surgery. The combined PCR techniques could anticipate the clinical signs of Chagas disease reactivation by 1.5 to 36 months, with a median time of 6 months (9.1 months, on average). When using only 1 of the molecular techniques, the average time increased to 9.8 or 10.9 months, with a median of 6 months and 8.5 months for kDNA PCR and 24S α quantitative PCR, respectively. These data suggest that both molecular diagnostics proposed can successfully anticipate Chagas disease reactivation.

Taken together, our results allowed us to propose the algorithm illustrated in Figure 4 for managing chagasic patients submitted to EMB after heart transplantation. This algorithm aims to help physicians decide when and which treatment to adopt, considering that differential diagnosis of clinical rejection and/or Chagas disease reactivation remains a challenge. The algorithm also represents a simple and logical way to follow-up patients with positive or negative results for histopathologic analysis of EMB, molecular diagnosis and/or clinical signs of Chagas disease reactivation.

Different combinations of positive results for these parameters can indicate cases for specific anti-*T cruzi* treatment (we found 46 patients in this situation). Inflammation of the cardiac tissue associated with consistently negative results of reactivation of *T cruzi* infection suggests transplant rejection (12 of our patients belong to this group). On the other hand, a lack of inflammation of cardiac tissue, absence of clinical signs and negative histopathologic and PCR findings would suggest a cure of chagasic myopathy, or at least well-controlled cardiac Chagas disease; however, no patient in our study fit this description (Figure 4).

Discussion

Heart transplantation is a valuable therapeutic tool for patients with severe cardiac Chagas disease. However, determining whether inflammatory signs present in EMB specimens of these patients are due to heart rejection and/or *T cruzi* infection reactivation is a difficult task. This is attributable to several factors: (i) inflammatory infiltrates found in EMB as result of Chagas disease reactivation are similar to those triggered by cardiac transplant rejection²⁴; (ii) parasite nests are rarely found by histopathologic examination²⁵; (iii) conventional parasitologic methods have low sensitivity due to low parasitemia observed in the chronic phase of disease²⁶; and (iv) serologic tests are not useful except for monitoring seronegative patients receiving organs from seropositive donors. Therefore, developing a molecular method able to detect Chagas disease reactivation in transplanted patients would clearly help to overcome all of the aforementioned shortcomings.

PCR-based methods have increasingly been used for Chagas disease diagnosis, being considered more sensitive than pathologic analyses. The main targets of PCR assays are satellite or minicircle DNA,^{27–33} both of which are present in multiple copies in the genome of the parasite genome.^{33,34}

Several studies have shown that amplification of the variable region of *T cruzi* minicircle kDNA, the same

Table 3 PCR Analysis of *T cruzi* Obtained From the First 6 Endomyocardial Biopsies Performed After Heart Transplantation of 24 Patients With Chagasic Cardiopathy.

Patient no. ^a	Date of clinical reactivation of Chagas disease ^b	kDNA and rDNA PCR results/days after transplant ^c					
		7	14	21	28	45	60
1	Several episodes of reactivation	+ ^d	+ ^d	- ^e	-	-	-
2	2 months	-	+ ^f	-	-	-	+ ^f
3	2 months	-	+ ^g	-	-	-	-
4	3 months	+ ^f	+ ^f	-	+ ^f	+ ^f	-
5	3 months	-	+ ^f	-	+ ^g	-	-
6	4 months	+ ^f	+ ^d	-	-	-	+ ^d
7	4 months	-	-	-	+ ^f	-	+ ^f
8	6 months	+ ^f	+ ^f	+ ^f	-	-	+ ^f
9	6 months	-	-	-	-	-	-
10	9 months	-	+ ^d	+ ^d	-	-	+ ^d
11	10 months	-	-	+ ^g	+ ^d	+ ^d	+ ^d
12	17 months	-	+ ^d	-	+ ^f	+ ^d	+ ^f
13	18 months	-	-	-	-	-	-
14	20 months	-	-	-	-	-	+ ^f
15	20 months	-	-	-	-	-	-
16	36 months	+ ^f	-	-	+ ^d	-	+ ^d
17	No clinical reactivation (died from pulmonary infection and varicella)	+ ^g	+ ^f	-	+ ^f	-	+ ^d
18	No clinical reactivation (death from unknown causes)	-	-	+ ^f	-	+ ^f	+ ^f
19	No clinical reactivation	+ ^f	-	+ ^f	+ ^f	-	-
20	No clinical reactivation	+ ^f	+ ^f	+ ^f	+ ^f	+ ^f	+ ^f
21	No clinical reactivation	-	-	-	-	-	-
22	No clinical reactivation	-	-	-	-	-	-
23	No clinical reactivation	-	-	-	-	-	-
24	No clinical reactivation	-	-	-	-	-	-

^aRepresentative number of heart transplant patients.

^bDate of clinical reactivation (months post-transplant).

^cBiopsies performed 7, 14, 21, 28, 45 and 60 days post-transplant.

^dPositive results for kDNA PCR and rDNA 24S quantitative PCR.

^eNegative results for both diagnostic methods used (applies to all "-" cites in table).

^fPositive result only for PCR kDNA.

^gPositive result only for rDNA 24S quantitative PCR.

we used here, is very specific for detection of this parasite,^{9,29,34-37} yet others have argued against this specificity.³⁸⁻⁴⁰

The usefulness of PCR techniques to specifically evaluate for the presence of *T cruzi* in EMB specimens has also been addressed in various studies.^{9,29,39,40} However, all of these studies were conducted with small sample sizes (EMB specimens and patients) and short follow-up periods, which may have interfered with the findings. For instance, kDNA PCR was disallowed as a diagnosis strategy in a previous work, as some patients without clinical signs of Chagas disease reactivation were positive for this marker. However, because these patients were followed-up for only 12 months, it was not possible to conclude whether these discrepant data represented false positive PCR results or anticipation of clinical reactivation of the disease.⁴⁰

To solve the debate about the usefulness of PCR to diagnose *T cruzi* reactivation in EMB specimens of heart transplant patients, we used a combination of kDNA PCR and rDNA 24S α quantitative PCR in a larger sample for comparison with previous studies. Thus, our strategy not only increased the statistical power, but also the sensitivity,

without losing the specificity of these methods, as we observed a good association between the molecular and clinical diagnoses of Chagas disease reactivation. For instance, a total of 352 EMB specimens obtained from 47 patients had inflammation without nesting of *T cruzi*, as revealed by conventional histopathologic analysis, which could be understood as indicative of rejection. However, *T cruzi* DNA was detected by PCR in 76 EMB specimens obtained from 29 of these patients, 21 of whom also presented clinical signs of Chagas disease reactivation at different time-points post-transplant. These data support the utility of the molecular tests employed herein to diagnose Chagas disease reactivation from biopsies of heart transplant patients with chagasic cardiopathy.

Analysis of the first 6 follow-up EMBs by kDNA PCR and rDNA 24S α quantitative PCR revealed that our strategy was able to anticipate clinical diagnosis of Chagas disease reactivation by up 36 months (median time of 6 months). Thus, we suggest that inclusion of these molecular tests in the clinical routine would help physicians to decide whether and when to introduce anti-Chagas therapy, as revealed by the algorithm proposed. This decision is important due

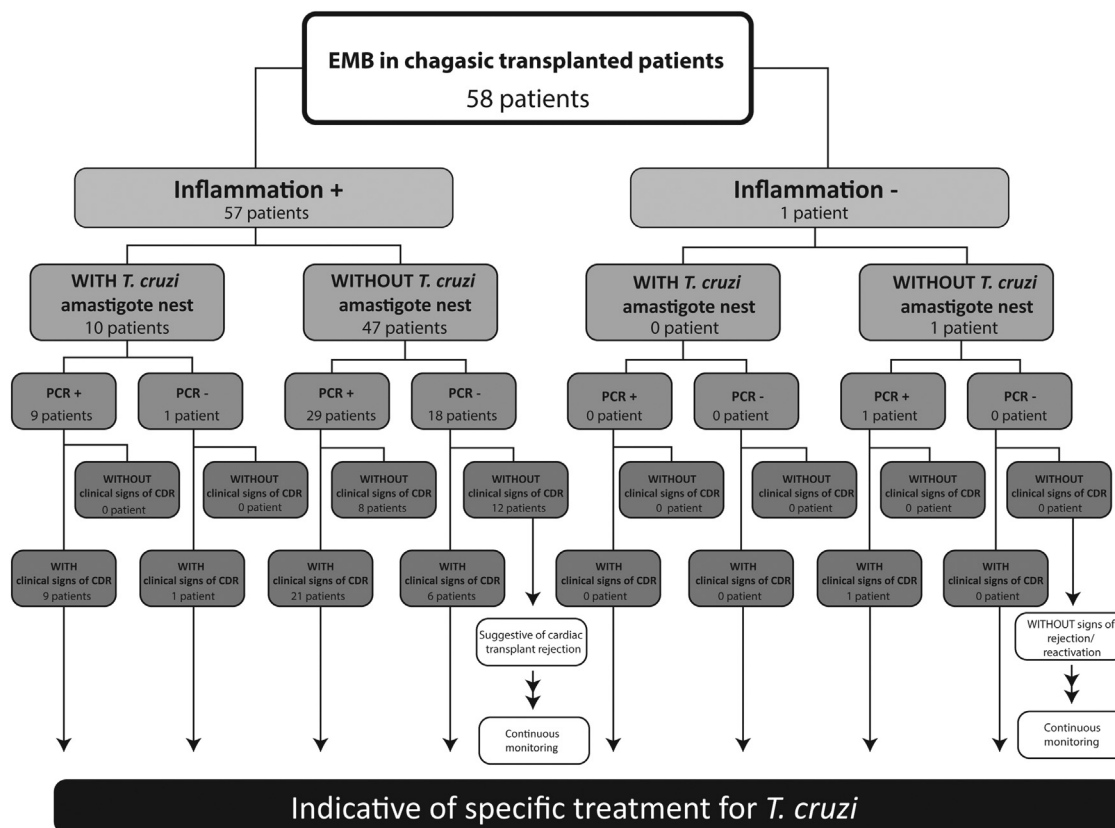


Figure 4 Proposed algorithm for managing chagasic patients submitted to EMB. Number of patients associated to each box represents the number of cases observed in the present study. CDR, Chagas disease reactivation; EMB, endomyocardial biopsy.

to the delicate health and immunologic status of most heart transplant patients after surgery.

Since 2008, we have followed 58 patients enrolled in this study by analyzing their EMB samples through the PCRs described. Two groups of positive patients were identified: (i) those with positive molecular diagnosis accompanied by clinical signs of Chagas disease reactivation ($n = 31$); and (ii) those with a positive molecular diagnosis but without signs of clinical reactivation ($n = 8$). The first group supports the suitability of this molecular strategy in the setting of Chagas disease reactivation. At first sight, the second group could represent false positives. However, because the PCRs employed here seem able to anticipate the clinical diagnosis, it is possible that these “false positives” are in fact patients who will present clinical manifestations of Chagas disease reactivation in the future. For these patients, continuous monitoring can confirm the benefit of early introduction of anti-Chagas drugs.

In conclusion, in this study we have evaluated the use of PCR for early diagnosis of Chagas disease reactivation in EMB specimens from heart transplant patients with chagasic cardiopathy. We found that the PCR techniques used can be employed as a valuable tool for differential diagnosis between parasite reactivation and cardiac transplant rejection. Also, this strategy succeeds in anticipating the diagnosis of clinical reactivation by up to several months. The relevant aspects of the proposed molecular diagnosis are its good sensitivity and specificity and its time efficiency. Indeed, the time required for reaching a PCR

diagnosis is less than that required for standard parasitologic methods.

Future studies comparing the outcomes of chagasic heart transplant patients treated with anti-Chagas drugs based exclusively on the positive PCR result versus those treated only when patent parasitemia or clinical manifestations of reactivation are detected may confirm the clinical value of the proposed management strategy. We believe that implementation of this PCR diagnosis in the clinical setting will help physicians to determine the point at which heart transplant patients should begin receiving anti-chagasic drugs, a decision that will ultimately contribute to the well-being and survival of these patients.

Disclosure statement

The authors have no conflicts of interest to disclose. This work was supported by grants and fellowships from Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq, Brazil), Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde (Decit/SCTIE/MS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

References

1. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). *Wkly Epidemiol Rec* 2010;85:334-6.
2. World Health Organization. Making health research work for poor people, the world health report. *TDR* 2005:30-3.

3. Milei J, Guerri-Guttenberg RA, Grana DR, et al. Prognostic impact of Chagas disease in the United States. *Am Heart J* 2009;157:22-9.
4. Guerri-Guttenberg RA, Ciannameo A, Di Girolamo C, et al. Chagas disease: an emerging public health problem in Italy? *Infez Med* 2009;17:5-13.
5. Kransdorf EP, Czer LSC, Luthringer DJ, et al. Heart transplantation for Chagas cardiomyopathy in the United States. *Am J Transplant* 2013;13:3262-8.
6. Manzullo EC, Chuit R. Risk of death due to chronic chagasic cardiopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999(suppl 1):317-20.
7. Bocchi EA, Fiorelli A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. *Ann Thorac Surg* 2001;71:1833-8.
8. Godoy HL, Guerra CM, Viegas RF, et al. Infections in heart transplant recipients in Brazil: the challenge of Chagas' disease. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:286-90.
9. Schijman AG, Vigliano C, Burgos J, et al. Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:1114-7.
10. Bacal F, Silva CP, Pires PV, et al. Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. *Clin Transplant* 2010;24:29-34.
11. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7:157-63.
12. Bacal F, Souza-Neto JD, Fiorelli AI, et al. II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. *Arq Bras Cardiol* 2009;94:e16-73.
13. Bulcão AA, Portela-Lindoso AA, Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saude Publica* 2003;37:107-15.
14. Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, et al. The International Society for Heart and Lung Transplantation guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:914-56.
15. Billingham ME, Cary NRB, Hammond ME, et al. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection. *J Heart Lung Transplant* 1990;9:587-93.
16. Stewart S, Gayle L, Fishbein MC, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:1710-20.
17. Weber JL, David D, Heil J, et al. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2002;71:854-62.
18. Wincker P, Britto C, Pereira JB, et al. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *T. cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:771-7.
19. Santos FR, Epplen JT, Pena SD. Testing deficiency paternity cases with a Y-linked tetranucleotide repeat polymorphism. *EXS* 1993;67:261-265.
20. Freitas JM, Lages-Silva E, Crema S, et al. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol* 2005;35:411-7.
21. Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol*, 62; 45-52.
22. Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1981.
23. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44:837-45.
24. Andrade JA, Marin-Neto JA, Paola AAV, et al. I Diretriz latino americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. *Arq Bras Cardiol* 2011;97:1-48.
25. Benvenuti LA, Roggério A, Sambiase NV, et al. Polymerase chain reaction in endomyocardial biopsies for monitoring reactivation of Chagas' disease in heart transplantation. A case report and review of the literature. *Cardiovasc Pathol* 2005;14:265-8.
26. Meira WSF, Galvão LMC, Gontijo ED, et al. *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 2002;40:3735-40.
27. Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, et al. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2010;10:337.
28. Dias JCP. Epidemiology of Chagas disease. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, editors. Chagas' disease—American trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine. Sao Paulo: ISBT; 1992. p. 49-80.
29. Diez M, Favaloro L, Bertolotti A, et al. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:1633-40.
30. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e419.
31. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989;27:1477-82.
32. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e931.
33. Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, et al. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3356-60.
34. Sturm NR, Degraeve W, Morel C, et al. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 1989;33:205-14.
35. Avila H, Goncalves AM, Nehme NS, et al. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from south and central America by analysis of PCR amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol* 1990;42:175-87.
36. Gomes ML, Galvão LM, Macedo AM, et al. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:205-10.
37. Maldonado C, Albano S, Vettorazzi L, et al. Using polymerase chain reaction in early diagnosis of reactivated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:1345-8.
38. Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, et al. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 2002;88:894-900.
39. Virreira M, Torrico F, Truyens C, et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68:574-82.
40. Benvenuti LA, Roggério A, Coelho G, et al. Usefulness of qualitative polymerase chain reaction for *Trypanosoma cruzi* DNA in endomyocardial biopsy specimens of chagasic heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 2011;30:799-804.

Anti-serum validation for use in immunohistochemistry for *Trypanosoma cruzi* detection

Paulo Hernane Rabelo Azevedo^[1], Marcelo Antônio Pascoal Xavier^[1],
Glenda Nicioli da Silva^[2], Priscilla Almeida da Costa^[3],
Cláudia Martins Carneiro^[4] and Geraldo Brasileiro Filho^[1]

[1]. Departamento de Anatomia Patológica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[2]. Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

[3]. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[4]. Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

Abstract

Introduction: The detection of *Trypanosoma cruzi* in tissue samples is important in many situations, such as testing of the reactivation of the infection. The detection of *T. cruzi* nests in endomyocardial biopsies (EMB) may be useful to evaluate graft rejection. Given their scarcity, such nests are not routinely identified. To increase the diagnosis sensitivity, immunohistochemistry (IHC) may serve as a promising strategy. Here, we validate an antiserum for the detection of *T. cruzi* infection by IHC. **Methods:** We used 1) positive controls (PCs) – 13 EMB, 12 skin biopsies, and 1 heart with *T. cruzi* nests as sections stained with hematoxylin and eosin (HE); 2) negative controls – a) 10 explant hearts and 10 EMB with no amastigote nests or clinical/laboratory signs of chagasic infection; and b) eight samples with leishmaniasis, toxoplasmosis, or histoplasmosis; and 3) Cases – 31 EMB of chagasic patients with no parasite nests in HE sections but detected positive for *T. cruzi* DNA by polymerase chain reaction. As a primary antibody, a hyperimmune serum from *T. cruzi*-infected rabbits was used. **Results:** IHC results were positive for 21 of 26 PCs (80.8%) and one case of cutaneous leishmaniasis. In 4 of 31 cases, IHC revealed nests (12.9%), which were undetected by conventional histological examination. **Conclusions:** This study shows that IHC with the tested antiserum increases the sensitivity of the diagnosis and may be recommended for routine use in EMB analyses of cardiac transplant patients with Chagas disease.

Keywords: Chagas disease. Heart transplantation. Immunohistochemistry. *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUCTION

Chagas disease, a chronic systemic parasitic infection caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, was discovered by Carlos Justiniano Ribeiro Chagas in 1909¹. According to the World Health Organization (WHO), it is one of the most neglected diseases in the world². An estimated 6 to 7 million people are infected worldwide, especially in Latin America³. Despite the successful programs to control the transmission of the etiological agent through vector and transfusion routes in Brazil in the last decade⁴, a considerable Brazilian population (about 3 to 4 million individuals) is infected by the parasite or is at the risk to develop serious lesions of the disease. Furthermore, the uncontrolled migration of people infected with *T. cruzi* poses a challenge to control new cases in non-endemic countries⁵⁻⁷ and urban areas of endemic countries⁸.

The majority of infected individuals (60% to 70%) fail to develop clinically apparent disease (indeterminate form). The remaining 30% to 40% present an anatomical clinical form of chronic cardiac, digestive (megaesophagus and/or megacolon), or cardio-digestive disease usually 10 to 30 years after the initial infection.

Chronic Chagas heart disease is the most serious and frequent manifestation of the disease. It affects 20%-30% of infected individuals and is an important cause of morbidity and mortality, as many individuals are unable to perform their usual activities and die of progressive heart failure and related complications⁹.

About 10% of patients with heart failure secondary to Chagas disease progress to New York Heart Association (NYHA) functional class IV¹⁰. In the last two decades, cardiac transplantation has become one of the therapeutic modalities and serves as the only strategy that may modify the natural progression of the disease¹¹.

In addition to the complications seen in solid organ transplants, Chagas disease is characterized with the reactivation of chagasic infection, owing to the immunosuppressive treatment

Corresponding author: Dr. Paulo Hernane Rabelo Azevedo.

e-mail: paulopato21@gmail.com

Received 26 February 2018

Accepted 4 July 2018



that patients receive to avoid graft rejection¹². Reactivation of Chagas disease in patients with depressed cellular immunity has been observed since the 1960s¹³.

There are several ways to recognize the reactivation of *T. cruzi* infection in transplanted individuals. In some cases, the clinical suspicion is related to the appearance of skin lesions that are suggestive of reactivation. Common manifestations of reactivation of chagasic infection are panniculitis, myocarditis with signs of heart failure, fever, fatigue, anorexia, diarrhea, meningitis, encephalitis, and stroke¹⁴⁻¹⁷.

Circulating *T. cruzi* is considered as a parasitological criterion for the diagnosis of acute phase or reactivation of chagasic infection by the II Brazilian Consensus on Chagas Disease and may be detected by several methods¹⁸. The parasitic deoxyribonucleic acid (DNA) may be effectively detected by molecular biology techniques, especially polymerase chain reaction (PCR) from blood samples or endomyocardial biopsies (EMB)¹⁹. PCR becomes positive a few days or weeks before the traditional parasitological tests and prior to clinical signs of reactivation^{20,21}. Given its high sensitivity, PCR results from blood samples should be interpreted with caution in subjects with chronic Chagas disease, as the test may be positive in immunocompetent or immunocompromised individuals without clinical signs of reactivation^{20,22}.

Endomyocardial biopsies, routinely performed after transplantation, aim to evaluate the immune rejection of grafts and determine its intensity. A pathologist is asked to identify and grade cellular rejection (absent, mild, moderate, or severe cell rejection). This graduation is based on histopathological aspects seen in EMB, such as the number of foci and pattern of inflammatory infiltrate, myocardiocytic lesion, edema, hemorrhage, and vasculitis²³. Conventional histopathological evaluation can identify the immunological rejection as well as amastigote nests of *T. cruzi* to confirm the reactivation of the infection in the implanted organ^{24,25}. As such nests are small and very scarce, these are rarely identified in routine exams. To increase the sensitivity of the morphological method, immunohistochemistry (IHC) may serve as a promising technique, as it allows more precise identification of sparse and very small nests.

The morphological evaluation of EMB after cardiac transplantation is a part of the protocol in these patients and has enormous practical importance because it guides immunosuppressive treatments in cases of cellular rejection and detects possible reactivation of the chagasic infection, which needs specific antiparasitic treatment. In these two scenarios with different clinical behaviors, the pathologist may contribute to the diagnosis of reactivation. However, it is difficult to make the differential diagnosis between moderate/severe acute cell rejection and reactivation of the chagasic infection, as the inflammatory infiltrate in both situations is morphologically indistinguishable.

Immunohistochemistry method has been used for the detection of *T. cruzi* antigens for more than 30 years²⁶. Since then, it has been shown to facilitate the identification of parasites, especially small nests, as compared to conventional pathological examination²⁷.

Previous studies have shown that the anti-*T. cruzi* polyclonal antiserum can detect the parasite in both human and other animal tissues. The highest detection rates were observed during the acute phase of the disease and in cases of chronic phase with active inflammation²⁸⁻³⁰. The detection rate is higher in heart samples than in brain samples³¹. Greater detection of the parasite was found in cases with moderate to severe inflammatory process³².

Despite the potential advantages of IHC in the detection of the reactivation of chagasic infection, there are no available commercial antibodies. This situation is probably associated with the lack of interest of technology companies in providing such an antibody, as Chagas disease diagnosis seems important only in countries with high prevalence of this disease.

The aim of this study is to validate an antiserum (polyclonal antibody) produced at a scientific research institution for the immunohistochemical diagnosis of *T. cruzi* infection.

METHODS

Selection, inclusion, and exclusion of samples

The Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFGM) Heart Transplant Service has been assisting patients with end-stage heart failure since 2006. Up to 2016, 81 patients with chagasic cardiopathy were submitted to heart transplantation. In this study, all the anatomopathological reports performed at the HC-UFGM Pathological Anatomy Laboratory from these patients after transplantation were reviewed and comprised 81 surgical specimens of cardiac explantation, 823 EMB, 18 skin/subcutaneous biopsies, and 1 autopsy of a chagasic patient who died after transplantation in order to select positive controls. Samples of EMB with insufficient material to acquire new histological sections and/or to extract DNA for PCR were excluded from the study.

Ethical considerations

The project followed all research standards involving human beings established in the Resolution 196 of the National Health Council to safeguard the rights and well-being of the people studied. The project was approved by the Research Ethics Committee (COEP) of UFGM.

Endomyocardial biopsies

Biopsies were performed at pre-established times and according to standard procedures at the HC-UFGM, following the recommendations of the Second Brazilian Guideline on Cardiac Transplantation³³. From each patient, four or five endomyocardial fragments were obtained; these fragments were fixed in 10% formalin, processed for inclusion in paraffin, and cut into sections (5µm thickness). From each sample, at least 15 staggered cuts were obtained and these were stained with hematoxylin and eosin (HE). All technical processing of the samples was performed in the Pathology Laboratory of the HC-UFGM.

Positive controls

Twenty-six HE-stained samples containing *T. cruzi* amastigote nests were selected as positive controls. These included 13 EMB, 12 skin biopsies, and 1 heart (autopsy) containing sections of left ventricle and interventricular septum.

Negative controls

Two groups of samples included as negative controls were as follows: 1) Samples without evidence of *T. cruzi* infection. Twenty anatomopathological specimens without amastigote nests of *T. cruzi* were selected; the patients had no clinical manifestations or laboratory tests indicative of chagasic infection. 2) Eight samples with a parasite morphologically similar to *T. cruzi* and potentially capable of showing cross-reaction. As *T. cruzi* and other microorganisms have some morphological similarities, leishmaniasis, toxoplasmosis, and histoplasmosis samples were included. These parasites or fungi were histologically confirmed by IHC analysis using their respective antibodies. In total, negative controls were represented by 10 explanted hearts, 10 EMB, 6 leishmaniasis, 1 toxoplasma, and 1 histoplasma samples.

Cases

Aside from the four or five tissue fragments from EMB for histopathological examination, one additional fragment was collected from all chagasic heart transplant patients in ethanol to evaluate for the presence of *T. cruzi* DNA by PCR, according to the current research protocol on Chagas disease carried out at HC-UFGM. From these samples, we selected 31 patients that were negative for parasite nests in conventional examination (HE) but positive for *T. cruzi* DNA in PCR test.

Histopathological study

All slides routinely examined for the evaluation of graft rejection were reviewed by two authors (Azevedo PHR and Brasileiro Filho G) for the validation of the histopathological findings, especially for the confirmation or exclusion of *T. cruzi* nests.

Immunohistochemical study

Antiserum production

For the anti-*T. cruzi* polyclonal antibody (antiserum) production, three New Zealand rabbits, approximately 60 days old, were kept in individual cages at the Animal Science Center of the Federal University of Ouro Preto [*Universidade Federal de Ouro Preto* (UFOP)] and provided with food and water *ad libitum*. The use, maintenance, and manipulation of the animals followed the standards recommended by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

The animals were intraperitoneally inoculated with 10^7 blood trypomastigote form of *T. cruzi* Y strain obtained from mice previously infected with this strain. Six months after inoculation, the animals were submitted to general anesthesia and whole blood was collected by cardiac puncture with subsequent euthanasia.

The blood was left at room temperature (20-25°C) in 10-mL glass tubes for 1h to induce clot formation and then centrifuged at 1,372g for 10 min. The serum obtained was homogenized, aliquoted, identified, and stored at -80°C until testing.

The antiserum was assessed in immunohistochemical assays on paraffin-embedded section from heart, spleen, and intestine of mice and dogs uninfected or infected by different strains of *T. cruzi* and proved to be effective in these animal samples.

The antiserum preparation was carried out at the Nucleus of Research in Biological Sciences of UFOP.

Immunohistochemical reaction

The histological sections were overnight oven dewaxed at 56°C, rehydrated with xylol baths (thrice for 5 min), 100% and 80% ethyl alcohol (thrice each, for 5 min), and running water for 5 min. Heat-induced antigen retrieval was performed with 0.01M sodium citrate solution (pH = 6.0) at 90°C for 20 min. The sections were blocked with an endogenous peroxidase in a methanol/hydrogen peroxide mixture (100mL of methanol and 3.5mL of 30% hydrogen peroxide) for 30 min at room temperature, followed by two washes in 10% phosphate buffered saline (PBS) solution (5 min each). The sections were subsequently blocked with skimmed milk powder diluted in 10% PBS (6g of skimmed milk powder in 100mL of PBS) for 30 min at room temperature to block nonspecific binding. The sections were incubated with the primary antibody (1:400,000 dilution) in PBS/1% bovine albumin (1870, Inlab, Diadema, Brazil) in a humid chamber at room temperature for 1h, followed by two washes with 10% PBS solution (5 min each). Next, the sections were incubated in a humid chamber for 30 min at room temperature with anti-immunoglobulin G (anti-IgG) secondary antibody (Novolink, Newcastle, UK), followed by two washes in 10% PBS solution (5 min each). Streptavidin-peroxidase complex (Kit Dako, LSAB, K0675, Carpinteria, USA) was subsequently applied and the preparation was incubated for 30 min in a humid chamber at 37°C. The peroxidase reaction was developed by incubation of the samples in DAB solution (50mg of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in 200mL of PBS and 400µL of 30% hydrogen peroxide) for 5 min. To stop the reaction, the sections were washed in PBS for 5 min and counter stained with Harris hematoxylin for 3s. The samples were washed in running water for 5 min, dehydrated, diaphanized in xylol, and mounted in Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

All sections were carefully examined under a microscope, initially under a panoramic view and then under 100 and 400× magnifications, to detect for signals indicative of target antigens of the antibody tested. Each positive sign of *T. cruzi* was topographed and subsequently compared to the sections stained with HE.

Polymerase chain reaction

As an alternative to detect chagasic infection in the samples studied, two PCR methods were used to test the fragments of heart biopsies for *T. cruzi* DNA as follows: 1) kinetoplast deoxyribonucleic acid polymerase chain reaction (kDNA PCR), specific amplification of a 330-bp fragment corresponding to the variable region of the mini-circle of the kDNA performed using primers S35 and S36, as described elsewhere^{21,34}; 2) real-time PCR of the 24SαrDNA gene, according to the method of Costa et al³⁵. These proposed protocols based on the PCR directed to mitochondrial (kDNA) and nuclear (rDNA 24Sα) markers have been useful for the diagnosis of Chagas disease, owing to good diagnostic sensitivity and specificity³⁵. For control groups (positive and negative), only kDNA PCR was performed; DNA samples were obtained from histological sections of paraffin-embedded tissues. In the group cases, both PCR methods were

used and DNA was extracted from fresh EMB collected in ethanol. Samples that were positive for at least one of the two PCR methods were considered as positive.

RESULTS

The results of the conventional histological (HE), DNA amplification (PCR), and IHC tests of all the cases examined in this study are summarized in **Figure 1**.

Immunohistochemical analysis of the 26 samples used as positive controls (13 EMB, 12 skin biopsies, and 1 necropsy of chagasic patient that died after transplantation) revealed

amastigote nests in eight EMB (**Figure 2**), 12 skin biopsies, and the autopsy heart (21 cases, 80.8%) (**Figure 1**). In five EMB (19.2% of total positive cases), the amastigote nests identified with HE staining were not seen in the IHC reactions (**Figure 1**). Eleven of the 26 positive controls (42.3%) were positive for the parasite DNA in PCR.

The IHC reaction with the anti-*T. cruzi* serum was negative in 27 of 28 negative control cases (96.4%). For one sample of cutaneous leishmaniasis (3.8%), the positive reaction with anti-*T. cruzi* antibody showed parasites dispersed in the interstitium (**Figure 3**). Both toxoplasma and histoplasma

Positive controls					Negative controls					Cases																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Nº case	HE	PCR	IHC	Sample	Nº case	HE	PCR	IHC	Sample	Nº case	HE	PCR	IHC	Sample																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
1	+	-	+	Skin biopsies	27	-	-	-	Hearts of non-chagasic patients	55	-	+	+	EMB of chagasic heart-transplanted patients																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
2	+	+	+		3	+	-	+		4	+	-	+		5	+	+	+	6	+	+	+	7	+	-	+	8	+	-	+	9	+	-	+	10	+	+	+	11	+	+	+	EMB of chagasic heart-transplanted patients	31	-	-	-	12	+	+	+	13	+	-	+	14	+	-	-	15	+	+	+	16	+	+	-	17	+	-	-	18	+	-	-	19	+	-	+	20	+	-	+	21	+	-	+	22	+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-
3	+	-	+		4	+	-	+		5	+	+	+		6	+	+	+	7	+	-	+	8	+	-	+	9	+	-	+	10	+	+	+	11	+	+	+	EMB of chagasic heart-transplanted patients	31	-	-		-	12	+	+	+	13	+	-	+	14	+	-	-	15	+	+	+	16	+	+	-	17	+	-	-	18	+	-	-	19	+	-	+	20	+	-	+	21	+	-	+	22	+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-			
4	+	-	+		5	+	+	+		6	+	+	+		7	+	-	+	8	+	-	+	9	+	-	+	10	+	+	+	11	+	+	+	EMB of chagasic heart-transplanted patients	31	-	-		-	12	+		+	+	13	+	-	+	14	+	-	-	15	+	+	+	16	+	+	-	17	+	-	-	18	+	-	-	19	+	-	+	20	+	-	+	21	+	-	+	22	+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-						
5	+	+	+		6	+	+	+		7	+	-	+		8	+	-	+	9	+	-	+	10	+	+	+	11	+	+	+	EMB of chagasic heart-transplanted patients	31	-	-		-	12	+		+	+	13		+	-	+	14	+	-	-	15	+	+	+	16	+	+	-	17	+	-	-	18	+	-	-	19	+	-	+	20	+	-	+	21	+	-	+	22	+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-									
6	+	+	+		7	+	-	+		8	+	-	+		9	+	-	+	10	+	+	+	11	+	+	+	EMB of chagasic heart-transplanted patients	31	-	-		-	12	+		+	+	13		+	-	+		14	+	-	-	15	+	+	+	16	+	+	-	17	+	-	-	18	+	-	-	19	+	-	+	20	+	-	+	21	+	-	+	22	+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-												
7	+	-	+		8	+	-	+		9	+	-	+		10	+	+	+	11	+	+	+	EMB of chagasic heart-transplanted patients	31	-	-		-	12	+		+	+	13		+	-	+		14	+	-		-	15	+	+	+	16	+	+	-	17	+	-	-	18	+	-	-	19	+	-	+	20	+	-	+	21	+	-	+	22	+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-															
8	+	-	+		9	+	-	+		10	+	+	+		11	+	+	+	EMB of chagasic heart-transplanted patients	31	-	-		-	12	+		+	+	13		+	-	+		14	+	-		-	15	+		+	+	16	+	+	-	17	+	-	-	18	+	-	-	19	+	-	+	20	+	-	+	21	+	-	+	22	+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																		
9	+	-	+		10	+	+	+		11	+	+	+		EMB of chagasic heart-transplanted patients	31	-	-		-	12	+		+	+	13		+	-	+		14	+	-		-	15	+		+	+	16		+	+	-	17	+	-	-	18	+	-	-	19	+	-	+	20	+	-	+	21	+	-	+	22	+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																					
10	+	+	+		11	+	+	+		EMB of chagasic heart-transplanted patients	31	-	-			-	12	+		+	+	13		+	-	+		14	+	-		-	15	+		+	+	16		+	+	-		17	+	-	-	18	+	-	-	19	+	-	+	20	+	-	+	21	+	-	+	22	+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																								
11	+	+	+	EMB of chagasic heart-transplanted patients	31	-	-	-	12		+	+	+			13	+	-		+	14	+		-	-	15		+	+	+		16	+	+		-	17	+		-	-	18		+	-	-	19	+	-	+	20	+	-	+	21	+	-	+	22	+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																													
12	+	+	+		13	+	-	+	14		+	-	-			15	+	+		+	16	+		+	-	17		+	-	-		18	+	-		-	19	+		-	+	20		+	-	+	21	+	-	+	22	+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																					
13	+	-	+		14	+	-	-	15		+	+	+			16	+	+		-	17	+		-	-	18		+	-	-		19	+	-		+	20	+		-	+	21		+	-	+	22	+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																									
14	+	-	-		15	+	+	+	16		+	+	-			17	+	-		-	18	+		-	-	19		+	-	+		20	+	-		+	21	+		-	+	22		+	-	+	23	+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																													
15	+	+	+		16	+	+	-	17		+	-	-			18	+	-		-	19	+		-	+	20		+	-	+		21	+	-		+	22	+		-	+	23		+	+	+	24	+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																	
16	+	+	-		17	+	-	-	18		+	-	-			19	+	-		+	20	+		-	+	21		+	-	+		22	+	-		+	23	+		+	+	24		+	-	-	25	+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																					
17	+	-	-		18	+	-	-	19		+	-	+			20	+	-		+	21	+		-	+	22		+	-	+		23	+	+		+	24	+		-	-	25		+	+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																									
18	+	-	-		19	+	-	+	20		+	-	+			21	+	-		+	22	+		-	+	23		+	+	+		24	+	-		-	25	+		+	+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																														
19	+	-	+		20	+	-	+	21		+	-	+			22	+	-		+	23	+		+	+	24		+	-	-		25	+	+		+	26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																			
20	+	-	+		21	+	-	+	22		+	-	+			23	+	+		+	24	+		-	-	25		+	+	+		26	+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																								
21	+	-	+		22	+	-	+	23		+	+	+			24	+	-		-	25	+		+	+	26		+	+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																													
22	+	-	+		23	+	+	+	24		+	-	-			25	+	+		+	26	+		+	+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																		
23	+	+	+		24	+	-	-	25		+	+	+			26	+	+		+	Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																							
24	+	-	-		25	+	+	+	26		+	+	+			Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																												
25	+	+	+		26	+	+	+	Autopsy		32	-	-		-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																	
26	+	+	+		Autopsy	32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																							
32	-	-	-	33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																													
33	-	-	-	34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																	
34	-	-	-	35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																					
35	-	-	-	36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																									
36	-	-	-	37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																													
37	-	-	-	38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																	
38	-	-	-	39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																					
39	-	-	-	40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																									
40	-	-	-	41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																													
41	-	-	-	42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																	
42	-	-	-	43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																					
43	-	-	-	44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																									
44	-	-	-	45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																													
45	-	-	-	46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																	
46	-	-	-	47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																					
47	-	-	-	48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																									
48	-	-	-	49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																													
49	-	-	-	50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																	
50	-	-	+	51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																					
51	-	-	-	52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																									
52	-	-	-	53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																													
53	-	ND	-	Toxoplasmosis	54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																	
54	-	ND	-	Histoplasmosis	56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																						
56	-	+	+	57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																											
57	-	+	+	58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																															
58	-	+	+	59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																			
59	-	+	-	60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																							
60	-	+	-	61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																											
61	-	+	-	62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																															
62	-	+	-	63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																			
63	-	+	-	64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																							
64	-	+	-	65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																											
65	-	+	-	66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																															
66	-	+	-	67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																			
67	-	+	-	68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																							
68	-	+	-	69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																											
69	-	+	-	70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																															
70	-	+	-	71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																			
71	-	+	-	72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																							
72	-	+	-	73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																											
73	-	+	-	74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																															
74	-	+	-	75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																																			
75	-	+	-	76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																																							
76	-	+	-	77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																																											
77	-	+	-	78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																																															
78	-	+	-	79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
79	-	+	-	80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
80	-	+	-	81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
81	-	+	-	82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
82	-	+	-	83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
83	-	+	-	84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
84	-	+	-	85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
85	-	+	-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															

FIGURE 1: Results of *Trypanosoma cruzi* detection PCR, conventional histology using HE, and IHC of positive controls, negative controls, and cases. **HE:** hematoxylin and eosin; **PCR:** polymerase chain reaction; **IHC:** immunohistochemical reaction; **EMB:** endomyocardial biopsies; **ND:** not done.

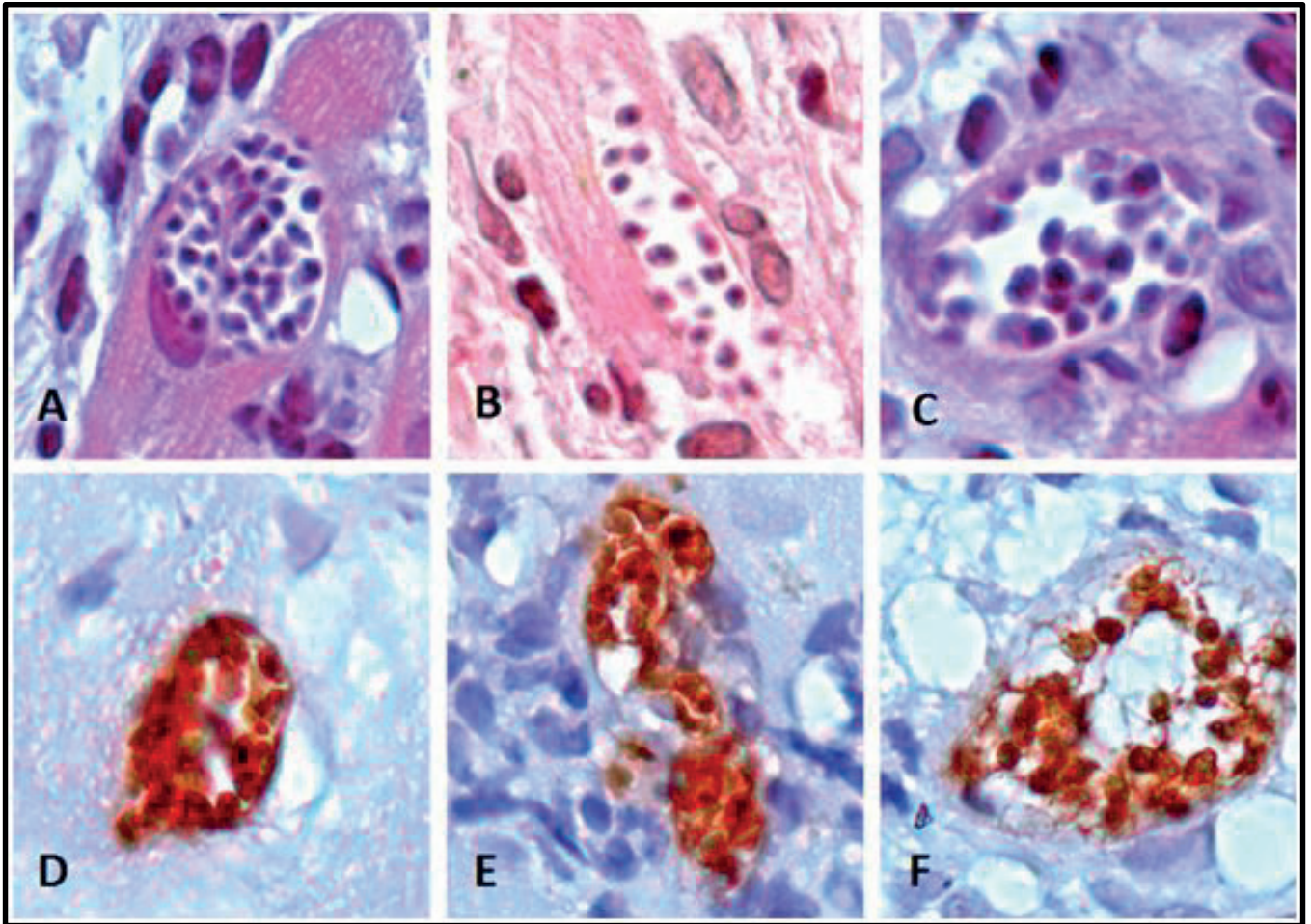


FIGURE 2: A, B, and C. Endomyocardial biopsies showing nests of amastigote forms of *T. cruzi* in the cytoplasm of myocardiocytes. Hematoxylin and eosin (1,000× magnification). D, E, and F. *T. cruzi* amastigote forms stained by the immunohistochemical reaction with anti-*T. cruzi* polyclonal antibody (1,000× magnification). *T.*: *Trypanosoma*.

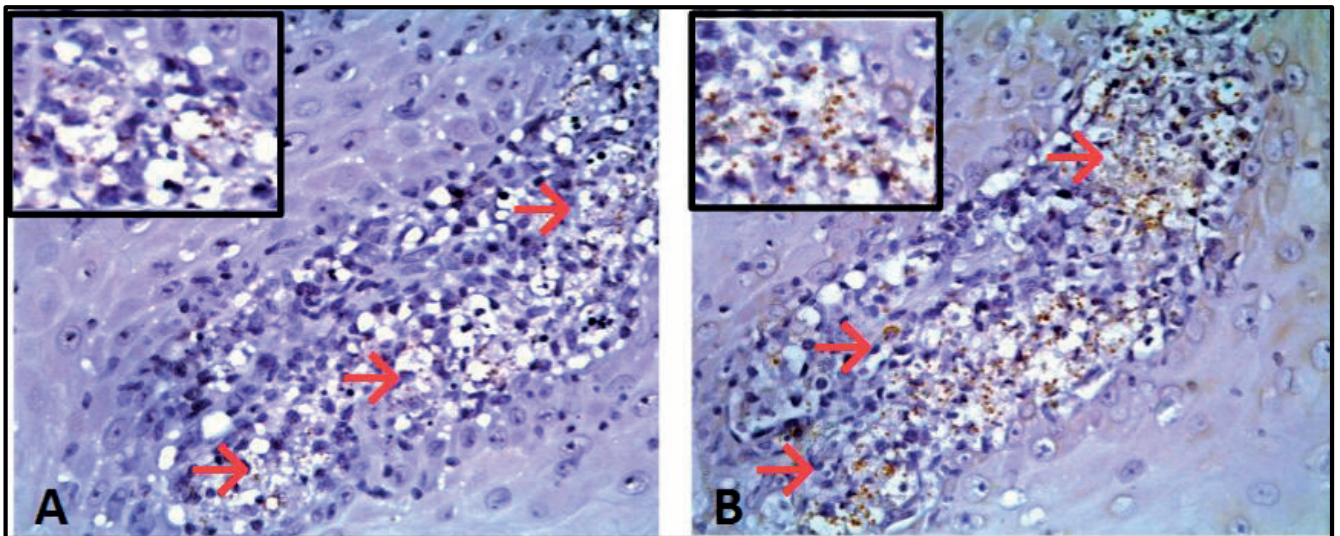


FIGURE 3: A. Skin biopsy of a patient with clinical and immunohistochemical diagnosis of cutaneous leishmaniasis showing parasitic amastigote forms dispersed in the interstitium, as stained with anti-*T. cruzi* antibody (arrows; 400× magnification). In detail, cross-reactive leishmania amastigote forms (1,000× magnification). B. Same biopsy and topography of the case shown in A revealing many amastigote forms of leishmania stained with anti-leishmania antibody. *T.*: *Trypanosoma*.

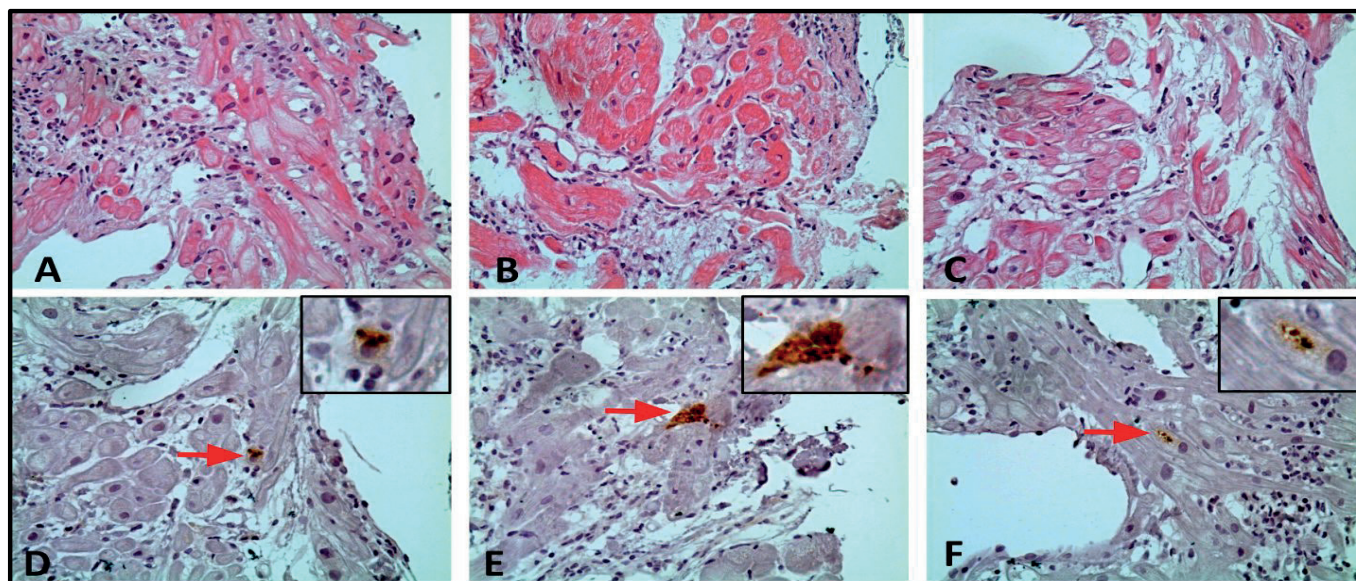


FIGURE 4: A, B, and C. Endomyocardial biopsies with no evidence of *T. cruzi* amastigote nests in histopathological examination using hematoxylin and eosin (200× magnification). D, E, and F. Same biopsies and topography of the cases shown in A, B, and C, respectively, with *T. cruzi* amastigote forms stained with anti-*T. cruzi* polyclonal antibody (arrows; 200× magnification). In detail, *T. cruzi* amastigote forms (1,000× magnification). *T.*: *Trypanosoma*.

samples showed negative results. None of the 26 negative controls were positive for *T. cruzi* DNA in the PCR test.

Four (12.9%) of the 31 samples of EMB selected as cases were positive for *T. cruzi* nests with IHC (Figure 4); parasite nests were undetected by conventional histological examination.

From the 85 samples analyzed, 26 (31.3%) had positive histopathology (*T. cruzi* amastigote nests), while the remaining 59 (69.4%) cases showed negative HE staining (absence of *T. cruzi* nests).

Twenty-one of the 26 (80.8%) samples selected as positive controls were positive for *T. cruzi* antigens in IHC test. Of the 28 negative controls, 27 (96.4%) showed no reaction with *T. cruzi* antigens.

DISCUSSION

In comparison with the conventional HE staining, IHC performed with the antiserum used in this study showed good sensitivity for the detection of *T. cruzi*, indicative of the feasibility of this method for the detection of the parasite. Five EMB (19.2% of positive controls) samples were negative for the parasite antigen in IHC. The most likely explanation for this result is the scarcity of the parasite nests and their small size, which may explain their absence in many histological sections. *T. cruzi* nests seen in the histological sections (HE) may not have been included in the sections obtained in the second microtomy; the paraffin block adjustment in the microtome to obtain new sections for IHC may have greatly deepened the sample, which explains the absence of these small and few nests in the sections used for IHC. Hence, it is recommended that the tissue sections are collected at the same time on slides for both conventional histopathology and IHC to include amastigote nests in most histological sections obtained. Such a technique is already

performed in other contexts, wherein the target of analysis is scarce and may be lost in the acquisition of new sections, such as axillary sentinel node biopsies for the evaluation of patients with breast cancer³⁶.

A cutaneous leishmaniasis sample was detected positive with the anti-*T. cruzi* antiserum in IHC. No other negative control sample showed positive reaction, indicative of the good specificity of the method. Anti-*T. cruzi* polyclonal antibody used in the present study may cross-react with other parasites and should therefore be used in close correlation with the clinical and laboratory data of the patient as well as obvious morphological correspondence to the histopathological examination in HE. Cross-reaction with antigens of leishmaniasis was also observed by Barbosa et al.³⁷ using another antiserum against *T. cruzi*. Thus, it is recommended to use this method with large number of leishmaniasis cases to better understand the results and possible cross-reaction. Furthermore, it is necessary to test more specimens with anatomopathological diagnosis of other infectious diseases caused by parasites with morphologies similar to those of amastigote forms of *T. cruzi* (e.g., toxoplasmosis and histoplasmosis) to recognize other probable cross-reactions of the antibody under study.

The present study showed that IHC using anti-*T. cruzi* antiserum increases the chances of detection of the parasite in EMB. Four of 31 EMB harboring *T. cruzi* DNA, as detected by PCR, were positive for *T. cruzi* nests in IHC but were undetected by conventional histology. This increase in the sensitivity of the morphological diagnosis of the reactivation of chagasic infection supports the use of the method as a complementary evaluation technique in the EMB of transplanted chagasic patients.

The differential diagnosis between cell rejection and reactivation of chagasic infection has enormous importance in

the case of transplant patients because the clinical management is very different in both situations. Thus, it is essential that, in addition to the conventional histopathological examination (HE) for the detection of parasite amastigote nests in all EMB of cardiac transplant patients with Chagas disease, the morphological evaluation should be complemented with IHC study. We suggest that the transplant patient care groups should include IHC as a routine test in the histopathological evaluation of all EMB in the care protocols to diagnose the reactivation of *T. cruzi* infection, at least for samples where mononuclear cell infiltration is evident. Given the small size of the nests and their occasional suppression in serial histological sections, IHC should be performed for at least three sequential cuts to increase the chances of the parasite detection.

The negativity of *T. cruzi* DNA in the PCR method for 15 (57.7%) of the 26 positive controls may be attributed to some factors. The most likely reason is DNA degradation by formaldehyde used as fixative. Standard 10% formalin solution was used in all samples. Conventional (unbuffered) formaldehyde solutions have a wide pH range, which may cause DNA damage and impair DNA detection in PCR³⁸. It is, therefore, recommended that such samples be fixed in buffered formaldehyde (pH of 7.4) to increase the preservation of the parasite DNA and improve its detection chance.

As this study is at an initial stage, we were unable to adequately characterize the antibody studied. In fact, an antiserum with a large number and variety of antibodies was used in this study. The isolation and characterization of the antibody may provide further information on its properties and explain the possible cross-reactivity with leishmanial antigens.

The anti-*T. cruzi* polyclonal antibody (antiserum) used in this study proved to be adequate for the purpose of increasing the sensitivity of the morphological diagnosis of reactivation of chagasic infection. The increase in parasite detection observed in this study recommends the use of IHC with anti-*T. cruzi* antiserum tested herein as a complementary method in the early diagnosis of the reactivation of *T. cruzi* infection in chagasic patients submitted to heart transplantation.

It is also expected that commercial companies would get interested in providing antibodies for such purpose for the widespread clinical usage. We expect that the antiserum used herein could be an alternative to this.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990;1(2):159-218.
- World Health Organization (WHO). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report in neglected tropical diseases. Geneva: WHO; 2013. 138p. Available at: <http://www.who.int/iris/handle/10665/77950>
- World Health Organization (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis). Geneva: WHO; 2015. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
- Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(1):31-40.
- Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions: a comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(3):277-82.
- Dias JCP. Human Chagas disease and migration in the context of globalization: some particular aspects. J Trop Med. 2013;p. 1-9. Article ID: 789758.
- Manne-Goehler J, Umeh CA, Montgomery SP, Wirtz VJ. Estimating the burden of Chagas disease in the United States. PLoS Negl Trop Dis. 2016;7(10(11):e0005033.
- Luna EJ, Furucho CR, Silva RA, Wanderley DM, Carvalho NB, Satolo CG, et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among Bolivian immigrants in the city of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017;112(1):70-74.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010;375(9723):1388-402.
- Dolgin M, Association NYH, Fox AC, Gorlin R, Levin RI. The Criteria Committee of the New York Heart Association.. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. 9th edition. Boston, MA: Lippincott Williams and Wilkins; 1994. p.253-6.
- Fiorelli AI, Santos RH, Oliveira JL Jr, Lourenço-Filho DD, Dias RR, Oliveira AS, et al. Heart transplantation in 107 cases of Chagas' disease. Transplant Proc. 2011;43(1):220-4.
- Godoy HL, Guerra CM, Viegas RF, Dinis RZ, Branco JN, Neto VA, et al. Infections in heart transplant recipients in Brazil: the challenge of Chagas' disease. J Heart Lung Transplant. 2010;29(3):286-90.
- Ferreira MS, Nishioka AS, Rocha A. Doença de Chagas e imunossupressão. In: Dias JCP, Coura JR, editors. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas- Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1997. p. 365-81.
- Campos SV, Strabelli TM, Amato Neto V, Silva CP, Bacal F, Bocchi EA, et al. Risk factors for Chagas' Disease reactivation after heart transplantation. J Heart Lung Transplant. 2008;27(6):597-602.
- Bocchi E, Bellotti D, Uip J, et al. Long-term follow-up after heart transplantation in Chagas' disease. Transplant Proc. 1993;25(1pt2):1329-30.
- Stolf NA, Higushi L, Bocchi E, Bellotti G, Auler JO, Uip D, et al. Heart transplantation in patients with Chagas' disease cardiomyopathy. J Heart Transplant. 1987;6(5):307-12.
- d'Avila SC, d'Avila AM, Pagliari C, Gonçalves VM, Duarte MI. Eritema nodoso como forma de reativação da doença de Chagas em transplantado cardíaco. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(1):61-3.
- Dias JC, Ramos AN Jr, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49(Suppl1):3-60.
- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop Med Hyg. 2003;68(5):574-82.
- Benvenuti LA, Rogério A, Sambiase NV, Fiorelli A, Higuchi ML. Polymerase chain reaction in endomyocardial biopsies for monitoring reactivation of Chagas' disease in heart transplantation: a case report and review of the literature. Cardiovasc Pathol. 2005;14(5):265-8.

21. Maldonado C, Albano S, Vettorazi L, Salomone O, Zlocowski JC, Abiega C, et al. Using polymerase chain reaction in early diagnosis of re-activated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2004;23(12):1345-8.
22. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;51(6):771-7.
23. Nair V, Butany J. Heart transplant biopsies: interpretation and significance. *J Clin Pathol*. 2010;63(1):12-20.
24. Pinazo MJ, Miranda B, Rodríguez-Villar C, Altclas J, Brunet Serra M, García-Otero EC, et al. Recommendations for management of Chagas disease in organ and hematopoietic tissue transplantation programs in nonendemic areas. *Transplant Rev (Orlando)*. 2011;25(3):91-101.
25. Souza MM, Franco M, Almeida DR, Diniz RV, Mortara RA, Silva S, et al. Comparative histopathology of endomyocardial biopsies in Chagasic and non-Chagasic heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20(5):534-43.
26. Barbosa AJ. Immunocytochemical method for the identification of *Trypanosoma cruzi* amastigotes in routine histological sections. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1985;27(6):293-7.
27. Barbosa AJ, Gobbi H, Lino BT, Lages-Silva E, Ramirez LE, Teixeira VP, et al. Comparative study of the conventional method and the peroxidase-antiperoxidase method in the search for tissue parasitism in chronic Chagas' cardiopathy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1986;28(2):91-6.
28. Fuenmayor C, Higuchi ML, Carrasco H, Parada H, Gutierrez P, Aiello V, et al. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. *Acta Cardiol*. 2005;60(1):33-7.
29. Pittella JE, Meneguette C, Barbosa AJ, Bambirra EA. Histopathological and immunohistochemical study of the brain in the acute and chronic phases of experimental trypanosomiasis cruzi in dogs. *Ann Trop Med Parasitol*. 1990;84(6):615-21.
30. Caliari MV, de Lana M, Cajá RA, Carneiro CM, Bahia MT, Santos CA, et al. Immunohistochemical studies in acute and chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Virchows Arch*. 2002;441(1):69-76.
31. Pittella JE, Meneguette C, Barbosa AJ. Histopathological and immunohistochemical studies of the brain and heart in the chronic cardiac form of Chagas' disease. *Arq Neuropsiquiatr*. 1993;51(1):8-15.
32. Higuchi ML, De Brito T, Martins Reis M, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*. 1993;2(2):101-6.
33. Bacal F, Souza Neto JD, Fiorelli AI, Mejia J, Marcondes-Braga FG, Mangini S, et al. II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. *Arq Bras Cardiol*. 2009;94(1supl):e16-e-76.
34. Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol*. 2005;35(4):411-7.
35. Costa PA, Segatto M, Durso DF, de Carvalho MWJ, Junqueira LL, de Castilho FM, et al. Early polymerase chain reaction detection of Chagas' disease reactivation in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36(7):797-805.
36. Silverberg SG. Sentinel node processing: recommendations for pathologists. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(3):383-5.
37. Barbosa AJ, da Costa CA, Michalick MS, Mayrink W, Gazzinelli RT, Tafuri WL. Immunocytochemical identification of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* amastigotes in situ with homologous and heterologous polyclonal antibodies. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1991;24(1):5-11.
38. Fernandes JV, Meissner RV, Fernandes TAAM, da Rocha LRM, Cabral MC, Villa LL. Comparison of three DNA extraction protocols from formaldehyde and paraffin-embedded tissues. *J Bras de Patol Med Lab*. 2004;40(3):141-6.

CAPÍTULO 2– Genotipagem e estudo da variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* presente em amostras biológicas de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados

2.1. Diversidade intraespecífica do *Trypanosoma cruzi*

Conforme já abordado, a doença de Chagas possui um curso clínico variável, sendo que alguns indivíduos infectados desenvolvem cardiopatia, outros apresentam quadros de megaesôfago e/ou megacólon, enquanto a maioria permanece assintomática durante toda a vida. Ademais, alguns pacientes quando submetidos ao transplante cardíaco e tratamento com imunossupressor, apresentam reativação da doença enquanto outros não. Os fatores que influenciam essa variabilidade clínica ainda não foram elucidados, mas é razoavelmente estabelecido que a variação genética tanto do hospedeiro, quanto do parasito, é importante (Macedo & Pena, 1998).

Em relação ao parasito, sabe-se que o *T. cruzi* exibe alto grau de polimorfismo intraespecífico. Inicialmente, essa variabilidade foi demonstrada por meio de caracterizações morfológicas, tais como diferenças relacionadas à morfologia das formas das tripomastigotas sanguíneas, ao tropismo tecidual, às variações na virulência e patogenicidade, às diferentes taxas de crescimento e mortalidade e à suscetibilidade aos quimioterápicos, dentre outras (Chagas, 1909; Brener, 1963; Andrade, 1974; Melo & Brener, 1978; Brener, 1980; Andrade *et al.*, 1985; Filardi & Brener, 1987; Andrade *et al.*, 2010).

Também do ponto de vista bioquímico-molecular, o *T. cruzi* possui grande diversidade genética. Estudos pioneiros, nesta área, foram baseados na análise de variantes eletroforéticas de isoenzimas (MLEE). Esta técnica envolve a eletroforese de extratos protéicos do parasito em gel de amido ou placas de acetato celulose e possui colorações bioquímicas com substratos colorimétricos ou fluorescentes para as diferentes enzimas. Assim, baseando-se no polimorfismo observado nos perfis eletroforéticos de seis enzimas, Miles e colaboradores (1977; 1978) propuseram a existência de três grupos principais denominado então de: zimodemas Z1, Z2 e Z3, sendo que cada zimodema agrupava cepas com o mesmo perfil eletroforético de isoenzimas. Estudos epidemiológicos subsequentes demonstraram que Z1 e Z3 estão relacionados ao ciclo de transmissão silvestre e Z2 com o ciclo doméstico (Miles *et al.*, 1978).

Com o avanço tecnológico da biologia molecular, novas técnicas foram sendo desenvolvidas, permitindo o refinamento do estudo da diversidade de *T. cruzi* em nível de DNA. Já no final da década de 70, Morel e colaboradores (1980) determinaram novos agrupamentos no táxon *T. cruzi* a partir da análise de padrões eletroforéticos complexos derivados de fragmentos do DNA do cinetoplasto (kDNA) obtidos por digestão com enzimas de restrição, que foram denominados de esquizodemas. Essa técnica, que revela

Polimorfismos de Fragmento de Restrição ou RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), constituiu os primeiros estudos de polimorfismos de DNA desse parasito.

Em seguida, diversos marcadores moleculares polimórficos foram sendo gradativamente elucidados. Em 1993, Souto & Zingales observaram dimorfismo molecular entre as linhagens de *T. cruzi* nas sequências do gene codificador do RNA ribossomal (rRNA) 24S α e, utilizando iniciadores desenhados para a região de 100 pb na extremidade 3' deste gene, definiram dois grupos de acordo com o produto de amplificação. Enquanto um grupo (denominado, na época, de grupo 1) apresentou fragmento de 125 pb, o outro grupo (denominado 2) apresentou fragmento de 110 pb (Souto & Zingales, 1993). Mais tarde, novas variantes do tamanho destes fragmentos foram identificadas (Augusto-Pinto *et al.*, 2003, Brisse *et al.*, 2001).

Souto e colaboradores, em 1996, desenvolveram uma PCR multiplex utilizando três iniciadores diferentes para amplificação do espaçador não-transcrito do gene de miniéxon. Com essa estratégia também foi possível agrupar as cepas do *T. cruzi* em dois grupos distintos de acordo com os produtos de amplificação: (i) cepas que apresentaram produtos de 300 pb foram caracterizadas, naquela época, como pertencentes ao grupo 1; (ii) e as que apresentaram produtos de 350 pb foram caracterizadas como pertencentes ao grupo 2 (Souto *et al.*, 1996).

Outra técnica baseada em PCR também foi desenvolvida: a análise de polimorfismos do DNA amplificado aleatoriamente (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*). Este método baseia-se na amplificação do DNA genômico com iniciador único, geralmente curto, de sequência arbitrária, sob baixas condições de restringência, gerando perfis complexos de bandas (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Foi verificada uma significativa correlação entre o perfil de RAPD, perfil de rDNA, miniéxon e de isoenzimas (MLEE) em cepas de *T. cruzi*. Esses achados demonstraram pela primeira vez que haviam grupos populacionais discretos de *T. cruzi* filogeneticamente relacionados (Revisado por Macedo *et al.*, 2004).

Com a finalidade de se detectar múltiplas mutações em fragmentos de DNA, sem a necessidade de uso de enzimas de restrição, foi desenvolvida a PCR em baixa stringência, utilizando um único iniciador, denominado de LSSP-PCR- *Low Stringency Single Specific Primer Polymerase Chain Reaction* (Pena *et al.*, 1994). Inicialmente, amplifica-se o segmento gênico específico do organismo que se deseja avaliar o polimorfismo. Em seguida, após a sua amplificação e purificação, o fragmento é

submetido à uma nova PCR usando um dos iniciadores que o gerou, em condições de baixa estringência. Os produtos dessa segunda amplificação geram um perfil de bandas complexo e característico para esse fragmento, denominado de assinatura gênica. Esse perfil é tão individual que modificações em um único par de bases podem ser detectadas (Segatto *et al.*, 2013). Essa foi a primeira técnica disponível para caracterizar a diversidade do parasito presente diretamente em amostras biológicas a partir da amplificação inicial dos fragmentos de 330 pb de *T. cruzi*, derivados das regiões variáveis dos minicírculos do kDNA (Macedo & Pena, 1998).

Em 1998, com a descoberta de microsatélites polimórficos no genoma de *T. cruzi*, surgiu uma abordagem alternativa para caracterizar esse parasito diretamente em amostras biológicas (Oliveira *et al.*, 1998). Os microsatélites, também chamados de STR (*Short Tandem Repeats*), são sequências curtas de DNA, de 2 a 6 pb repetidas em *tandem* (Henderson & Petes, 1992; Levinson & Gutman, 1987; Litt & Luty, 1989). Eles são considerados poderosos marcadores genéticos devido à sua abundância, dispersão no genoma e alto grau de polimorfismo de tamanho, sendo amplamente usados em análises de parentesco, construção de mapas genéticos de alta densidade, estudos filogenéticos e populacionais (Goldstein & Pollock, 1997; Knapik *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 1998).

Resumindo, ao longo dos anos, várias abordagens foram sendo utilizadas para caracterizar a estrutura da população de *T. cruzi*, definindo diversos subgrupos no táxon. Esses subgrupos, ao longo da história, receberam designações diferentes, incluindo zimodemas (Miles *et al.* 1977, 1978, 1981), esquizodemas (Morel *et al.*, 1980), biodemas (Andrade, 1974) *clonets* (Tibayrenc & Ayala, 1991), linhagens (Souto *et al.*, 1996), clados (Kawashita *et al.*, 2001), haplótipos (Freitas *et al.*, 2006; Herrera *et al.*, 2007) e *discrete typing or taxonomic units* (DTU) (Tibayrenc, 1998), o que complicou bastante a comparação de resultados obtidos por diferentes laboratórios.

Em 1999, durante o Simpósio Internacional em comemoração aos 90 anos da descoberta da doença de Chagas, foi oficializada a primeira classificação das populações de *T. cruzi*, a qual foi subdividida em duas linhagens principais: *T. cruzi* I, correspondente ao zimodema I, rDNA 24Sα e miniéxon tipo 2, dentre outros marcadores e *T. cruzi* II, correspondente ao zimodema II, rDNA 24Sα e miniéxon tipo 1. A linhagem 1 estava constituída por cepas associadas principalmente ao ciclo silvestre e baixa parasitemia em pacientes chagásicos e a linhagem 2, por outro lado, por cepas associadas ao ciclo doméstico, elevada parasitemia e manifestações mais graves da doença (Zingales *et al.*,

1999). No entanto, nem todas as cepas puderam ser classificadas com a metodologia utilizada, o que exigiu estudos adicionais para uma classificação molecular mais abrangente.

Assim, em 2009, durante o simpósio comemorativo do centenário da descoberta da doença de Chagas, foi oficializada a subdivisão da espécie *T. cruzi* em seis unidades discretas de tipagem (do inglês *discrete typing units* - DTUs), de TcI a TcVI. Uma DTU é definida como um conjunto de isolados geneticamente semelhantes que podem ser identificados por marcadores moleculares e imunológicos comuns (Zingales *et al.*, 2009), podendo apresentar distribuição diferencial em vetores, hospedeiros definitivos e ciclos de transmissão (Zingales *et al.*, 2012).

Posteriormente, foi proposta a inclusão de uma sétima DTU, chamada de TcBat, que inicialmente estava associada aos morcegos, mas recentemente foi encontrada em seres humanos (Ramirez *et al.*, 2014). Esta inclusão ainda não foi oficialmente definida, o que provavelmente pode ocorrer esse ano.

2.2. Genotipagem das seis principais DTUs de *Trypanosoma cruzi*

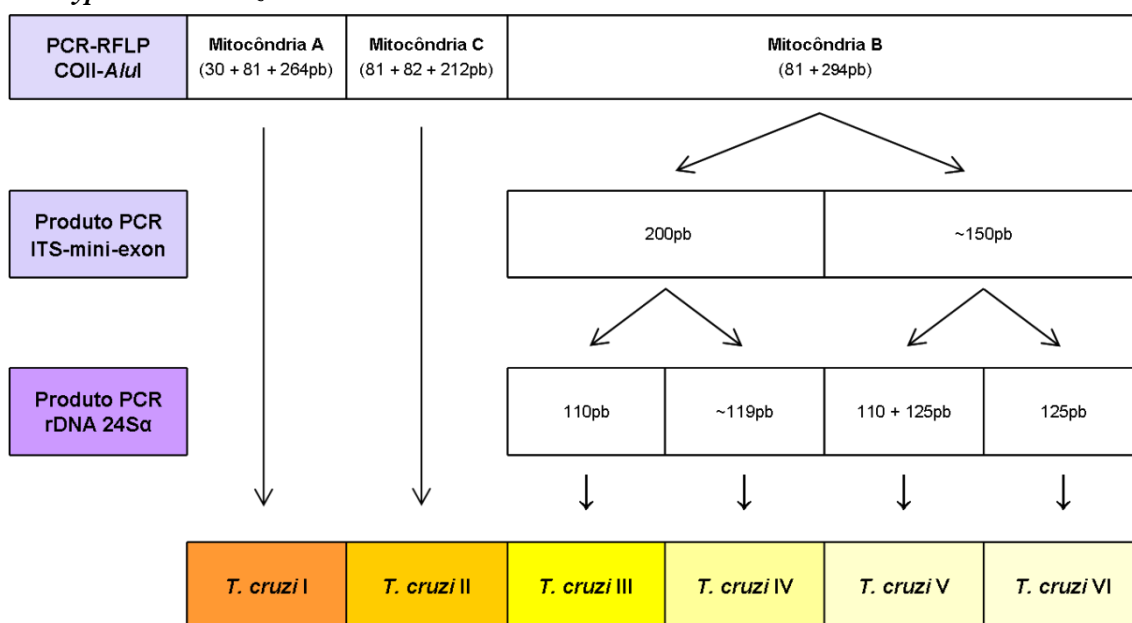
Vários métodos têm sido relatados para a caracterização e genotipagem de populações de *T. cruzi*, incluindo a amplificação por PCR da região intergênica do miniéxon, rDNA 24S α , rDNA 18S (Souto *et al.*, 1996; Brisse *et al.*, 2001) e análises utilizando multilocus PCR-RFLP (Rozas *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2009). No entanto, essas técnicas são consideradas limitadas, pois alguns resultados baseiam-se na ausência de bandas ao invés de sua presença, enquanto outras necessitam da combinação de vários ensaios, o que as tornam muito complexas (Zingales *et al.*, 2012).

Em 2009, Lewis e colaboradores propuseram uma estratégia de tipagem sequencial utilizando três marcadores capazes de discriminar as seis principais DTUs. Consiste na amplificação por PCR do rDNA 24S α , seguida de PCR-RFLP da proteína de choque térmico 60 (HSP60) e da glicose-6-fosfato isomerase (GPI). No mesmo ano, D'Avila e colaboradores descreveram um outro ensaio também baseado em três passos de amplificação por PCR. Primeiramente, é realizada a PCR-RFLP do gene COII, que consiste na amplificação da subunidade II do gene da Citocromo Oxidase, seguida da digestão com a enzima *AluI*. Esta etapa é suficiente para identificar cepas das DTUs TcI e TcII, mas não diferencia as demais linhagens. Em seguida, é realizada a PCR da região intergênica do gene do miniéxon, o que permite a separação das demais cepas, que ainda não foram classificadas, em dois grupos: um grupo formado por TcIII e TcIV e outro

grupo por TcV e TcVI. Finalmente, é realizada uma PCR do gene rDNA 24S α , permitindo a completa discriminação de todas as seis DTUs (Figura 2.1).

Uma adaptação dessa última estratégia foi posteriormente desenvolvida de forma que as etapas de PCR convencional do procedimento original foram transformadas em etapas de *nested* PCR (Valadares *et al.*, 2008). Essa adaptação otimizou a amplificação do DNA de *T. cruzi* presente diretamente das amostras clínicas dos pacientes, permitindo a sua detecção mesmo em condições em que o DNA do parasito está presente em pequenas quantidades, como ocorre na maioria dos casos de pacientes com doença de Chagas na fase crônica (Revisado por Macedo & Segatto, 2010).

Figura 2.1 - Esquema do ensaio triplo utilizado para discriminação das seis DTUs principais de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Macedo & Segatto, 2010.

Ainda em relação aos métodos de tipagem das DTU de *T. cruzi* em amostras biológicas, Brenière e colaboradores (2012) caracterizaram 234 cepas de *T. cruzi* diretamente do trato digestivo de *T. infestans* selvagens coletados na Bolívia, usando dois ensaios sequenciais: PCR multiplex do gene do miniéxon — que permitiu distinguir as cepas em três DTUs: (1) TcI (200 pb), (2) TcII, V, VI (250 pb) e (3) TcIII e IV (150 pb) - e sequenciamento parcial do gene da glicose fosfato isomerase (GPI), que permitiu a distinção entre as cepas pertencentes ao grupo 2 e ao grupo 3, pelo alinhamento da sequência dessas cepas com as sequências correspondentes das DTUs de *T. cruzi* anteriormente depositadas no GenBank (Brenière *et al.*, 2012).

Também utilizando a técnica de sequenciamento, Garcia *et al.* (2017) realizaram a genotipagem do parasito presente em amostras de sangue de 15 pacientes chagásicos no Texas (EUA), utilizando como marcador molecular a região intergênica do gene do miniéxon de *T. cruzi*.

Outra metodologia de genotipagem introduzida mais recentemente foi a MLS-PCR (*minicircle lineage specific- PCR*). Essa técnica envolve o uso de sondas de DNA específicas que detectam as sequências complementares para cada DTU presentes em fragmentos amplificados de regiões hipervariáveis do minicírculo do kDNA. Essa estratégia tem mostrado resultados promissores para a caracterização de *T. cruzi* diretamente de amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos (Bontempi *et al.*, 2016).

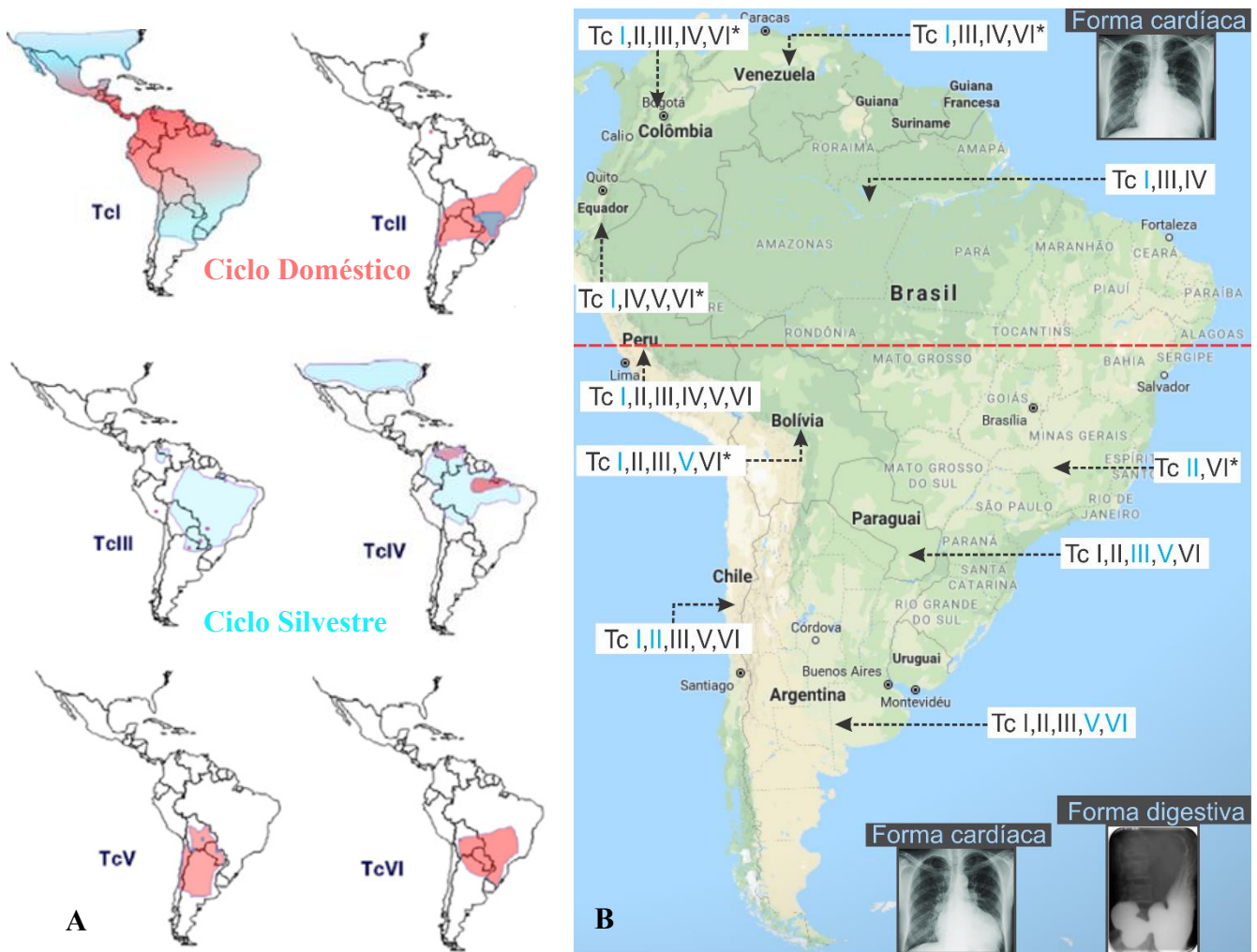
Além das metodologias já descritas, estratégias para genotipagem baseadas em ensaios multiplex de PCR em tempo real também têm sido utilizadas, com bom poder discriminatório para as DTUs de *T. cruzi* presentes em amostras clínicas (Cura *et al.*, 2015). Recentemente, Martín *et al.* (2017) utilizaram essa técnica, tendo como alvo dois genes nucleares (SL-IR e 18S rDNA) e dois genes mitocondriais (COII e ND1), e cada DTU foi estabelecida após um único ensaio de PCR multiplex em tempo real em 67,9% das amostras clínicas cronicamente infectadas.

2.3. Epidemiologia e implicações clínicas das DTUs de *T. cruzi*

Vários pesquisadores já relataram que a grande diversidade genética entre as DTUs de *T. cruzi* tem profundo impacto sobre as características epidemiológicas, biológicas e clínicas da doença de Chagas (Revisado por Tibayrenc *et al.*, 2010). Assim, desde a revisão da nomenclatura dessas DTUs, vários estudos epidemiológicos têm sido realizados a fim de buscar correlações entre a diversidade genética do *T. cruzi* e as diferentes manifestações clínicas e níveis de severidade dessa doença (Zingales *et al.*, 2012).

Dentre os achados epidemiológicos (Macedo & Segatto, 2010; Zingales, 2011; 2012 e Brenière *et al.*, 2016), merecem destaque algumas das principais propriedades de cada uma das DTUs (Figura 2.2).

Figura 2.2 - Distribuição epidemiológica das seis principais DTUs de *T. cruzi*.



Nota. (A) Distribuição geográfica das DTUs de *T. cruzi* nos ciclos doméstico e silvestre. **Legenda:** Em vermelho ciclo doméstico e em azul ciclo silvestre (B) Distribuição das DTUs de *T. cruzi* por países das Américas. Prevalência das formas cardíaca e assintomática nos países ao Norte da linha vermelha pontilhada e das formas cardíaca, digestiva e assintomática, ao Sul. **Legenda:** Em azul as DTUs prevalentes e com asterisco (*) as de baixa frequência no país. **Fonte:** (A) Adaptado de Zingales, 2012; (B) Modificado de Brenière *et al.*, 2016.

TcI tem uma ampla distribuição geográfica, indo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e Chile. É mais frequentemente encontrada no ciclo silvestre, no entanto, também é um dos principais agentes da infecção humana em países endêmicos localizados ao norte da bacia amazônica. Pode estar associada a forma cardíaca em alguns países.

TcII, V e VI estão mais associadas ao ciclo doméstico e aos pacientes com doença de Chagas crônica sintomática nos países do Cone Sul e na Bolívia. Das quais, TcII e VI seriam as mais patogênicas, promovendo a maior parte das manifestações cardíacas e

digestivas, TcV, por sua vez, parece estar mais associada ao aumento do risco para a transmissão vertical, sendo a frequência de infecção congênita cerca de 4% em áreas onde predomina o TcV, e de menos de 1% em áreas de circulação de TcII (Valadares, 2007).

TcIII e IV são encontradas principalmente na floresta tropical, associadas ao ciclo silvestre, mas há relatos de infecções humanas com TcIII no Brasil, e o encontro de infecções humanas por TcIV tem sido crescente na Venezuela.

Tcbat foi previamente identificada em morcegos, porém mais recentemente tem sido encontrada em seres humanos. Essas cepas do parasito que já foram encontradas na Colômbia, Equador e Brasil, são geneticamente mais relacionadas à TcI, mas ainda resta definir se constitui ou não uma nova DTU.

É importante acrescentar que já está bem demonstrado que *T. cruzi* de diferentes DTUs podem coexistir em um mesmo hospedeiro (vertebrado ou invertebrado), incluindo o homem (Brenière *et al.*, 1998; Vago *et al.*, 2000; Bosseno *et al.*, 2000; Devillers *et al.*, 2008; Abolis *et al.*, 2011). Assim como também vem sendo elucidada a interferência das variações no perfil genético do parasito na distribuição preferencial de populações de *T. cruzi* nos diferentes tecidos do hospedeiro, seja ele humano ou animal experimental (Andrade *et al.*, 1999; 2002; Vago *et al.* 2000).

2.4. Justificativa e objetivos

Como abordado anteriormente, os fatores que determinam o tropismo tecidual diferencial, as diferentes manifestações clínicas, e graus de severidade da doença ainda não estão completamente esclarecidos. A forma cardíaca, considerada a mais grave, ainda representa um grave problema de saúde pública na América Latina. Entretanto, ainda assim, são desconhecidas as razões que levam parte significativa dos pacientes evoluírem para tal forma da doença, enquanto outros desenvolvem a forma digestiva ou permanecem assintomáticos durante toda a vida.

Também é incógnito o motivo pelo qual alguns pacientes chagásicos cardiopatas submetidos ao transplante cardíaco apresentam reativação da doença após o transplante enquanto outros não o fazem. Logo, investigar se há padrões genéticos recorrentes entre os parasitos associados à forma cardíaca da doença e, em especial, à forma grave da cardiopatia chagásica e aos processos de reativação da doença, poderia permitir o estabelecimento de prognóstico e identificação precoce de pacientes sob risco de reativação da doença.

Neste contexto, nosso objetivo tem sido aplicar sensíveis estratégias moleculares para caracterizar as DTUs de *T. cruzi* em amostras obtidas de pacientes chagásicos crônicos submetidos ao transplante cardíaco, a fim de responder algumas questões que ainda persistem sobre a associação entre a genética do parasito e de seu hospedeiro, e a epidemiologia molecular da doença. Assim, para esta parte do plano de trabalho, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- I. Avaliar se o sistema de PCR envolvendo diferentes marcadores polimórficos (COII, miniéxon, rDNA24S α) é capaz de revelar as DTUs de *T. cruzi* presentes tanto em amostras frescas quanto amostras fixadas e parafinadas oriundas de pacientes chagásicos crônicos.
- II. Genotipar, utilizando o sistema proposto acima, o parasito presente em biópsias (endomiocárdicas, de pele e sistema nervoso central) e identificar se há DTUs mais associadas à reativação chagásica e suas diferentes formas de manifestações clínicas.
- III. Avaliar, utilizando técnicas moleculares de análises de polimorfismos de microssatélites se populações do parasito presentes em corações explantados e transplantados de mesmo paciente são iguais.

2.5. Material e métodos

2.5.1. Pacientes e amostras

Conforme já abordado no primeiro capítulo deste trabalho, no período de 2008 a 2018, foi realizado o diagnóstico molecular para a presença de *T. cruzi* em 991 BEMs derivadas do monitoramento de 98 pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica que foram submetidos a transplante cardíaco no HC-UFG. Esse diagnóstico foi realizado utilizando duas metodologias complementares: PCR para a região variável do minicírculo do kDNA e para o gene do RNA 24S α . Todas as 205 BEMs (sendo 153 amostras frescas e 52 amostras fixadas e parafinadas) que apresentaram resultado positivo para pelo menos uma das PCRs utilizadas para o diagnóstico foram incluídas nesta segunda parte do projeto para a caracterização do *T. cruzi* presente nas amostras. Adicionalmente, foram também analisadas as oito biópsias de pele e três biópsias do SNC positivas para presença de DNA do parasito.

2.5.2. Métodos utilizados para a caracterização das subpopulações de *T. cruzi*

Nesta etapa do trabalho foram utilizadas duas abordagens para a caracterização das DTUs de *T. cruzi* presentes nas amostras biológicas em que houve resultado positivo

para a reação de amplificação do kDNA e/ou rDNA 24S α . Inicialmente foi utilizado o triplo ensaio sequencial, inicialmente proposto por D'Avila *et al.* (2009). Esta metodologia é baseada na caracterização de polimorfismos em três marcadores: o gene COII (que codifica a subunidade II da citocromo oxidase mitocondrial) (Freitas *et al.*, 2006), o espaçador intergênico dos genes de miniéxon (Burgos *et al.*, 2007) e o gene rDNA 24S α (Souto *et al.*, 1996), como descrito anteriormente e resumido na Figura 2.1. Posteriormente, também foi conduzida a análise de polimorfismos dos microssatélites para refinar a epidemiologia molecular do *T. cruzi* em pacientes chagásicos.

2.5.2.1. PCR-RFLP do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II

Para amplificação do gene mitocondrial COII diretamente dos tecidos dos pacientes, foi utilizada a estratégia de *full nested* PCR (Freitas *et al.*, 2006; Valadares *et al.*, 2008). Na primeira etapa, foram utilizados os iniciadores externos DsMit-F e DsMit-R, enquanto que para a segunda reação de amplificação foram utilizados os iniciadores internos Tcmit-10 e Tcmit-21 (Tabela 2.1). Após as duas reações de amplificação, foi realizada a digestão dos amplicons pela enzima de restrição *Alu* I (Promega), de acordo com as indicações do fabricante.

Os fragmentos gerados após a adição da enzima de restrição foram analisados em gel de poliacrilamida 6% e corado pela prata (Santos *et al.*, 1993). Os padrões utilizados para realizar a comparação dos RFLPs foram cepas e clones característicos das DTUs TcI, TcII e TcVI. Foram eles, respectivamente: o clone Col.17G2 (TcI), que apresenta fragmentos com 30, 81, 264 pb, caracterizado como haplótipo mitocondrial A; a cepa JG (TcII) que apresenta fragmentos com 81 e 212 pb, caracterizado como haplótipo mitocondrial C; e o clone CL Brener (TcVI) que apresenta fragmentos com 81 e 294 pb, caracterizado como haplótipo B, sendo este compartilhado pelas demais DTUs (Freitas *et al.*, 2006). Assim, esta etapa permite a discriminação de TcI e TcII, mas não diferencia as DTUs TcIII, IV, V e VI.

Tabela 2.1 - Sequências dos iniciadores utilizados

Técnica	Iniciador	Sequência	Referência
<i>PCR-RFLP</i> <i>COII</i>	DsMit- F	5'-TGCATTACTCCTTTCTACAG-3'	Freitas <i>et al.</i> , 2006
	DsMit- R	5'-AACTCGCTACATTGTCCATA-3'	
	Tcmit-10	5'-CCATATATTGTTGCATTATT-3'	
	Tcmit-21	5'-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3'	
<i>PCR</i> <i>rDNA 24Sa</i>	D71-F	5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3'	Souto <i>et al.</i> , 1993
	D72-R	5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'	
	D75-F	5'-CAGATCTTGGTTGGCGTAG-3'	
<i>PCR</i> <i>ITS-miniéxon</i>	TCac- F	5'-CTCCCCAGTGTGGCCTGGG-3'	Burgos <i>et al.</i> , 2007
	UTCC-R	5'-CGTACCAATATAGTACAGAAACTG-3'	
<i>Microsatélites</i>	TcTAT20ex-direto	5'-AGGCTGATCCTTGAGCAGCC-3'	Valadares <i>et al.</i> , 2008
	TcTAT20ex-reverso	5'-CGGCGGTCTTCTTTTGTCTC-3'	
	Cy5-TcTAT20-direto	5'-Cy5GATCCTTGAGCAGCCACCAA-3'	
	APUC-TcTAT20-reverso	5'-CAAATCCCAACGCAGCAGC-3'	
	TcAAAT6ex-direto	5'-ACGCACTCTCTTTGTAAACAG-3'	
	TcAAAT6ex-reverso	5'-CACATACACATTCCAATGGTT-3'	
	Cy5-TcAAAT6-direto	5'-Cy5GCCGTGTCCTAAAGAGCAAG-3'	
	APUC-TcAAAT6-reverso	5'-GGTTTTAGGGCCTTTAGGTG-3'	
	TcCAA10ex-direto	5'-GGTAAGGGCGAGTATGACTG-3'	
	TcCAA10ex-reverso	5'-TAGCCAATAAAAGTGATGCC-3'	
	Cy5-TcCAA10-direto	5'-Cy5GCACAGGGAGTCAAACCTCA-3'	
	APUC-TcCAA10-reverso	5'-TCAAATTTATCACCCGTCGA-3'	
	TcTAC15ex-direto	5'-GGATATTTGTTACTGCTGGC-3'	
	TcTAC15ex-reverso	5'-CGGACATATCCCTCTAGTCG-3'	
	Cy5-TcTAC15-direto	5'-Cy5GAATTTCCCATTTCCAAGC-3'	
	APUC-TcTAC15-reverso	5'-CGATGAGCAACAATCGCTTC-3'	
	TcATT14ex-direto	5'-TTTGCAAATGGGACAGTTAC-3'	
	TcATT14ex-reverso	5'-ACCTATTTTGCTCCTTGGTG-3'	
	Cy5-TcATT14-direto	5'-Cy5TTATGGATGGGGTGGTTTG-3'	
	APUC-TcATT14-reverso	5'-AGCAATAATCGTATTACGGC-3'	
TcGAG10ex-direto	5'-TTTCTTACTGCGAGGTGAGT-3'		
TcGAG10ex-reverso	5'-AAGTGAAGTGAAGTGGTGCC-3'		
Cy5-TcGAG10-direto	5'-Cy5TTCTCGGCTTCTATGTGTGC-3'		
PUC18-TcGAG10-reverso	5'TTCTCGGCTTCTATGTGTGCGTGCCCTCCG TTTATTCCTC-3'		

2.5.2.2. Amplificação da região intergênica dos genes miniéxon

A amplificação da região intergênica dos genes miniéxon foi realizada utilizando os iniciadores TCac e UTCC (Tabela 2.1). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, posteriormente corado por prata (Santos *et al.*, 1993).

Utilizando desta técnica foi possível diferenciar as cepas pertencentes às DTUs TcIII e TcIV das cepas pertencentes às TcI, TcII, TcV e TcVI, visto que os primeiros apresentaram um amplicon de ~200pb e os últimos de ~ 150-157 pb (Burgos *et al.*, 2007).

2.5.2.3. Amplificação da região 3' do gene rDNA 24 Sa

Para a diferenciação completa das DTUs TcIII, IV, V e VI, foi ainda realizada a amplificação da região 3' do gene rDNA 24 Sa por meio do *hemi nested* PCR, adaptado de Souto *et al.* (1996). Foram utilizados, na primeira etapa de amplificação, os iniciadores externos D75 e D72 e na segunda etapa os iniciadores internos D71 e D72 (Tabela 2.1). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata (Santos *et al.*, 1993). Os controles positivos usados foram cepas ou clones que representam as DTUs TcI (clone Col1.7G2, fragmento de 110 pb), TcII (cepa JG, fragmento de 125 pb) e o TcV (clone SO3 Cl5, fragmentos de 110 e 125 pb).

2.5.2.4. Métodos de análise dos produtos da PCR

Os produtos da amplificação, obtidos por meio das PCRs foram analisados em géis de poliacrilamida a 6%, corados pela prata (Santos *et al.*, 1993). Conforme descrito no tópico 1.8.2.4.

2.5.2.5. PCR de microssatélites diretamente em tecidos de pacientes chagásicos

Para a amplificação de microssatélites de *T. cruzi* diretamente das BEMs positivas para presença de DNA do parasito, foram realizadas duas rodadas de amplificações por *full nested* PCR para seis *loci* de microssatélites, utilizando dois sistemas de PCR multiplex. No sistema 1 foram usados os microssatélites TcTAT20, TcCAA10 e TcAAAT6 e no sistema 2 foram usados os marcadores TcTAC15, TcGAG10 e TcAAT14, desenvolvidos por Fernandes, 2017 e Moreira, 2018.

Para cada sistema, na primeira etapa foi realizada uma PCR multiplex contendo os iniciadores externos para cada um dos três marcadores (Tabela 2.1) e na segunda, uma PCR multiplex utilizando o produto da primeira amplificação como DNA molde e iniciadores localizados mais internamente em relação aos usados na primeira rodada. Além disso, na segunda rodada, um dos iniciadores (Tabela 2.1) foi marcado na extremidade 5' com fluoresceína (Fernandes, 2017 e Moreira, 2018).

Para a determinação do tamanho dos alelos dos microssatélites, após a segunda rodada de PCR, uma alíquota dos produtos fluorescentes foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante no sequenciador automático de DNA (A.L.F–

GE Healthcare). Os cromatogramas foram editados no programa *Allelelocator* e os fragmentos amplificados detectados em forma de picos. Os tamanhos dos alelos foram obtidos a partir do alinhamento da corrida com padrões fluorescentes de pesos moleculares conhecidos.

Essa parte do trabalho foi desenvolvida e realizada com colaboração do estudante de iniciação científica Wagson José de Carvalho Moreira, também integrante do laboratório de Genética e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

2.6. Resultados e discussão

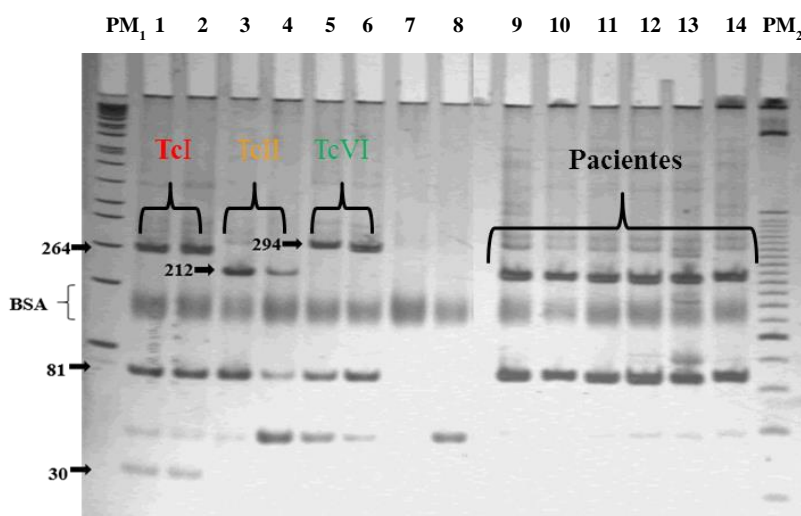
2.6.1. Caracterização das seis DTUs principais de *T. cruzi* diretamente de amostras de tecidos de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.

As 216 amostras biológicas positivas nas PCRs de diagnóstico (205 BEMs, oito biópsias de pele e três biópsias de SNC) foram submetidas ao protocolo de genotipagem das DTUs de *T. cruzi*, baseado no triplo ensaio, como proposto por D'Avila *et al.*, 2009.

Logo no primeiro ensaio realizado, os perfis de RFLP obtidos dos fragmentos amplificados para o gene COII nos permitiram verificar que a maioria das amostras apresentavam fragmentos característicos do haplótipo mitocondrial C (81 e 212 pb), que é correspondente a DTU II (Figura 2.3). Uma das amostras apresentou haplótipo B (81 e 294 pb) para este marcador, característico das DTUs III, IV, V e VI. Nesta etapa, 59 amostras não tiveram este marcador amplificado.

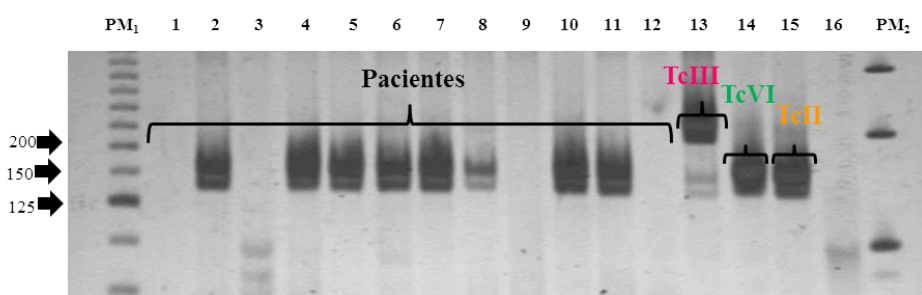
Mesmo após a reação de PCR-RFLP do gene COII ter permitido a identificação de 156 amostras como TcII (72,22%), estas, assim como as demais amostras foram submetidas às subseqüentes reações do triplo ensaio para a genotipagem. Todas as amplificações para miniéxon resultaram em fragmentos de 150 pb (Figura 2.4), característico das DTUs I, II, V e VI. Já as reações para o rDNA 24 S α apresentaram, em maioria, fragmentos de 125 pb (Figura 2.5), característico das DTUs II e VI confirmando os padrões esperados para a DTU II em grande parte das amostras. Curiosamente, em uma das BEMs que havia apresentado haplótipo mitocondrial tipo B pôde ser confirmada a presença de DTU VI (Tabela 2.2).

Figura 2.3 - Padrões típicos de RFLP gerados a partir de produtos amplificados do gene mitocondrial COII diretamente dos tecidos dos pacientes depois da digestão com *AluI*.



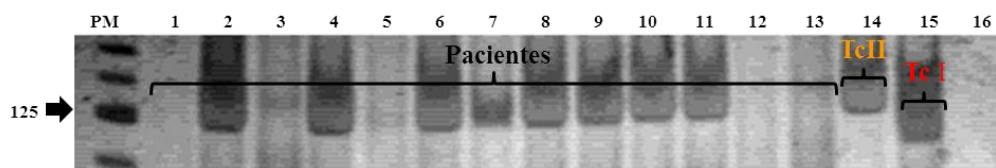
Legenda: 1-6) Controles de amplificação usando DNA representativo de três padrões de RFLP para este gene: 1-2) clone Col.17G2 (30, 81, 264 pb - haplótipo mitocondrial A); 3-4) cepa JG (81 e 212 pb - haplótipo mitocondrial C); 5-6) clone CL Brener (81 e 294pb - haplótipo mitocondrial B); 7) Branco do processo de digestão com a enzima *AluI*; 8) Branco da reação de PCR. 9- 14) Amostras de biópsias endomiocárdicas dos pacientes de 1 a 6; **PM₁**) Padrão de peso molecular (1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®); **PM₂**) padrão de peso molecular – 25 pb DNA Ladder (Invitrogen®)

Figura 2.4 - Amplificação do espaçador intergênico dos genes miniéxon de *T. cruzi* diretamente dos tecidos dos pacientes.



Legenda: **PM₁**) Padrão de peso molecular – 25 pb DNA Ladder Invitrogen®; 1-12) Amostras de biópsias endomiocárdicas dos pacientes de 1 a 12; 13-15) Controles positivos utilizando DNA representativo de TcIII, TcVI e TcII, respectivamente. 13) Cepa 231 (TcIII ~200pb); 14) clone CL Brener (TcVI ~150-157 pb); 15) cepa JG (TcII ~150-157 pb) 16) Branco da reação de PCR **PM₂**) Padrão de peso molecular (1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®).

Figura 2.5 - Amplificação do gene rDNA24Sα de *T. cruzi* diretamente dos tecidos dos pacientes.



Legenda: PM) Padrão de peso molecular – 25 pb DNA Ladder - Invitrogen®; **1-13**) Amostras de biópsias endomiocárdicas dos pacientes de 1 a 13; **14-15**) Controles positivos utilizando DNA representativo de TcII e TcI, respectivamente; **14**) cepa JG (TcII ~125 pb) **15**) clone Col.17G2 (TcI ~110 pb) **16**) Branco da reação de PCR.

Dessa forma, 184 das 216 amostras biológicas analisadas (85,2%) puderam ser amplificadas, por pelo menos uma das reações de tipagem, permitindo a identificação, ainda que parcial, da DTU da *T. cruzi* envolvida (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Identificação das DTUs de *T. cruzi* em biópsias de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados

<i>DTUs</i>	<i>Número de amostras</i>		
	<i>BEMs</i>	<i>Biópsias de pele</i>	<i>Biópsias SNC</i>
TcII	145	8	3
TcVI	1	-	-
TcII ou VI*	25	-	-
TcI, II, V ou VI*	2	-	-
Não identificado**	32	-	-
Total	205	8	3

Legenda: *As DTUs dessas amostras não puderam ser completamente identificadas por não ter sido amplificado um dos três marcadores utilizados. ** As DTUs não puderam ser identificadas por não ter sido amplificado nenhum dos três marcadores utilizados no triplo ensaio

Devido aos diferentes níveis de sensibilidades das PCRs utilizadas para realização do diagnóstico molecular e para os ensaios sequenciais necessários para realização da genotipagem, nem todas as amostras positivas para *T. cruzi* puderam ter as DTUs identificadas integralmente. Isto se deve, pelo menos em parte, ao número de cópias da sequência alvo dos três ensaios.

Os minicírculos do kDNA estão presentes em múltiplas cópias, de 5.000 a 20.000, em cada célula do parasito; já os alvos do triplo ensaio ou estão presentes no maxicírculos, como o gene do COII, cujo número de cópias por célula varia de 20 a 50, ou são genes nucleares (rDNA 24 Sα e miniéxon), possuindo cerca de 100 a 200 cópias no genoma

(Simpson, 1987; Agabian, 1990). Logo, a PCR pode ser mais sensível para o método do kDNA PCR quando comparada aos outros marcadores.

De fato, 32 das 216 amostras (14,8%) que deram resultado positivo para o diagnóstico molecular não puderam ser caracterizadas por meio do triplo ensaio. Dessas, 27 são amostras mais antigas extraídas a partir de blocos de parafina, o que pode ter contribuído para a diminuição da sensibilidade das reações de genotipagem.

Embora o estabelecimento de técnicas de extração de DNA a partir de tecido parafinado traga grandes contribuições para a obtenção de dados epidemiológicos sobre várias doenças utilizando amostras antigas de banco de dados, a fixação do tecido com formol não tamponado pode resultar em *crosslinking* do DNA, e dependendo da idade da fixação e do fixador utilizado, prejudicar a sua amplificação por PCR (Fernandes *et al.*, 2004).

Em 25 amostras (11,6%) foi feita a identificação parcial entre as DTUs TcII ou TcVI. Nesses casos, houve falha na amplificação nas duas primeiras etapas da genotipagem. Já nos casos identificados entre TcI, II, V ou VI (0,9%), apenas a etapa de amplificação do espaçador intergênico dos genes miniéxon de *T. cruzi* foi bem sucedida.

Como já abordado, a heterogeneidade do *T. cruzi* vem sendo investigada desde a sua descoberta em 1909, quando Carlos Chagas já descreveu a diversidade morfológica do parasito. De lá para cá, são várias as tentativas de se correlacionar variações nas formas clínicas da doença de Chagas, na susceptibilidade do parasito aos quimioterápicos anti-*T. cruzi*, no tropismo tecidual e na resposta dos pacientes à infecção, principalmente quando se trata de pacientes de regiões endêmicas diferentes (Luquetti *et al.*, 1986; WHO, 2007). Os fatores que determinam essas variações ainda não estão completamente esclarecidos.

Certamente, fatores associados ao paciente estão envolvidos, mas é curioso que o peso atribuído à participação de aspectos genéticos relacionados ao parasito varia ao longo da história da doença de Chagas (Miles *et al.*, 1977; Macedo & Pena *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2003; Macedo *et al.*, 2004).

A favor da participação relevante de aspectos associados ao parasito, já se sabe que as cepas de *T. cruzi* são compostas por uma população heterogênea de clones com ampla variabilidade biológica e genética circulando em ciclos de transmissão doméstico e silvestre. E que estes clones podem se distribuir nos diferentes órgãos do paciente. Existe um modelo de evolução clonal que prevê uma correlação entre a divergência filogenética de *T. cruzi* e suas propriedades biológicas, incluindo a sensibilidade aos

fármacos, dessa forma, determinada população pode ser considerada susceptível ou resistente a determinado medicamento (Toledo *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2010).

É razoavelmente bem estabelecido que existe uma distribuição diferente das DTUs de *T. cruzi* entre as Américas. Na América do Norte, além das que são consideradas principais nessa região — TcI e TcIV — os últimos estudos também identificaram TcII, TcIII e TcV. Na América Central há relatos apenas da identificação de TcI e TcIV, enquanto que todas as DTUs já foram identificadas na América do Sul, com distribuição altamente variável e predominância da DTU I ao Norte, II na parte central e V e VI ao Sul (Revisado por Brenière *et al.*, 2016).

De forma global, TcI tem sido a DTU mais frequentemente identificada, seguida por TcV e TcII. TcI tem sido identificada com maior porcentagem na América Central (93,3%) e na América do Norte (79,5%). Por outro lado, as DTUs II e V apresentam maior número de casos na América do Sul, sendo que a proporção mais elevada de TcV tem sido na Bolívia, Paraguai e Argentina e de TcII no Brasil, Chile e Suriname (Revisado por Brenière *et al.*, 2016).

Além disso, estudos indicam que as infecções humanas ocorrendo nos países do Cone Sul da América Latina são quase que exclusivamente devido a TcII e são responsáveis, principalmente, pelas causas mais graves da doença: a forma cardíaca e a digestiva, esta última essencialmente associada a essa DTU (Zingales, *et al.*, 2011). Neste trabalho, também pudemos notar que das 184 amostras que tiveram a identificação, ainda que parcial, das DTUs de *T. cruzi*, 156 amostras (84,8%) foram genotipadas como DTU II, incluindo amostras de miocárdio, pele e SNC. Este resultado corrobora a ideia de que esta é a principal DTU associada com a forma cardíaca da doença de Chagas e com a reativação da infecção pós-transplante, pelo menos nesta região geográfica.

Outro resultado interessante foi a presença de um isolado pertencente à TcVI em nosso estudo, confirmando a associação dessa DTU como uma das causadoras da doença de Chagas. Há algum tempo TcV e TcVI vêm sendo envolvidas em casos de infecções humanas na região do Gran Chaco e países vizinhos, como Bolívia, Chile, Argentina e Brasil (Diosque *et al.*, 2003; Cardinal *et al.*, 2008). Em 2010, Burgos *et al.* também identificaram essas DTUs analisando corações explantados de pacientes argentinos com cardiopatia chagásica crônica, além de surpreendentemente, encontrar TcI em um dos pacientes.

2.6.2. Análise de polimorfismos de microssatélites

Para avaliar se as populações do parasito presentes em corações explantados e transplantados do mesmo paciente eram iguais, além da tipagem das DTUs foi utilizada a metodologia baseada em dois sistemas de *full nested* PCR multiplex envolvendo seis *loci* de microssatélites. Foram analisadas 20 amostras biológicas oriundas de fragmentos de 10 corações explantados (retirado cirurgicamente) e 10 corações transplantados (representado pela BEM pós-transplante).

Inicialmente, foi realizada a genotipagem, baseada no triplo ensaio já descrito, para a comparação das DTUs identificadas no coração explantado e transplantado do mesmo paciente.

Curiosamente, os resultados revelaram que o paciente que apresentou TcVI na BEM do coração transplantado teve a identificação de TcI na amostra do coração explantado (Tabela 2.3). Indicando que as linhagens do parasito podem variar durante os episódios de reativação e que outras DTUs também podem estar associadas à cardiopatia chagásica no Sudeste brasileiro. Além disso, esse é um achado incomum no Brasil, visto que TcI tem predominância no ciclo silvestre da Amazônia brasileira (Coura *et al.*, 2002) e existem poucos casos que relacionem essa DTU com a forma cardíaca da doença de Chagas no país (Teixeira *et al.*, 2006).

Já para os outros nove casos em que também foi feita essa comparação das DTUs identificadas no coração explantado e transplantado do mesmo paciente, houve identificação apenas de TcII em ambos os corações (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Genotipagem das DTUs de *T. cruzi* presentes em amostras de corações explantados e transplantados de pacientes cardiopatas chagásicos

<i>Pacientes</i>	<i>DTU- Coração explantado</i>	<i>DTU - Coração transplantado</i>
1	TcII	n.a
2	TcII	TcI, TcII, TcV ou TcVI
3	TcI	TcVI
4	TcII	TcII
5	TcII	TcII
6	TcII	TcII
7	TcII	TcII
8	TcII	TcII
9	n.a	TcII
10	TcII ou TcVI	TcII

Notas. Legenda: n.a: não amplificou.

Na segunda etapa foi realizada a análise do perfil de microssatélites (seis *loci*) para essas mesmas amostras. Por meio desta técnica foi observado que em todos os casos a reinfecção, detectada no coração transplantado, foi realizada por populações de *T. cruzi* diferentes daquelas envolvidas na cardiopatia por ocasião do transplante (Tabela 2.4).

Esses resultados revelam alguns achados intrigantes. Primeiramente eles demonstram a variabilidade genética do parasito, já amplamente relatada dentro da mesma DTU e presente em um mesmo paciente. Segundo, apesar do paciente abrigar misturas de populações de *T. cruzi*, todas as amostras analisadas apresentaram um ou dois fragmentos amplificados para os seis *loci* de microssatélites, indicando homo ou heterozigose para o respectivo *locus*. Isso sugere a presença de populações monoclonais do parasito nestas amostras, pelo menos dentro do limite de sensibilidade da técnica utilizada.

Tabela 2.4 - Tamanho dos alelos em pares de bases obtidos para os seis marcadores de microssatélites analisados obtidos de corações explantados e transplantados

Pacientes	<i>Loci</i>					
	TcCAA10	TcTAT20	TcAAAT6	TcGAG10	TcATT14	TcTAT15
E1	152/155	214/217	263/263	155/161	n.a	n.a
T1	143/155	196/208	271/271	161/164	262/262	99/99
E2	143/143	181/193	n.a	161/161	n.a	99/99
T2	146/149	190/193	271/275	161/164	265/265	99/99
E3	149/158	193/214	255/255	152/161	n.a	96/96
T3	143/146	181/190	255/255	149/161	262/262	99/99
E4	155/158	199/214	251/255	152/155	262/262	99/99
T4	155/155	n.a	271/275	149/149	265/265	99/99
E5	143/158	193/196	271/271	149/161	262/262	99/99
T5	152/155	199/199	263/271	161/161	n.a	99/99
E6	155/158	n.a	271/271	149/149	262/262	99/99
T6	152/155	193/199	263/271	158/161	262/262	99/99
E7	158/155	199/217	275/275	152/155	265/265	99/99
T7	143/155	193/196	271/271	155/161	262/262	99/99
E8	155/158	199/214	279/279	152/155	n.a	99/99
T8	143/143	n.a	275/275	158/161	265/265	99/99
E9	149/152	196/196	251/271	155/158	265/265	99/99
T9	143/155	n.a	n.a	149/161	262/265	99/99
E10	155/155	190/193	271/275	155/158	265/265	99/99
T10	152/155	190/193	271/275	161/164	265/265	99/99
Controles						
JG	143/146	190/193	271/275	161/164	265/265	99/99
Col1.7G2	125/125	181/181	255/255	164/164	253/253	96/96
CL Brener	131/155	181/223	263/263	164/164	265/271	129/141

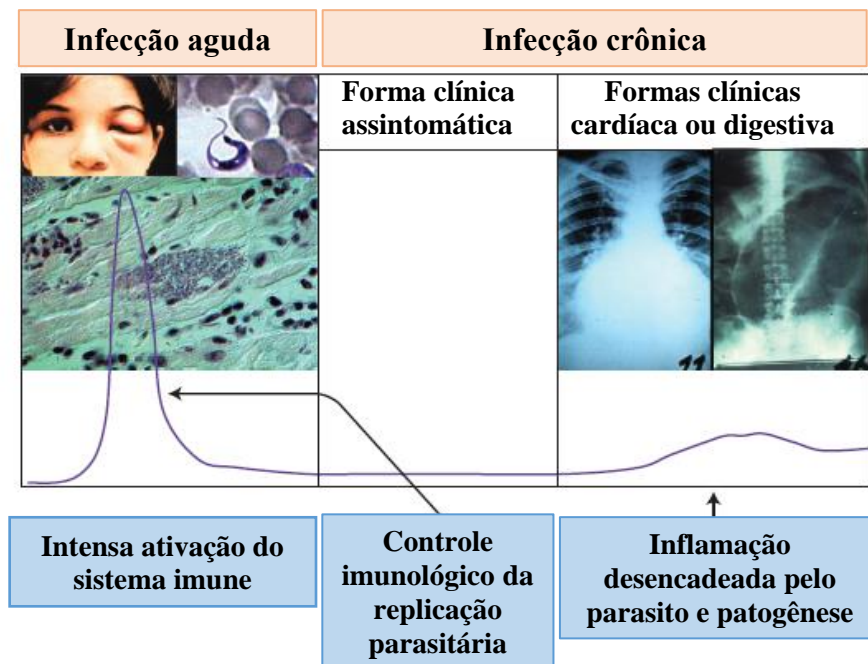
Notas. Legenda: E: Coração explantado; T: coração transplantado; n.a: não amplificou.

CAPÍTULO 3- Genotipagem e estudo dos polimorfismos genético do hospedeiro associados à evolução da cardiomiopatia chagásica

3.1. Aspectos gerais da resposta imune na doença de Chagas

O controle da infecção por *T. cruzi* requer intensa ativação do sistema imune no transcorrer da fase aguda da doença de Chagas, levando à diminuição de parasitemia e parasitismo tecidual, os quais são mantidos baixos durante a fase crônica da infecção por meio do envolvimento tanto da imunidade inata quanto da imunidade adquirida (Figura 3.1) (Junqueira *et al.*, 2010)

Figura 3.1 - Curso da infecção pelo *T. cruzi* e o desenvolvimento da doença de Chagas em humanos

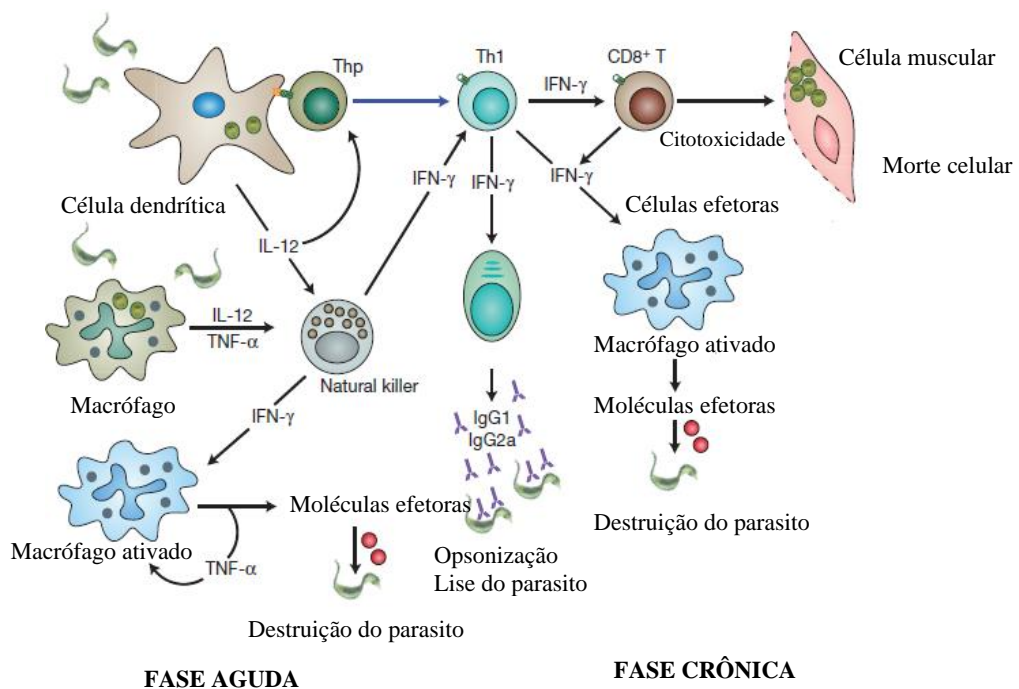


Nota. A fase aguda é associada a uma alta parasitemia, parasitismo tecidual e grande ativação do sistema imune. As imagens mostram uma criança com sinal de Romaña, uma forma tripomastigota no sangue circulante e um ninho de amastigota no tecido cardíaco. Durante a fase crônica, a parasitemia e o parasitismo tecidual são baixos, com muitos pacientes assintomáticos. No entanto, 20- 30% dos pacientes chagásicos crônicos podem apresentar sintomatologia, que são associadas à intensa inflamação local e escasso parasitismo nos tecidos afetados. As imagens mostram cardiomegalia e megacólon em pacientes cardíacos crônicos. A curva em roxo indica a mudança na parasitemia e no parasitismo tecidual durante o curso da infecção pelo *T. cruzi*.
Fonte: Junqueira *et al.*, 2010.

O sistema imune inato tem papel importante na fase aguda da doença de Chagas, atuando tanto no controle da replicação do parasito e na propagação da infecção para tecidos do hospedeiro, quanto no processo inflamatório nos locais de infecção (Brenner & Gazzinelli, 1997; Golgher & Gazzinelli, 2004, Junqueira *et al.*, 2010). Por outro lado, na resposta imune adaptativa, a ativação das células B leva à produção de níveis substanciais de anticorpos e à ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+, o que também é essencial para diminuir a parasitemia na fase aguda e para o controle da infecção da fase crônica (Gutierrez *et al.*, 2009; Junqueira *et al.*, 2010).

O recrutamento de leucócitos para o tecido infectado inicia-se logo após de estabelecido o parasitismo e é dependente da produção local de citocinas, quimiocinas e da expressão de seus receptores, tendo grande importância para a redução da carga parasitária por *T. cruzi* (Gutierrez *et al.*, 2009). Assim, a produção das citocinas pró-inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ), interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) conferem proteção ao hospedeiro contra a infecção, quando produzidas em níveis adequados. A IL-12 induz a síntese de IFN- γ por diversas células, incluindo as *Natural Killer* (NK) e linfócitos T CD4+ e CD8+. Por sua vez, IFN- γ ativa células fagocitárias, que destroem o parasito internalizado por meio do aumento da produção de reativos de nitrogênio e oxigênio (moléculas efetoras), além de induzir a atividade citotóxica de linfócitos T CD8+, que destroem as células infectadas (Figura 3.2) (Gazzinelli *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1995).

Figura 3.2 - Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo *T. cruzi*.



Nota. As células do sistema imune inato (macrófagos, células NK e dendríticas) produzem citocinas (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e moléculas efetoras (reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio), que controlam a replicação do *T. cruzi*. Ao mesmo tempo, células do sistema imune inato, particularmente, células dendríticas, fazem uma ponte entre a imunidade inata e adquirida, produzindo citocinas (IL-12) necessárias para a diferenciação e expansão clonal de células T auxiliar 1 (Th1) CD4+, assim como células T CD8+ e células B. IFN- γ produzido por células Th1 CD4+ ou células T CD8+, ativam mecanismos efetores em macrófagos, que destroem formas amastigotas e tripomastigotas fagocitadas, enquanto a atividade citotóxica realizada pelas células T CD8+ destroem células com amastigotas internalizadas. **Fonte:** Junqueira *et al.*, 2010.

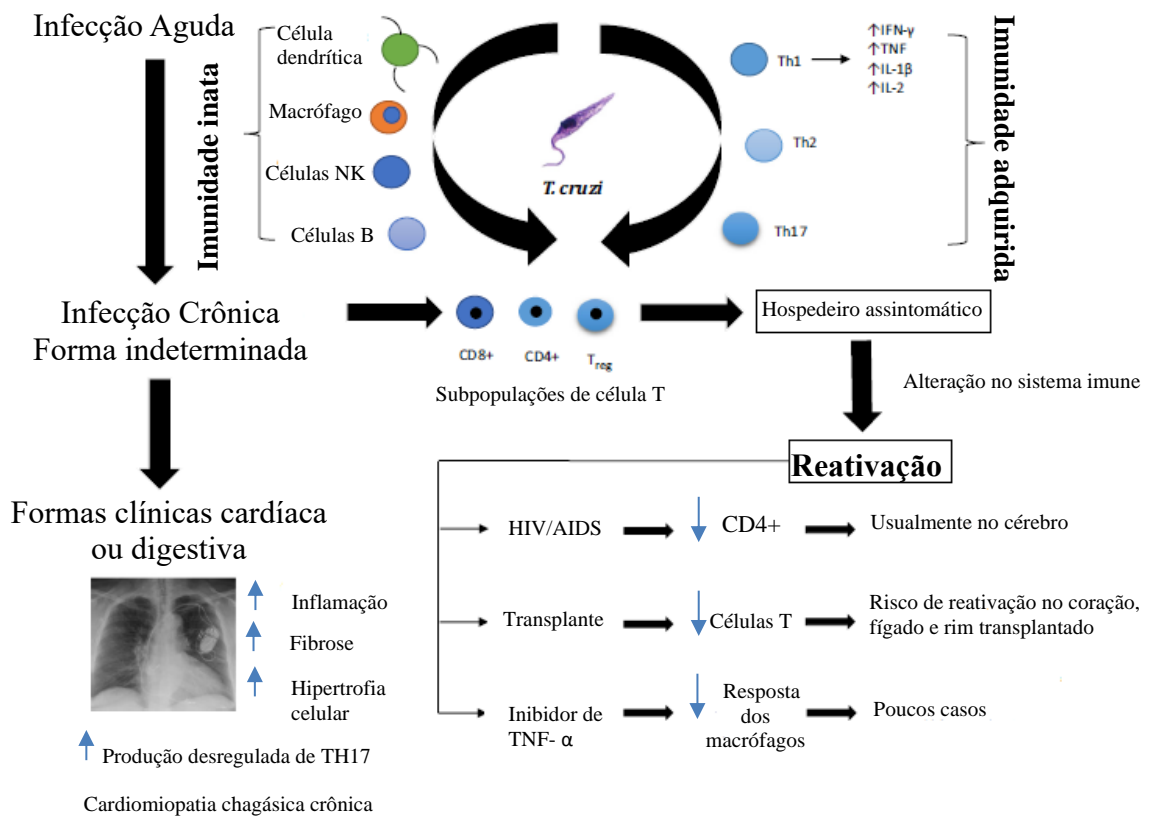
Embora essencial para o controle do parasitismo, a acentuada expressão das citocinas pró-inflamatórias e excessiva migração de leucócitos para o tecido pode contribuir para lesões no órgão-alvo, como é observado em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos (Gutierrez *et al.*, 2009; Cunha-neto *et al.*, 2009). Nesse cenário, a produção de citocinas anti-inflamatórias podem minimizar alguns dos efeitos indesejáveis. Citocinas anti-inflamatórias como interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento β (TGF- β) têm sido associadas à suscetibilidade à infecção por *T. cruzi*, pela inibição dos efeitos do IFN- γ e de macrófagos ativados (Silva *et al.*, 1992). Por outro lado, essas citocinas são necessárias para a modulação da resposta imune e prevenção do aumento do processo inflamatório e lesões teciduais quando há produção exacerbada de IL-12 e IFN- γ . Dessa forma, estudos sugerem que o balanço entre as citocinas pró- inflamatórias, e anti-inflamatórias determinam o destino da infecção e progressão da doença de Chagas (Vitelli-Avelar *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2011)

Já há razoável consenso de que as manifestações patológicas da fase crônica, tanto na forma cardíaca, quanto na forma digestiva, estão associadas à ocorrência de uma reação pro-inflamatória exacerbada nos órgãos afetados, enquanto a forma indeterminada representa uma situação de equilíbrio entre o parasito e o hospedeiro, e a resposta imune induzida por estes indivíduos é de caráter predominante anti-inflamatório (Gomes *et al.*, 2005; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008; Dutra *et al.*, 2009).

No que concerne à reatutização da doença de Chagas, ela pode ocorrer em pacientes não transplantados imunocomprometidos, como no caso de pacientes chagásicos com HIV/AIDS (Gomez *et al.*, 2018), naqueles que recebem inibidores do TNF- α (Vacas *et al.*, 2017) ou quimioterapia (Kohl *et al.*, 1982), e naqueles que recebem terapia imunossupressora, como no tratamento de lúpus eritematoso sistêmico ou artrite reumatóide (Burgos *et al.*, 2012, Cossermelli *et al.*, 1972), como também pode ocorrer em pacientes transplantados, conforme já relatado nesse trabalho (Figura 3.3). Nos casos de coinfeção com HIV, a reativação chagásica neurológica é a mais relatada (Del Castillo *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 1997, Gluckstein *et al.*, 1992) e o risco de reativação é considerado proporcional à queda da contagem do número de linfócitos CD4+ (Sartori *et al.*, 2007). No caso de transplantes, os imunossupressores, que são essenciais no período pós-cirúrgico para controlar a rejeição do órgão transplantado, tornam os pacientes mais susceptíveis à reativação, em consequência da diminuição da ativação e proliferação de células T.

O risco de reativação da doença de Chagas em pacientes transplantados imunossuprimidos varia de acordo com o órgão transplantado e o grau de imunossupressão. Em média acomete de 20 a 50% dos pacientes receptores de coração (Bestetti *et al.*, 2009), de 8 a 37% dos pacientes receptores de rim (Riarte *et al.*, 1999), cerca de 19% dos receptores de fígado (Schiavelli *et al.*, 2006) e cerca de 27% dos pacientes submetidos a transplante de medula óssea (Altclas *et al.*, 2005; Guiang *et al.*, 2013).

Figura 3.3 - Resumo da imunopatogênese da infecção por *T. cruzi* e alterações da resposta imune causando reativação da doença.



Fonte: Adaptado de Smith *et al.*, 2019

3.2. Polimorfismos genéticos e seus possíveis envolvimento na cardiomiopatia chagásica crônica

Embora apresente alguma variação de acordo com a distribuição geográfica (Brenière *et al.*, 2016), em média 30% dos pacientes evoluem, ao longo da vida, para a forma cardíaca, a forma mais grave da doença de Chagas. Considerando que essa

progressão do quadro clínico é multifatorial e depende tanto de fatores associados à heterogeneidade genética do parasito quanto aos fatores ligados ao hospedeiro, pesquisas estão sendo direcionadas para a identificação de biomarcadores que possam mostrar a suscetibilidade para o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica (Cruz *et al.*, 2015).

Estudos sobre os polimorfismos genéticos humanos, que são mutações genéticas não letais presentes em pelo menos 1% da população, têm sido realizados a fim de se entender a variabilidade individual na evolução clínica e na resposta terapêutica entre pacientes acometidos pela mesma doença e submetidos ao mesmo tratamento (Tardin *et al.*, 2009). Parte dessas variações no genoma é atribuída ao polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em um *locus* gênico específico, e geralmente o seu efeito está mais envolvido na alteração de suscetibilidade à doença do que na causa direta da enfermidade (Thompson & Thompson, 2016). Além disso, os SNPs são comumente associados à diversidade populacional, de modo que alelos raros em uma determinada população podem ser abundantes em outras (Kubistova *et al.*, 2009).

Até o momento, a maioria dos polimorfismos identificados em genes de citocinas e seus receptores foram localizados nas regiões não transcritas dos genes (Keen, 2002), o que pode afetar a expressão do mesmo, inibindo ou estimulando a transcrição do gene, dependendo dos elementos regulatórios e do nível de regulação envolvido (Keen, 2002; Hopkins, 2003).

Devido à relevância do envolvimento do sistema imunológico do hospedeiro na patogênese da cardiomiopatia chagásica, os polimorfismos dos genes envolvidos na resposta imune e inflamatória associados à esta parasitose têm sido um crescente alvo de estudo. Assim, algumas importantes citocinas envolvidas no processo inflamatório desencadeado pelo *T. cruzi* já tiveram seus polimorfismos estudados em pacientes chagásicos como, por exemplo, os genes para IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α e IFN- γ . Dessas citocinas, o polimorfismo do gene IL-12 mostrou associação com a doença de Chagas cardíaca em pacientes colombianos (Zafra *et al.*, 2007) e o polimorfismo de IL-18 parece estar associado à gravidade da cardiomiopatia — moderada ou severa — em pacientes chagásicos brasileiros (Nogueira *et al.*, 2015).

Em contraste, o polimorfismo genético IL-6 (-174G/C) não apresentou associação com a cardiopatia chagásica em pacientes colombianos e peruanos (Torres *et al.*, 2010a). Já o polimorfismo genético IFN- γ (+874T/A) não parece influenciar a progressão da doença para a forma cardíaca entre pacientes chagásicos assintomáticos na população

colombiana, mas pode estar relacionado com a susceptibilidade a doença (Torres *et al.*, 2010b).

Já em relação a IL-10, IL-4 e TNF- α os resultados mostraram-se contraditórios, possivelmente devido à variabilidade étnica. Costa *et al.* (2009) demonstraram que o alelo polimórfico A, que se correlaciona com menor expressão de IL-10, foi associado ao desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica em pacientes brasileiros. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas no genótipo e na frequência dos alelos polimórficos dos genes IL-4 e IL-10 entre pacientes colombianos sintomáticos e assintomáticos (Flórez *et al.*, 2011).

Em relação ao TNF- α , também há controvérsias nos resultados obtidos em diferentes populações. Por exemplo, não foi verificada associação entre polimorfismos do gene TNF- α e a cardiomiopatia chagásica em pacientes peruanos e brasileiros (Beraún *et al.*, 1998; Drigo *et al.*, 2007), mas esta correlação foi observada por Criado *et al.* (2012) em pacientes chagásicos colombianos.

Além disso, já foram observadas associações entre o polimorfismo dos genes que codificam as citocinas IL-1 α , IL-1 β em diversas doenças inflamatórias, como colite ulcerativa, retinocoroidite e periodontite (Moreira *et al.* 2007; Komatsu *et al.*, 2008; Cordeiro *et al.*, 2008). No entanto, ainda existem poucos estudos direcionados para efeitos dos polimorfismos desses genes em relação à cardiomiopatia chagásica, e os que existem têm apresentado resultados contraditórios (Flórez *et al.*, 2006, Cruz-Robles *et al.*, 2009).

Também há importantes estudos demonstrando o papel dos polimorfismos dos genes IL-17A e IL-17F em doenças inflamatórias como colite ulcerativa e doença inflamatória intestinal (Arisawa *et al.*, 2008; Seiderer *et al.*, 2008). Recentemente, os resultados obtidos por Reis *et al.* (2017) sugeriram um possível envolvimento dos polimorfismos de IL17A (-197 A/G) e IL17F (+7488 T/C) na suscetibilidade à doença de Chagas crônica e no desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia chagásica em pacientes do Brasil.

Resumindo, muitos estudos de correlação de polimorfismos genéticos humanos com a susceptibilidade e progressão da doença de Chagas têm sido realizados, porém muitas vezes os resultados são contraditórios, justificando a necessidade de ampliação desses estudos em diferentes populações.

3.3. Polimorfismos genéticos e seus possíveis envolvimento na rejeição do transplante

Apesar do grande conhecimento acumulado na área do transplante, ainda são obscuros os motivos pelos quais alguns pacientes, mas não outros, com históricos clínicos similares, desenvolvem rejeição crônica após transplante. Tomando em consideração a natureza inflamatória da rejeição, diferentes pesquisadores têm se perguntado sobre a contribuição de polimorfismos genéticos de citocinas nos desfechos de enxertos de órgãos sólidos, visto que as citocinas desempenham um papel importante na resposta inflamatória e na modulação da resposta imune alogênica pós-transplante (Coelho *et al.*, 2011).

Nesse sentido, para receptores de enxerto cardíaco já foi observado que o genótipo alto produtor de IL-10 parece ter um papel efetivo na proteção contra rejeição aguda (Hutchinson *et al.*, 1998, McDaniel *et al.*, 2004), assim como a combinação dos genótipos alto produtor de TNF- α /baixo produtor de IL-10 parece associado com a maior frequência de episódios de rejeição (Turner *et al.*, 1997a).

Por outro lado, Plaza *et al.*, (2003) não encontraram associação entre os polimorfismos para o gene IL-10 e a frequência e gravidade dos episódios de rejeição aguda e crônica. Todavia, esses mesmos autores detectaram que a frequência gênica do alelo associado à diminuição da produção de IL-10 foi aumentada em pacientes com efeito Quilty, que se manifesta por um infiltrado de agregado mononuclear, constituído predominantemente de linfócitos T, linfócitos B, histiócitos, plasmócitos e vasos observados em BEMs de pacientes submetidos a transplante cardíaco (Lima, 2002).

Em receptores de enxertos renais, quando avaliado o impacto dos polimorfismos em genes de citocinas no par doador/receptor sobre os resultados pós-transplante, foi evidenciado que a presença do genótipo TT (códon 10 C/T), associado à alta produção de TGF- β teve efeito protetor quando presente nos receptores, enquanto esteve relacionada a um maior risco de rejeição quando presente nos doadores. Por outro lado, a maior frequência do alelo T (3'UTR5644 A/T), associado à alta produção de IFN- γ , demonstrou efeito protetor quando associado ao grupo de doadores, mas aumentou o risco de nefropatia crônica do aloenxerto, quando presente nos receptores, ressaltando a importância da genotipagem de TGF- β e IFN- γ também nos doadores (Coelho *et al.*, 2011).

3.4. Interleucinas

3.4.1. IL-1

A família da interleucina-1 (IL-1) é constituída de 11 membros, sendo que alguns deles possuem propriedades inflamatórias, tais como a IL-1 α e IL-1 β , enquanto outros são supressores da inflamação, como a IL-1ra, que é um antagonista do receptor da IL-1 (Dinarello, 2009). A principal função das citocinas da família IL-1 é participar de reações pró-inflamatórias, sendo importante mediador na resposta imune contra invasão bacteriana, inflamação, infecções e lesões teciduais (Weber *et al.*, 2010).

As citocinas IL-1 α e IL-1 β são produzidas principalmente por monócitos e macrófagos, embora também sejam produzidas por outros tipos celulares, como células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, neutrófilos, linfócitos, células dendríticas, hepatócitos e células musculares (Vicenová *et al.*, 2009), em diversas condições inflamatórias, tais como infecções, artrite reumatóide, doenças inflamatórias gastrointestinais e patologias cardiovasculares (Arend, 2002).

Existem alguns aspectos biológicos que diferem essas duas citocinas: enquanto IL-1 α é secretada por queratinócitos e está ligada à membrana, IL-1 β é secretada para o meio extracelular por macrófagos e monócitos (Dinarello, 1996). A IL-1 α , que é encontrada na célula na forma biologicamente ativa, sinaliza por meio de mecanismos parácrinos, sendo importante estimuladora do IFN- γ . A IL-1 β é sintetizada como uma proteína precursora (Pro-IL-1 β) que não é secretada na forma ativa até ser metabolizada pela enzima caspase-1, além de poder atuar de forma parácrina ou sistêmica (Weber *et al.*, 2010).

3.4.2. IL-6

A interleucina-6 (IL-6) é produzida por diferentes células e tecidos, sendo os macrófagos e os monócitos as principais fontes em casos de infecção. No entanto, em situações não inflamatórias, ela é secretada por adipócitos, em especial pelo tecido adiposo visceral (Rexrode *et al.*, 2003; Fantuzzi *et al.*, 2005), e pelo tecido muscular, durante a contração muscular (Keller *et al.*, 2001; Prestes *et al.*, 2006). Comumente descrita como uma citocina pró-inflamatória, especialmente em respostas inflamatórias agudas e em algumas doenças crônicas como diabetes e obesidade, ela também tem sido relacionada a ações anti-inflamatórias após o exercício físico (Pedersen *et al.*, 2005).

Em relação à doença de Chagas, é possível que a citocina IL-6, juntamente com IL-1 β , esteja envolvida no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica. De

fato, essas interleucinas são capazes de aumentar a expressão de moléculas de adesão celular, que, juntamente com as quimiocinas, promovem a infiltração de células inflamatórias na região lesionada, resultando em inflamação crônica (Gao & Pereira, 2002; Dinarello, 2009). Merece destacar que já foi observada associação da ação da citocina IL-6 com a patogênese e progressão de doenças cardiovasculares, incluindo a progressão de danos do miocárdio em pacientes cardiopatas chagásicos (López *et al.*, 2006).

3.4.3. IL-10

A interleucina-10 (IL-10) é uma importante citocina anti-inflamatória produzida por uma variedade de células do sistema imune, incluindo linfócitos T e B, macrófagos, células NK, células dendríticas, além de variedade de outras células como mastócitos, queratinócitos, células musculares, entre outras (Couper *et al.*, 2008, Lopes *et al.*, 2010). Sua produção é regulada por outras citocinas, como a IL-4, a IL-13 e o IFN- γ , que inibem a sua produção (Chomarat *et al.*, 1993).

A citocina IL-10 possui um papel muito importante na regulação da resposta imune em diversos modelos de infecção e inflamação, devido à sua capacidade de inibir a produção de citocinas inflamatórias por linfócitos T. Altos níveis de IFN- γ e TNF- α e espécies reativas de nitrogênio e oxigênio podem ser extremamente prejudiciais ao próprio hospedeiro e a IL-10 tem um papel na regulação desses componentes do sistema imune.

Em relação à doença de Chagas, estudos *in vivo* mostraram que tanto o controle da resposta imune adquirida — específica anti *T. cruzi* —, como da resposta inata têm um papel decisivo no processo inflamatório, e que a citocina IL-10 tem um importante papel regulador destas respostas. Por exemplo, a infecção de camundongos BALB/c com clone Sylvio X10/4 (TcI) revelou que os camundongos mais resistentes à infecção — sem lesão tissular — apresentaram maior produção de IL-10 quando comparados com os animais susceptíveis (Zhang & Tarleton, 1996), propondo que a IL-10 é essencial para “desativação” da resposta imune e menor dano tecidual ao hospedeiro.

Estudos complementares também demonstram que a produção de IL-10 pode estar associada à população de *T. cruzi* infectante e à resposta imune desencadeada. Nesse sentido, a infecção de camundongos BALB/c com as estirpes JG (TcII) e /ou CL Brener (TcVI) mostrou que os animais infectados com JG apresentaram redução da parasitemia e do parasitismo cardíaco, não apresentaram mortalidade e mostraram níveis de pró-

inflamatórios (IFN- γ , TNF- α , CCL2, IL-6) similares aos apresentados pelos animais selvagens. Já os camundongos infectados com CL Brener apresentaram maior parasitemia e parasitismo cardíaco, assim como o aumento da liberação sistêmica de mediadores pró-inflamatórios e maior mortalidade. Curiosamente, a coinfeção com cepas de JG e CL Brener resultou em níveis intermediários de parasitemia, parasitismo cardíaco e mortalidade, acompanhado por um aumento na liberação de IL-10. Assim, a produção endógena de IL-10 provocada pela coinfeção, parece ser crucial para contrabalancear os efeitos letais desencadeados pela liberação sistêmica de mediadores pró-inflamatórios induzida pela infecção única por CL Brener (Rodrigues *et al.*, 2010).

Além disso, estudos diversos sugerem certo padrão predominante de citocinas inflamatórias em determinadas formas clínicas da doença de Chagas: enquanto nos pacientes com cardiomiopatia há altos níveis de IFN- γ e TNF- α , nos pacientes indeterminados há elevados níveis de IL-10 (Vitelli-Avelar *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2011).

Tomados em conjunto, esses dados sugerem que, um delicado balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias pode determinar as diferentes formas de evolução clínica da doença de Chagas.

3.4.4. IL-17

A interleucina 17 (IL-17) é a principal citocina produzida pelas células Th17. Sua família é composta por seis membros (IL-17A a IL-17F). Todavia, a IL-17A e IL-17F não são exclusivamente produzidas pelas células Th17, sendo também produzidas por macrófagos, células dendríticas e células NK (Onishi & Gaffen, 2010). Geralmente, a IL-17A é referida apenas como IL-17.

Vários autores já relataram o papel da IL-17A e IL-17F na proteção de organismos contra bactérias e fungos devido à sua capacidade de recrutar neutrófilos para as áreas de infecção, evidenciando seu papel patológico em vários modelos de doenças autoimunes. Além disso, a IL-17A parece estar envolvida no processo de rejeição aguda do enxerto no contexto de transplante de órgãos (Revisado por Normanton *et al.*, 2013).

Ainda existem poucos estudos sobre a participação das interleucinas da família IL-17 na doença de Chagas, e os achados ainda são contraditórios. No estudo de caso de infecção aguda com *T. cruzi* em animais de experimentação, Miyazaki *et al.* (2010) observaram que camundongos *knockouts* para o gene IL-17 apresentaram parasitemia mais elevada e maior taxa de mortalidade comparados aos camundongos do tipo selvagem

(C57BL/6), quando ambos foram infectados com a cepa Tulahuén de *T. cruzi* (TcVI). Em contrapartida, Guedes *et al.* (2010), mostraram que a IL-17 possui um papel anti-inflamatório, reduzindo a expressão de IL-12 e conseqüentemente a produção de IFN- γ e TNF- α , controlando a miocardite induzida pelo parasito em estudo realizado com camundongos BALB/C infectados pela cepa Y de *T. cruzi* (TcII).

No que refere à doença de Chagas humana também foi observado que baixos níveis de IL-17 e IL-10, contraposto a altos níveis de IFN- γ e TNF- α , estão correlacionados à gravidade das lesões do miocárdio em pacientes chagásicos, sugerindo um papel protetor de IL-17 às lesões teciduais em condições inflamatórias (Guedes *et al.*, 2010). Não obstante, Reis *et al.*, 2017 encontraram que altos níveis de expressão de IL-17 estariam associados ao maior risco de desenvolvimento de cardiomiopatia.

3.5. Justificativa e objetivos

Há razoável consenso de que os pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica apresentam uma resposta inflamatória mais intensa do que pacientes assintomáticos e que um fino balanço entre a produção de citocinas pró-inflamatória e anti-inflamatória é essencial para a evolução clínica da doença de Chagas. Então, dada a importância dos mecanismos inflamatórios para a patogênese dessa enfermidade, a susceptibilidade genética à cardiomiopatia pode ser resultante de polimorfismos genéticos funcionalmente relevantes que levem a variações na intensidade da resposta imune e em níveis de citocinas e quimiocinas envolvidas na patogênese da doença. Assim, na busca de biomarcadores que possam mostrar a suscetibilidade para o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica e a reativação da infecção em pacientes imunossuprimidos, traçamos os seguintes objetivos específicos para esta etapa do trabalho:

- I- Determinar as frequências dos genótipos polimórficos e dos alelos em genes codificadores das citocinas IL-1 α , IL-6, IL-10 e IL-17 em amostras de DNA extraídas das biópsias endomiocárdicas de corações explantados e de seguimento pós-transplante (coração transplantado) de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos transplantados no HC-UFMG.
- II- Estabelecer eventuais associações entre os polimorfismos encontrados e a suscetibilidade à reativação da doença de Chagas em pacientes chagásicos transplantados;
- III- Estabelecer eventuais associações entre os polimorfismos encontrados e a suscetibilidade à rejeição em pacientes chagásicos transplantados;

IV- Avaliar o impacto a longo prazo dos polimorfismos em genes de citocinas no par doador/receptor sobre rejeição e reativação pós-transplante.

3.6. Metodologia

3.6.1. Pacientes e amostras

Conforme descrito no Capítulo 1, os pacientes chagásicos participantes deste estudo são majoritariamente provenientes de regiões endêmicas de Minas Gerais e foram submetidos a transplante cardíaco no HC- UFMG no período entre 2008 e 2018.

Para esta etapa, um total de 140 amostras pareadas de corações explantados de paciente cardiopata chagásico (70 amostras) e de BEMs de seguimento pós-transplante (70 amostras) foram utilizadas, respectivamente, para estudo do polimorfismo de DNA do receptor e do doador do enxerto cardíaco.

3.6.2. Extração do DNA

Para a extração de DNA de material emblocado em parafina, foram realizadas de 5 a 12 secções de 10 µm de espessura nos blocos e os fragmentos do miocárdio foram processados com o *kit* QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Valencia, CA) para a extração do DNA, segundo as orientações do fabricante. Para os tecidos cardíacos conservados em etanol, o DNA foi obtido utilizando o *kit* QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen, Valencia, CA), também segundo as orientações do fabricante.

3.6.3. Determinação da concentração de DNA das amostras

A quantificação da concentração de DNA de cada amostra foi realizada em *NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)* utilizando-se 1µL da amostra de DNA. De acordo com a concentração obtida, diluições foram realizadas afim de se obter uma alíquota de 9µL contendo 50ng de DNA para a realização da PCR.

3.6.4. Genotipagem dos polimorfismos

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por meio de PCR em tempo real, utilizando o sistema *TaqMan®* no termociclador *CFX96TM Real-Time PCR Detection System (BioRad)*, utilizando protocolos de discriminação alélica, produzidos e comercializados pela *Applied Biosystems*.

Esse sistema utiliza, além dos iniciadores, uma sonda contendo um fluoróforo ligado a sua extremidade 5' e um composto que bloqueia a emissão dessa fluorescência (*quencher*) ligado à sua extremidade 3'. Essa sonda potencialmente fluorescente hibridiza na região-alvo à jusante da região de pareamento do iniciador *sense*. Quando a sonda está

intacta há a transferência de energia entre o fluoróforo e o *quencher*, de maneira, que não há emissão de fluorescência. Entretanto, quando a *Taq* polimerase começa a sintetizar o fragmento de DNA a partir do iniciador *sense*, a atividade exonucleásica, presente na extremidade 3' da enzima, é capaz de clivar a sonda, separando o fluoróforo do *quencher* e, permitindo, assim, a emissão da fluorescência. Este sinal, por sua vez, é capturado por uma câmera presente no equipamento de PCR em tempo real.

As PCRs foram realizadas utilizando *TaqMan*® *SNP Genotyping Master Mix* (mix contendo tampão de incubação, dNTPs e *Taq* polimerase) *TaqMan*® *SNP Genotyping assay* (contendo o par de iniciadores e sondas) e DNA genômico (50ng/9µL). Essas reações foram realizadas em placas de 96 poços, sendo incluídos um controle negativo e um positivo em cada placa. Utilizando esse sistema, SNPs localizados em genes para quatro citocinas diferentes foram analisados. As identificações dos polimorfismos estudados estão apresentadas na Tabela 3.1

Tabela 3.1 - Identificação dos polimorfismos analisados neste trabalho.

<i>Polimorfismo</i>	<i>Posição</i>	<i>Troca de Bases</i>	<i>Cromossomo</i>	<i>Identificação do SNP</i>
IL-1α	- 889	C/T	Chr.2:112785383	rs1800587
IL-6	-174	G/C	Chr.7:22727026	rs1800795
IL-10	-1082	G/A	Chr.1:206773552	rs1800896
IL-17A	- 197	A/G	Chr.6:52186235	rs2275913

Fonte: Base de dados de SNPs do *National Center for Biotechnology Information*.

A determinação dos genótipos para cada polimorfismo foi realizada por meio do *software CFX-Manager* da *Bio-Rad*. Considerando-se que cada alelo está associado a um fluoróforo diferente, a apresentação de apenas um sinal de fluorescência permite a identificação do genótipo homocigoto para cada alelo, enquanto a apresentação de dois sinais de fluorescência identifica o genótipo heterocigoto. Além disso, como a cada ciclo de amplificação ocorre liberação de fluorescência, a reação de amplificação é diretamente proporcional à fluorescência emitida, o que torna o processo quantitativo.

É importante ressaltar, que o presente estudo foi baseado em nível de análises de polimorfismos de DNA e não em nível de citocina circulante. Todavia, evidências na literatura revelam que há razoável associação dos genótipos com a produção das interleucinas e com os níveis de interleucina circulante, conforme mostrado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Polimorfismos genéticos e produção das interleucinas analisadas neste trabalho

<i>Polimorfismo</i>	<i>Alelo</i>	<i>Produção da interleucina</i>	<i>Referências</i>
IL1α (-889 C/T)	C	Baixa	Smith <i>et al.</i> , 2009
	T	Alta	
IL6 (-174 G/C)	G	Alta*	Fishman <i>et al.</i> , 1998
	C	Baixa	
IL10 (-1082 G/A)	G	Alta	Turner <i>et al.</i> , 1997b
	A	Baixa	
IL17A (-197 A/G)	A	Alta	Espinoza <i>et al.</i> , 2011
	G	Baixa	

*Há controvérsias (Kiszal *et al.*, 2007; Huth *et al.*, 2009).

Dessa forma, é possível associar a sequência genética ao fenótipo produtor de citocina. Assim, indivíduos homocigotos para o alelo alto produtor são considerados os maiores produtores dessa citocina, enquanto os homocigotos para o alelo baixo produtor são considerados os mais baixos produtores e aqueles que são heterocigotos, são considerados produtores intermediários da citocina correspondente (Hutchinson *et al.*, 1998)

3.6.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software estatístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS versão 21.0 – IBM corporation, NY, USA).

O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado para verificar se as frequências genotípicas estavam em equilíbrio com a frequência alélica. Para avaliar a adequação do tamanho da amostra, foi analisado o erro máximo de estimativa.

O teste de Qui-quadrado (X^2) foi utilizado para comparar as frequências alélicas e genotípicas entre os diferentes grupos. Valores de p inferior a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. O *Odds Ratio* (OR) foi calculado considerando-se um intervalo de confiança de 95%. Valores de OR > 1 indicam a presença de fator de risco e valores de OR < 1 um fator protetor, enquanto OR=1 indica nenhuma associação.

3.7. Resultados e discussão

O grupo de estudo foi composto por 70 pares doador- receptor do enxerto cardíaco em transplantes realizados no HC-UFMG entre 2008-2018. Dessa forma, foram analisadas 140 amostras, sendo 70 derivadas do coração explantado, que consiste no

coração doente retirado cirurgicamente e se refere ao genótipo do receptor, e 70 amostras do coração transplantado, obtida por meio da BEM realizada pós-transplante e reporta o genótipo do doador. Das 140 amostras analisadas, seis amostras não tiveram amplificação para IL1 α e 34 amostras não tiveram amplificação para IL17A, provavelmente por se tratarem de amostras parafinadas, que, como já abordado anteriormente reduzem a efetividade da amplificação (Fernandes *et al.*, 2004).

Todavia, o cálculo do poder amostral para um intervalo de confiança de 95% e uma estimativa máxima de erro de 5% demonstrou que o tamanho da amostra utilizado estava adequado.

Inicialmente, foi realizada a avaliação das frequências esperadas dos genótipos *v.s.* observadas por meio do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Considerando-se o nível de significância de 5% e o grau de liberdade igual a 1, valores de X^2 inferiores a 3,84 indicam que a população está em equilíbrio. Os resultados desta análise estão expressos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos gênicos estudados

<i>Polimorfismo</i>	X^2
IL-1α	87,96
IL-6	1,453
IL-10	20,93
IL-17A	0,667

Nota. Valores de X^2 inferiores a 3,84 indicam que a população está em equilíbrio.

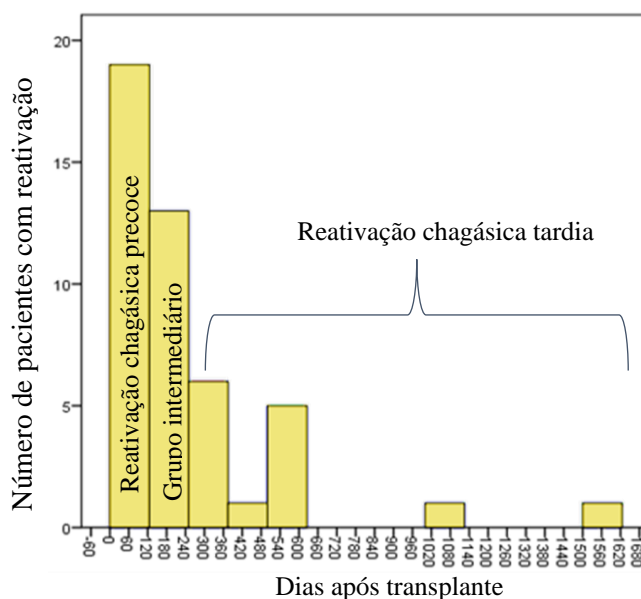
De acordo com os dados obtidos, verificou-se que a população de estudo encontra-se em equilíbrio apenas para os polimorfismos dos genes IL6 e IL17A.

Embora alguns estudos estabeleçam que a existência de desvios do EHW possa indicar possíveis erros de amostragem ou genotipagem, o desequilíbrio também pode ser resultado de uma associação real, visto que, consistentemente, vários SNPs têm sido observados fora do EHW (Turner *et al.*, 2012). De acordo com Turner e colaboradores, até os SNPs gravemente fora do equilíbrio devem ser conservados nas análises, mas sinalizados para posterior exame, visto que há muitas causas biológicas que podem levar a esse desequilíbrio. Nesse contexto, todos os quatro *loci* de citocinas foram mantidos nas análises seguintes nessa parte do trabalho.

A próxima etapa, foi analisar a existência de eventual associação dos polimorfismos encontrados nos genes das interleucinas descritas acima com a reativação clínica da doença de Chagas e a rejeição pós-transplante cardíaco. Para isso, as frequências alélica e genotípica dos pacientes com algum episódio de reativação chagásica ou rejeição durante o estudo foram comparadas com as frequências daqueles pacientes que não apresentaram essas ocorrências.

Em relação à reativação da doença de Chagas, quando os dados dos grupos de pacientes com ou sem reativação foram globalmente comparados, independentemente do tempo até a reativação, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em relação a reativação chagásica para nenhuma das citocinas avaliadas (Tabela 3.1). Todavia, quando o grupo de pacientes que apresentaram reativação da doença de Chagas foi subdividido em três subgrupos (Figura 3.4) - um contendo apenas pacientes que reativaram a infecção em até 120 dias pós-transplante (denominado aqui de grupo de reativação precoce), um com pacientes que reativaram a doença de Chagas entre 120 e 240 dias (denominado de grupo de reativação intermediária) e um terceiro grupo com paciente que reativaram a doença após 240 dias (grupo de reativação tardia) - foi possível observar diferença significativa entre os grupos analisados para os polimorfismos de algumas interleucinas.

Figura 3.4 - Distribuição do número de pacientes com reativação chagásica de acordo com o tempo pós-transplante



Nota. n= 46

3.7.1. IL-1 α

A IL-1 causa vasodilatação, aumenta a aderência de linfócitos e neutrófilos às células endoteliais e pode estar implicada na imunobiologia da rejeição aguda e crônica do enxerto (Vamvakopoulos *et al.*, 2002).

De acordo com a base de dados de SNPs do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), para o polimorfismo no gene da IL-1 α (-889 C/T), a presença da variante alélica T (CT e TT) nas diferentes populações é bastante variável, mostrando elevada frequência na população subsaariana, intermediária na europeia e baixa na asiática japonesa e chinesa. A frequência deste alelo na população europeia é de 25,2% e de 46,0% na africana subsaariana. Em nosso estudo, a presença da variante alélica T foi elevada em todos os grupos, e a frequência do alelo T variou de 57,5% (rejeição) e 52,3% (reativação) para o grupo receptor/ cardiopata chagásico a 53,0% (rejeição) e 53,7% (reativação) para o grupo doador, indicando valores mais próximos ao da população africana, que sabidamente possui grande influência na formação genética da população brasileira (Pena *et al.*, 2011).

As genotipagens para esse polimorfismo no gene da IL-1 α nos diferentes grupos de estudo deste trabalho em relação à rejeição do enxerto cardíaco e à reativação chagásica pós-transplante estão expressas nas Tabela 3.4 e Tabela 3.5.

A comparação entre os três genótipos (CC, CT e TT) não apresentou resultados estatisticamente significativos em relação à rejeição ou reativação pós-transplante tanto para o grupo explantado (receptor) quanto para o transplantado (doador). Em relação às frequências alélicas, também não foram observadas diferenças entre os grupos. Tendo em vista que a variante alélica T tem sido associada à maior produção da citocina pró-inflamatória IL-1, foi realizada ainda uma análise comparando a presença do alelo T (T+) e sua ausência (T-) entre os grupos; no entanto, também não houve diferença entre eles. Resultados similares foram observados para os grupos C+ e C-.

Tabela 3.4 - Frequências genótípicas e dos alelos para IL1- α em relação a rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante

	COM rejeição (49)				SEM rejeição (18)			
	<i>Explantado</i>		<i>Transplantado</i>		<i>Explantado</i>		<i>Transplantado</i>	
Genótipos	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem
CC	00/49 ^a	0,0%	00/49 ^b	0,0%	00/18 ^a	0,0%	00/18 ^b	0,0%
CT	43/49 ^a	87,8%	47/49 ^b	95,9%	14/18 ^a	77,8%	16/18 ^b	88,9%
TT	06/49 ^a	12,2%	02/49 ^b	4,1%	04/18 ^a	22,2%	02/18 ^b	11,1%
Alelos								
C	43/98 ^c	43,9%	47/98 ^d	48,0%	14/36 ^c	38,9%	16/36 ^d	44,4%
T	55/98 ^c	56,1%	51/98 ^d	52,0%	22/36 ^c	61,1%	20/36 ^d	55,6%
Presença/Ausência								
T+ (CT + TT)	49/49 ^e	100,0%	49/49 ^f	100,0%	18/18 ^e	100,0%	18/18 ^f	100,0%
T- (CC)	00/40 ^e	0,0%	00/40 ^f	0,0%	00/18 ^e	0,0%	00/18 ^f	0,0%
C+ (CC + CT)	43/49 ^g	87,8%	47/49 ^h	95,9%	14/18 ^g	77,8%	16/18 ^h	88,9%
C- (TT)	06/49 ^g	12,2%	02/49 ^h	4,1%	04/18 ^g	22,2%	02/18 ^h	11,1%

Nota. (1) n= 67; **(2)** 49 pacientes com algum episódio de rejeição e 18 pacientes sem episódios de rejeição do enxerto cardíaco durante o tempo do estudo. **(3) Estatísticas:** Análise da associação entre os genótipos e rejeição: **a)** explantado/ receptor: $X^2=0,97$; $p=0,33$; **b)** transplantado/ doador: $X^2=1,03$; $p=0,31$; Análise da associação entre os alelos e rejeição: **c)** explantado/ receptor: $X^2=0,27$; $p=0,60$; OR=0,81; IC= 0,37- 1,77; **d)** transplantado/ doador: $X^2=0,13$; $p=0,72$; OR=0,87; IC= 0,40- 1,87; **e, f)** Nenhuma estatística é calculada porque T+ é uma constante; Análise da associação entre rejeição e os grupos C+ e C-: **g)** explantado/ receptor: $X^2=3,69$; $p=0,06$; OR=3,88; IC=0,96- 15,44; **h)** transplantado/ doador: $X^2=3,19$; $p=0,07$; OR= 6,95; IC=0,68- 71,14.

Tabela 3.5 - Frequências genótípicas e dos alelos para IL1- α em relação a reativação chagásica precoce pós-transplante

	COM reativação chagásica até 120 dias (18)				SEM reativação chagásica ou reativação após 240 dias (37)			
	Explantado		Transplantado		Explantado		Transplantado	
Genótipos	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem
CC	00/18 ^a	0,0%	00/18 ^b	0,0%	00/37 ^a	0,0%	00/37 ^b	0,0%
CT	14/18 ^a	77,8%	16/18 ^b	88,9%	33/37 ^a	89,2%	35/37 ^b	94,6%
TT	04/18 ^a	22,2%	02/18 ^b	11,1%	04/37 ^a	10,8%	02/37 ^b	5,4%
Alelos								
C	14/36 ^c	38,9%	16/36 ^c	46,4%	33/74 ^c	44,6%	35/74 ^d	47,3%
T	22/36 ^c	61,1%	20/36 ^c	53,6%	41/74 ^c	55,4%	39/74 ^d	52,7%
Presença/Ausência								
T+ (CT + TT)	18/18 ^e	100,0%	18/18 ^f	100,0%	37/37 ^e	100,0%	37/37 ^f	100,0%
T- (CC)	00/18 ^e	0,0%	00/18 ^f	0,0%	00/37 ^e	0,0%	00/37 ^f	0,0%
C+ (CC + CT)	14/18 ^g	77,8%	16/18 ^h	88,9%	33/37 ^g	89,2%	35/37 ^h	94,6%
C- (TT)	04/18 ^g	22,2%	02/18 ^h	11,1%	04/37 ^g	10,8%	02/37 ^h	5,4%

Nota. (1) n= 55; (2) 18 pacientes com algum episódio de reativação em até 120 dias e 37 pacientes sem episódios de reativação ou com reativação tardia (3) **Estatísticas:** Análise da associação entre os genótipos e reativação precoce: **a)** explantado/ receptor: $X^2=0,46$; $p= 0,50$; **b)** transplantado/ doador: $X^2=0,64$; $p=0,42$; Análise da associação entre os alelos e a reativação precoce: **c)** explantado/ receptor: $X^2=0,32$; $p=0,57$; OR=1,26; IC= 0,56- 2,85; **d)** transplantado/ doador: $X^2= 0,08$; $p=0,78$; OR=1,12; IC= 0,50- 2,50; **e, f)** Nenhuma estatística é calculada porque T+ é uma constante; Análise da associação entre reativação precoce e os grupos C+ e C- **g)** explantado/ receptor: $X^2=1,27$; $p=0,26$; OR=0,42; IC=0,09- 1,94; **h)** transplantado/ doador: $X^2=0,55$; $p=0,46$; OR= 0,46; IC=0,06- 3,54.

Assim, tomados em conjunto, nossas análises não identificaram nenhuma associação entre rejeição ou reativação da doença de Chagas e o dimorfismo no *locus* - 889 no gene de IL-1 α . Esse dado é curioso, considerando-se que há razoável consenso de que seu alelo T esteja associado a uma maior produção dessa interleucina pró-inflamatória (Smith *et al.*, 2009).

Não há dados na literatura sobre estudos da correlação da reativação da doença de Chagas com polimorfismos dessa interleucina, todavia, no que concerne à rejeição, nossos achados estão de acordo com o observado por Lee e colaboradores (2004), que também não encontraram associação dos genótipos de IL-1 α tanto do doador quanto do receptor do enxerto com a rejeição ao transplante renal.

Dados similares foram obtidos por Flórez *et al.* (2006), que também não encontraram diferenças significativas quando avaliaram a associação do polimorfismo de

IL-1 com as formas cardíaca e assintomática da doença de Chagas em pacientes colombianos. Por outro lado, resultados conflitantes foram observados entre polimorfismo neste gene e a associação com periodontite crônica em pacientes brasileiros. Enquanto Trevilatto *et al.*, 2011 não encontraram diferença entre os grupos analisados, Moreira *et al.*, 2007, encontraram que o alelo T estava associado a essa doença inflamatória.

3.7.2. IL-6

Estudos prévios para o polimorfismo da IL-6 (-174 G/C) mostraram que indivíduos homozigotos para o alelo G ou heterozigotos são caracterizados como alto produtores de IL-6 e apresentam altos níveis plasmáticos desta citocina. Já indivíduos homozigotos para o alelo C são baixos produtores de IL-6 (Fishman *et al.*, 1998). Entretanto há resultados controversos, em que não foram observadas associações entre esse polimorfismo e níveis dessa interleucina no plasma (Kizel *et al.*, 2007; Huth *et al.*, 2009), indicando que talvez exista outro *loci* polimórfico que esteja afetando a expressão de IL-6 (Smith & Humphries, 2009).

A baixa frequência do genótipo CC nas populações estudadas está em concordância com estudos genéticos realizados na América Latina, incluindo o Brasil, que mostram que esse genótipo é raro (Hoffmann *et al.*, 2002, Castelluci *et al.*, 2006, Gatti *et al.*, 2007, Visentainer *et al.*, 2008). Em nossos achados observamos a frequência de 4,3% no subgrupo com rejeição e 3,5% no subgrupo com reativação dentro do grupo receptor e 2,9% no subgrupo com rejeição e 1,8% no subgrupo com reativação dentro do grupo doador. A frequência do alelo C para o polimorfismo da IL-6 nos subgrupos com rejeição ou com reativação pós-transplante foi, respectivamente, de 18,6% e 18,5% no grupo receptor e 27,9% e 28,1% no grupo doador. Esses valores estão razoavelmente dentro do esperado que é de 25,9% para a população global, de acordo com dados extraídos do NCBI.

Em nosso estudo, a comparação entre os três genótipos (CC, CG e GG) não apresentou resultados estatisticamente significativos em relação à rejeição e à reativação chagásica pós-transplante para nenhum dos grupos analisados. Em relação à frequência alélica, também não foi observada diferença significativa no número de casos de rejeição e reativação em relação às variantes alélicas C e G. Semelhantemente, também não observamos diferença significativa no número pacientes com rejeição e reativação nos grupos C+/ C- ou G+/ G-, conforme demonstrado nas Tabelas 3.6 e 3.7.

Tabela 3.6 – Frequências genótípicas e dos alelos para IL-6 em relação a rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante

	COM rejeição (52)				SEM rejeição (18)			
	Explantado		Transplantado		Explantado		Transplantado	
Genótipos	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem
GG	34/52 ^a	65,4%	23/52 ^b	44,2%	13/18 ^a	72,2%	10/18 ^b	55,6%
GC	16/52 ^a	30,8%	27/52 ^b	51,9%	04/18 ^a	22,2%	08/18 ^b	44,4%
CC	02/52 ^a	3,8%	02/52 ^b	3,8%	01/18 ^a	5,6%	00/18 ^b	0,0%
Alelos								
G	84/104 ^c	80,8%	73/104 ^d	70,2%	30/36 ^c	83,3%	28/36 ^d	77,8%
C	20/104 ^c	19,2%	31/104 ^d	29,8%	06/36 ^c	16,7%	08/36 ^d	22,2%
Presença/Ausência								
C+ (GC + CC)	18/52 ^e	34,6%	29/52 ^f	55,8%	05/18 ^e	27,8%	08/18 ^f	44,4%
C- (GG)	34/52 ^e	65,4%	23/52 ^f	44,2%	13/18 ^e	72,2%	10/18 ^f	55,6%
G+ (GG + GC)	50/52 ^g	96,2%	50/52 ^h	96,2%	17/18 ^g	94,4%	18/18 ^h	100,0%
G- (CC)	02/52 ^g	3,8%	02/52 ^h	3,8%	01/18 ^g	5,6%	00/18 ^h	0,0%

Nota. (1) n= 70; (2) 52 pacientes com algum episódio de rejeição e 18 pacientes sem episódios de rejeição do enxerto cardíaco durante o tempo do estudo. (3) **Estatísticas:** Análise da associação entre os genótipos e rejeição: **a)** explantado/ receptor: $X^2=0,54$; $p=0,76$; **b)** transplantado/ doador: $X^2=1,69$; $p=0,43$; Análise da associação entre os alelos e rejeição: **c)** explantado/ receptor: $X^2=0,12$; $p= 0,73$; OR=1,19; IC=0,44- 3,25; **d)** transplantado/ doador: $X^2=0,766$; $p=0,382$; OR=1,486; IC=0,610- 3,623; Análise da associação entre rejeição e os grupos C+ e C-: **e)** explantado/ receptor: $X^2=0,45$; $p=0,50$; OR=1,46; IC=0,48- 4,43; **f)** transplantado/ doador: $X^2=0,71$; $p= 0,40$; OR= 1,54; IC= 0,56- 4,26; Análise da associação entre rejeição e os grupos G+ e G- : **g)** explantado/ receptor: $X^2=0,09$; $p=0,76$; OR=1,47; IC=0,12- 12,26 **h)** transplantado/ doador: $X^2=1,21$; $p=0,27$;

Tabela 3.7 - Frequências genótípicas e dos alelos para IL1-6 em relação a reativação chagásica precoce pós-transplante.

	COM reativação chagásica até 120 dias (19)				SEM reativação chagásica ou reativação após 240 dias (38)			
	<i>Explantado</i>		<i>Transplantado</i>		<i>Explantado</i>		<i>Transplantado</i>	
Genótipos	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem	Casos/ Total	Porcentagem	Casos/ Total	Porcentagem
GG	13/19 ^a	68,4%	10/19 ^b	52,6%	25/38 ^a	65,8%	16/38 ^b	42,1%
GC	06/19 ^a	31,6%	08/19 ^b	42,1%	11/38 ^a	28,9%	22/38 ^b	57,9%
CC	00/19 ^a	0,0%	01/19 ^b	5,3%	02/38 ^a	5,3%	00/38 ^b	0,0%
Alelos								
G	32/38 ^c	84,2%	28/38 ^d	73,7%	61/76 ^c	80,3%	54/76 ^d	71,1%
C	06/38 ^c	15,8%	10/38 ^d	26,3%	15/76 ^c	19,7%	22/76 ^d	28,9%
Presença/Ausência								
C+ (GC + CC)	06/19 ^d	31,6%	09/19 ^e	47,4%	13/38 ^d	34,2%	22/38 ^e	57,9%
C- (GG)	13/19 ^d	68,4%	10/19 ^e	52,6%	25/38 ^d	65,8%	16/38 ^e	42,1%
G+ (GG + GC)	19/19 ^f	100,0%	18/19 ^g	94,7%	36/38 ^f	94,7%	38/38 ^h	100,0%
G- (CC)	00/19 ^f	0,0%	01/19 ^g	5,3%	02/38 ^f	5,3%	00/38 ^h	0,0%

Nota. (1) n= 57; **(2)** 19 pacientes com algum episódio de reativação em até 120 dias e 38 pacientes sem episódios de reativação ou com reativação tardia **(3) Estatísticas:** Análise da associação entre os genótipos e reativação precoce: **a)** explantado/ receptor: $X^2=1,63$; $p=0,44$; **b)** transplantado/ doador: $X^2=3,63$; $p=0,16$; Análise da associação entre os alelos e a reativação precoce: **c)** explantado/ receptor: $X^2=0,57$; $p=0,45$; OR=0,66; IC=0,22- 1,97; **d)** transplantado/ doador: $X^2=0,19$; $p=0,66$; OR=0,82; IC=0,33- 2,02; Análise da associação entre reativação precoce e os grupos C+ e C- : **e)** explantado/ receptor: $X^2=0,04$; $p=0,84$; **f)** transplantado/ doador: $X^2=0,57$; $p=0,45$; OR=0,65; IC=0,22- 1,98; Análise da associação entre reativação precoce e os grupos G+ e G- : **g)** explantado/ receptor: $X^2=1,66$; $p=0,20$; **h)** transplantado/ doador: $X^2=2,23$; $p=0,13$;

Os resultados encontrados no presente trabalho também corroboram os achados de Torres e colaboradores (2010), que não encontraram associação do polimorfismo do gene da IL-6 com a cardiopatia chagásica em pacientes colombianos e peruanos (Torres *et al.*, 2010a).

Em relação à rejeição, concentrações elevadas de IL-6 têm sido associadas ao aumento da rejeição precoce do enxerto após transplante hepático (Boros *et al.*, 1997). Karimi *et al.* (2010) observaram que o genótipo GG (-174 G/C), que está associado à maior produção dessa interleucina, foi mais frequente nos pacientes com rejeição aguda do que em pacientes sem rejeição. Similarmente, Marshal *et al.* (2010), avaliando os genótipos tanto do doador quanto do receptor do enxerto renal, encontraram associação desse polimorfismo no doador, com a incidência e gravidade da rejeição aguda do

receptor, enquanto a rejeição não foi influenciada pelo genótipo do receptor para IL-6 e nem pela combinação do genótipo doador- receptor.

Todavia, para além do presente trabalho, não há relatos na literatura de outros estudos de associação desse polimorfismo com a rejeição ao enxerto cardíaco, nem em relação ao genótipo do doador, receptor ou a combinação doador-receptor.

3.7.3. IL-10

A IL-10 é produzida por muitas células do sistema imune, tais como macrófagos, células dendríticas, linfócitos Th1, Th2, Th17 (Couper *et al.*, 2008). Um dos efeitos mais conhecidos da IL-10 na resposta imune é a inibição dos monócitos e macrófagos e, indiretamente, supressão de IL-1 e TNF- α (Mocellin *et al.*, 2003).

Estudos antecedentes para o polimorfismo da IL-10 (-1082 G/A) revelaram que indivíduos com o genótipo GG eram altos produtores de IL-10, enquanto àqueles com genótipo AA eram baixos produtores dessa citocina (Turner *et al.*, 1997b).

A frequência do alelo A (mutante) para o polimorfismo da IL-10 para o estudo de rejeição e reativação pós-transplante foi de 60,7% e 58,8% no grupo receptor e 67,9% e 69,3% no doador. Esses dados estão em acordo com estudos prévios para esse mesmo polimorfismo na população brasileira, que observaram a frequência de cerca de 70,0% para o alelo A (Costa *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011).

Na Tabela 3.8 estão resumidos os dados de genotipagem do polimorfismo no gene IL10 (-1082 G/A) para os diferentes grupos de estudo em relação à rejeição.

As análises dos três genótipos (GG, GA e AA) em associação com episódios de rejeição do enxerto e ou de reativação da doença de Chagas, efetuadas nos grupos receptor (corações explantados) e doador, mostraram resultados intrigantes.

Em relação ao grupo doador, foi encontrado resultados estatisticamente significativos quando comparados os dados dos subgrupos com e sem rejeição pós-transplante cardíaco ($X^2=7,74$; $p=0,02$). Em relação à frequência alélica, foi observado que a variante alélica A (mutante) é significativamente mais frequente entre os indivíduos sem rejeição, do que entre os indivíduos com rejeição, sugerindo que o alelo A possui efeito protetor ($X^2=5,92$; $p=0,01$; OR=0,35; IC=0,144- 0,832) para a rejeição do enxerto cardíaco, pelo menos em pacientes cardiopatas chagásicos. Tendo em vista que a variante alélica G tem sido associada, na literatura, à maior produção da citocina IL-10, foi realizada uma análise comparando-se frequência de rejeição com a presença (G+) ou ausência (G-) do alelo G, tendo sido observadas diferenças significativas no número de

casos de rejeição nos subgrupos G+ e G-. Curiosamente, ao contrário do inicialmente imaginado, indivíduos do grupo G+, potencialmente maiores produtores de IL-10, possuem 4,2 vezes mais chances de ter rejeição do que indivíduos do subgrupo G- ($X^2=6,54$; $p=0,01$; OR= 4,17; IC=1,34- 12,91).

Resultados semelhantes foram encontrados, em relação aos genótipos dos doadores. Foram observadas diferenças significativas no número de casos de rejeição entre indivíduos dos genótipos GG, GA e AA ($X^2=4,15$; $p=0,04$). Da mesma forma, foram também identificadas diferenças no número de casos com rejeição nos subgrupos G+ e G-, tendo os indivíduos do grupo G+ 3,1 vezes mais risco de apresentarem episódios de rejeição. Entretanto, quando analisadas as frequências alélicas A e G, não foi detectada diferença entre os subgrupos com ou sem rejeição.

Tabela 3.8 – Frequências genotípicas e dos alelos para IL-10 em relação a rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante

	COM rejeição (52)				SEM rejeição (18)			
	Explantado		Transplantado		Explantado		Transplantado	
Genótipos	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem	Casos/Total	Porcentagem
GG	07/52 ^a	13,5%	00/52 ^b	0,0%	00/18 ^a	0,0%	00/18 ^b	0,0%
GA	33/52 ^a	63,5%	37/52 ^b	71,2%	08/18 ^a	44,4%	08/18 ^b	44,4%
AA	12/52 ^a	23,1%	15/52 ^b	28,8%	10/18 ^a	55,6%	10/18 ^b	55,6%
Alelos								
G	47/104 ^c	45,2%	37/104 ^d	35,6%	08/36 ^c	22,2%	08/36 ^d	22,2%
A	57/104 ^c	54,8%	67/104 ^d	64,4%	28/36 ^c	77,8%	28/36 ^d	77,8%
Presença/Ausência								
A+ (GA + AA)	45/52 ^e	86,5%	52/52 ^f	100,0%	18/18 ^e	100,0%	18/18 ^f	100,0%
A- (GG)	07/52 ^e	13,5%	00/52 ^f	0,0%	00/18 ^e	0,0%	00/18 ^f	0,0%
G+ (GG + GA)	40/52 ^g	76,9%	37/52 ^h	71,2%	08/18 ^g	44,4%	08/18 ^h	44,4%
G- (AA)	12/52 ^g	23,1%	15/52 ^h	28,8%	10/18 ^g	55,6%	10/18 ^h	55,6%

Nota. (1) n= 70; **(2)** 52 pacientes com algum episódio de rejeição e 18 pacientes sem episódios de rejeição do enxerto cardíaco durante o tempo do estudo. **(3) Estatísticas:** Análise da associação entre os genótipos e rejeição: **a)** explantado/ receptor: $X^2=7,74$; $p=0,02^*$; **b)** transplantado/ doador: $X^2=4,15$; $p=0,04^*$; Análise da associação entre os alelos e rejeição: **c)** explantado/ receptor: $X^2=5,92$; $p=0,01^*$; OR=0,35; IC=0,144- 0,832 **d)** transplantado/ doador: $X^2=2,19$; $p=0,14$; OR= 0,52; IC= 0,21- 1,25; Análise da associação entre rejeição e os grupos A+ e A- : **e)** explantado/ receptor: $X^2=4,42$; $p=0,03^*$; **f)** transplantado/ doador: Nenhuma estatística é calculada porque A+ é uma constante; Análise da associação entre rejeição e os grupos G+ e G-: **g)** explantado/ receptor: $X^2=6,54$; $p=0,01^*$; OR= 4,17; IC=1,34- 12,91 **h)** transplantado/ doador: $X^2=4,1$; $p= 0,04^*$; OR= 3,08; IC= 1,02- 9,32 **(4)*** Valores significativos $p < 0,05$.

Tomados em conjunto, nossos dados relacionados a polimorfismo do gene da IL-10 mostraram associação entre o genótipo do receptor quanto do doador no risco pós-transplante de ocorrência de episódios de rejeição.

Ademais, quando analisado em combinação o genótipo do par doador-receptor foi possível observar diferenças significativas entre os números de rejeições nos diferentes subgrupos. No subgrupo com rejeição observou-se a presença de um maior número de combinação G+/G+ comparado ao subgrupo sem rejeição. Além disso, no grupo sem rejeição houve mais casos de combinação G-/G- do que o observado no grupo com rejeição (Tabela 3.9), sugerindo que a combinação da presença do alelo G no doador e no receptor, aumenta o risco para a rejeição pós-transplante cardíaco, pelo menos em pacientes cardiopatas chagásicos.

Tabela 3.9 – Combinação das frequências genótípicas para IL-10 em relação a rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante

<i>Explantado</i>	COM rejeição				SEM rejeição				
	<i>Transplantado</i>				<i>Transplantado</i>				
	G+ (GG + GA)		G- (AA)		G+ (GG + GA)		G- (AA)		
G+ (GG + GA)	30/52	57,7%*	10/52	19,2%	G+ (GG + GA)	04/18	22,2%*	04/18	22,2%
G- (AA)	07/52	13,5%	05/52	9,6%*	G- (AA)	04/18	22,2%	06/18	33,3%*

Nota. * Proporções estatisticamente diferentes (Teste t para comparação de duas proporções- nível de significância de 5%).

Por se tratar de uma citocina com conhecido papel anti-inflamatório, a expectativa inicial era que o alelo ancestral (G), que está relacionado à maior produção de IL-10, pudesse conferir proteção contra a rejeição aguda, conforme já demonstrado por Martell (1999), Turner *et al.* (1997a) e McDaniel *et al.* (2004), no cenário do transplante cardíaco. Todavia, nossos resultados demonstraram um cenário bem diferente ao esperado. Embora aparentemente discrepantes, nossos resultados não foram os primeiros a detectar essa aparente incongruência. De fato, pelo menos para o transplante renal, o genótipo de alta expressão de IL-10 já foi associado a uma maior suscetibilidade à rejeição aguda (Hutchinson *et al.*, 1998; Sankaran *et al.*, 1999, Thakkestian *et al.*, 2008) ratificando os nossos achados.

É preciso considerar que as citocinas participam de cascatas de reações extremamente complexas que, em diferentes situações podem gerar efeitos aparentemente antagônicos, refletindo talvez os diversos papéis da IL-10 na rejeição de enxertos. Nesse contexto, é relevante destacar que a citocina IL-10 induz a supressão da inflamação por

regular negativamente moléculas de classe II do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) e a expressão de ICAM (moléculas de adesão intercelular) e por inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8. Por outro lado, essa citocina também regula positivamente a proliferação e diferenciação das células B. Assim, tanto a alta quanto a baixa produção de IL-10 pode ser prejudicial ao paciente, mediando diferentes vias de rejeição ao enxerto (Turner *et al.*,1997a). A baixa produção de IL-10 pode permitir uma resposta inflamatória prolongada, mas também há evidências de que o aumento da produção de IL-10 pela infiltração de células T CD4+ em aloenxertos renais pode estar envolvido em alguns casos de rejeição (Bromberg *et al.*,1995).

Em relação à reativação chagásica, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os genótipos de IL-10 ou na frequência alélica entre os grupos com e sem reativação, mesmo após a subdivisão deste último em subgrupos com reativação precoce, intermediária e tardia. Similarmente, não foram detectadas diferenças no número pacientes com reativação nos grupos A+/ A- e G+/ G-, conforme apresentado na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 – Frequências genótípicas e dos alelos para IL-10 em relação a reativação chagásica precoce pós-transplante

	COM reativação chagásica até 120 dias (19)				SEM reativação chagásica ou reativação após 240 dias (38)			
	Explantado		Transplantado		Explantado		Transplantado	
Genótipos	Casos/ Total	Porcentagem	Casos/ Total	Porcentagem	Casos/ Total	Porcentagem	Casos/ Total	Porcentagem
GG	03/19 ^a	15,8%	00/19 ^b	0,0%	02/38 ^a	5,3%	00/38 ^b	0,0%
GA	12/19 ^a	63,2%	12/19 ^b	63,2%	25/38 ^a	65,8%	23/38 ^b	60,5%
AA	04/19 ^a	21,1%	07/19 ^b	36,8%	11/38 ^a	28,9%	15/38 ^b	39,5%
Alelos								
G	18/38 ^c	47,4%	12/38 ^d	31,6%	29/76 ^c	38,2%	23/76 ^d	30,3%
A	20/38 ^c	52,6%	26/38 ^d	68,4%	47/76 ^c	61,8%	53/76 ^d	69,7%
Presença/Ausência								
A+ (GA + AA)	17/19 ^e	89,5%	19/19 ^f	100,0%	36/38 ^e	94,7%	38/38 ^f	100,0%
A- (GG)	03/19 ^e	15,8%	00/19 ^f	0,0%	02/38 ^e	5,3%	00/38 ^f	0,0%
G+ (GG + GA)	15/19 ^g	78,9%	12/19 ^h	63,2%	27/38 ^g	71,1%	23/38 ^h	60,5%
G- (AA)	04/19 ^g	21,1%	07/19 ^h	36,8%	11/38 ^g	28,9%	15/38 ^h	39,5%

Nota. (1) n= 57; (2) 19 pacientes com algum episódio de reativação em até 120 dias e 38 pacientes sem episódios de reativação ou com reativação tardia (3) Estatísticas: Análise da associação entre os genótipos e reativação precoce: **a)** explantado/ receptor: $X^2=1,89$; $p=0,39$; **b)** transplantado/ doador: $X^2=0,20$; $p=0,66$; Análise da associação entre os alelos e a reativação precoce: **c)** explantado/ receptor: $X^2=0,89$; $p=0,35$; OR=0,69; IC=0,31- 1,50; **d)** transplantado/ doador: $X^2=0,02$; $p=0,89$; OR=0,94; IC=0,40- 2,18; Análise da associação entre reativação precoce e os grupos A+ e A- : **e)** explantado/ receptor: $X^2=1,49$; $p=0,22$; **f)** transplantado/ doador: Nenhuma estatística é calculada porque A+ é uma constante; Análise da associação entre reativação precoce e os grupos G+ e G- : **g)** explantado/ receptor: $X^2=0,41$; $p=0,52$; OR=1,53; IC=0,41- 5,64; **h)** transplantado/ doador: $X^2=0,04$; $p=0,85$; OR=1,12; IC=0,36- 3,49.

De fato, a associação do polimorfismo no gene IL10 (-1082 G/A) com diferentes aspectos da doença de Chagas tem sido contraditória na literatura. Enquanto Costa *et al* (2009) verificaram associação do genótipo AA (baixa produção de IL-10) e do alelo A com cardiomiopatia chagásica em pacientes brasileiros, Flórez *et al* (2011) não observaram essa associação em pacientes colombianos. Assim como Flórez, nossos, resultados, tampouco demonstraram associação entre esse polimorfismo e a ocorrência de reativação da doença de Chagas pós-transplante.

3.7.4. IL-17A

A IL-17A, juntamente com a IL-17F, ativam células teciduais a produzirem quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, TNF- α e IL-1 β , auxiliam a infiltração de neutrófilos, e agravam a o dano tecidual por meio da indução da produção

de óxido nítrico e metaloproteinases de matriz (Awasthi & Kuchroo 2009; Damsker *et al.*, 2010).

Em relação ao polimorfismo da IL-17A (-197 A/G), já foi demonstrado que o alelo ancestral (A) está associado à maior produção de IL-17A (Espinoza *et al.*, 2011). Para esse polimorfismo a frequência do genótipo GG é heterogênea, variando de acordo com as diferentes etnias. De acordo com o NCBI, sua frequência é de 41,6% na população europeia, 30,2% na asiática japonesa e 81,7% na africana subsaariana. Considerando todos os subgrupos, nossos estudos mostraram uma variação na frequência do genótipo GG de 33,3-68,3%, mostrando valores intermediários entre as etnias citadas, que sabidamente estão envolvidas na formação genética brasileira.

A genotipagem do polimorfismo no gene da IL-17A (-197 A/G) nos diferentes grupos de estudo em relação à rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante está expressa na Tabela 3.11. A comparação entre os genótipos e a frequência alélica nos diferentes grupos não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparados os grupos com e sem rejeição pós-transplante. Similarmente, também não foram detectadas diferenças quanto à frequência de rejeições entre os subgrupos A+/ A- ou G+/ G-.

A participação da IL-17A já foi descrita na rejeição aguda em transplantes de órgãos e doença enxerto contra hospedeiro, evidenciando que o aumento dessa interleucina está relacionada a rejeição de enxertos (Antonysamy *et al.*, 1999, Vanaudenaerde *et al.*, 2006, Espinoza *et al.*, 2011, Normanton *et al.*, 2013).

No entanto, pelo nosso conhecimento, não há relatos na literatura de outros estudos que não o presente, investigando eventual associação do polimorfismo da citocina IL-17A (-197 A/G) com a rejeição de enxerto pós-transplante.

Tabela 3.11 – Frequências genótípicas e dos alelos para IL-17A em relação a rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante

	COM rejeição (41)				SEM rejeição (12)			
	Explantado		Transplantado		Explantado		Transplantado	
Genótipos	Casos/ Total	Porcentagem	Casos/ Total	Porcentagem	Casos/ Total	Porcentagem	Casos/ Total	Porcentagem
AA	01/41 ^a	2,4%	02/41 ^b	4,9%	00/12 ^a	0,0%	00/12 ^b	0,0%
AG	12/41 ^a	29,3%	16/41 ^b	39,0%	04/12 ^a	33,3%	05/12 ^b	41,7%
GG	28/41 ^a	68,3%	23/41 ^b	56,1%	08/12 ^a	66,7%	07/12 ^b	58,3%
Alelos								
A	14/82 ^c	17,1%	20/82 ^d	24,4%	04/24 ^c	16,7%	05/24 ^d	20,8%
G	68/82 ^c	82,9%	62/82 ^d	75,6%	20/24 ^c	83,3%	19/24 ^d	79,2%
Presença/Ausência								
A+ (AG+ AA)	13/41 ^e	31,7%	18/41 ^f	43,9%	04/12 ^e	33,3%	05/12 ^f	41,7%
A- (GG)	28/41 ^e	68,3%	23/41 ^f	56,1%	08/12 ^e	66,7%	07/12 ^f	58,3%
G+ (GG + GA)	40/41 ^g	97,6%	39/41 ^h	95,1%	12/12 ^g	100,0%	12/12 ^h	100,0%
G- (AA)	01/41 ^g	2,4%	02/41 ^h	4,9%	00/12 ^g	0,0%	00/12 ^h	0,0%

Nota. (1) n= 53; (2) 41 pacientes com algum episódio de rejeição e 12 pacientes sem episódios de rejeição do enxerto cardíaco durante o tempo do estudo. (3) **Estatísticas:** Análise da associação entre os genótipos e rejeição: **a)** explantado/ receptor: $X^2=0,57$; $p=0,75$; **b)** transplantado/ doador: $X^2=1,05$; $p=0,59$; Análise da associação entre os alelos e rejeição: **c)** explantado/ receptor: $X^2=0,002$; $p=0,96$; OR=0,97; IC=0,29- 3,28 **d)** transplantado/ doador: $X^2=0,13$; $p=0,72$; OR=0,82; IC=0,27- 2,47; Análise da associação entre rejeição e os grupos A+ e A- : **e)** explantado/ receptor: $X^2=0,60$; $p=0,44$; OR=0,61; IC=0,17- 2,13; **f)** transplantado/ doador: $X^2=0,10$; $p=0,75$; OR=1,21; IC=0,36- 4,09; Análise da associação entre rejeição e os grupos G+ e G-: **g)** explantado/ receptor: $X^2=0,67$; $p=0,41$; **h)** transplantado/ doador $X^2=1,36$; $p=0,24$

Resultados muito interessantes, todavia, foram observados em relação ao polimorfismo IL17A (-197 A/G) e sua associação com a reativação precoce da doença de Chagas (Tabela 3.11). Diferenças significativas foram detectadas em relação ao grupo de doadores. Para esse grupo foram detectadas diferenças no número de casos de reativação associados às variantes alélicas G e A ($X^2=4,11$; $p=0,04$). A presença do alelo G, que está associada à baixa expressão de IL-17A, demonstrou um efeito protetor para a reativação da infecção quando presente no coração doado (OR=0,36; IC=0,13- 0,98).

Por outro lado, quando comparada a presença (A+) e a ausência (A-) da variante alélica A entre os grupos, foi observado que há diferença significativa no número de reativação precoce entre os doadores dos subgrupos A+ e A-. De fato, os indivíduos que receberam coração de doadores do subgrupo A+ tiveram 3,8 vezes mais chance de apresentar reativação em até 120 dias pós-transplante do que os indivíduos do subgrupo A- ($X^2=4,1$; $p=0,04^*$; OR= 3,80; IC= 1,02- 14,20).

Tabela 3.12 – Frequências genótípicas e dos alelos para IL-17A em relação a reativação chagásica precoce pós-transplante

	COM reativação chagásica até 120 dias (15)				SEM reativação chagásica ou reativação após 240 dias (29)			
	<i>Explantado</i>		<i>Transplantado</i>		<i>Explantado</i>		<i>Transplantado</i>	
Genótipos	Casos/ Total	Porcentagem	Casos/ Total	Porcentagem	Casos/ Total	Porcentagem	Casos/ Total	Porcentagem
AA	00/15 ^a	0,0%	01/15 ^b	6,7%	00/29 ^a	0,0%	00/29 ^b	0,0%
AG	05/15 ^a	33,3%	09/15 ^b	60,0%	10/29 ^a	34,5%	10/29 ^b	34,5%
GG	10/15 ^a	66,7%	05/15 ^b	33,3%	19/29 ^a	65,5%	19/29 ^b	65,5%
Alelos								
A	05/30 ^c	16,7%	11/30 ^d	36,7%	10/58 ^c	17,2%	10/58 ^d	17,2%
G	25/30 ^c	83,3%	19/30 ^d	63,3%	48/58 ^c	82,8%	48/58 ^d	82,8%
Presença/Ausência								
A+ (AG+ AA)	05/15 ^e	33,3%	10/15 ^f	66,7%	10/29 ^e	34,5%	10/29 ^f	34,5%
A- (GG)	10/15 ^e	66,7%	05/15 ^f	33,3%	19/29 ^e	65,5%	19/29 ^f	65,5%
Presença/Ausência								
G+ (AG+ GG)	15/15 ^g	100,0%	14/15 ^h	93,3%	29/29 ^g	100,0%	29/29 ^h	100,0%
G- (AA)	00/15 ^g	0,0%	01/15 ^h	6,7%	00/29 ^g	0,0%	00/29 ^h	0,0%

Nota. (1) n= 44; (2) 15 pacientes com algum episódio de reativação em até 120 dias e 29 pacientes sem episódios de reativação ou com reativação tardia (3) Estatísticas: Análise da associação entre os genótipos e reativação precoce: **a)** explantado/ receptor: $X^2=0,01$; $p=0,94$; **b)** transplantado/ doador: $X^2=5,614$; $p=0,06$; Análise da associação entre os alelos e a reativação precoce: **c)** explantado/ receptor: $X^2=0,10$; $p=0,75$; OR=0,83; IC=0,27- 2,57; **d)** transplantado/ doador: $X^2=4,11$; $p= 0,04^*$; OR= 0,36 ; IC=0,13- 0,98; Análise da associação entre reativação precoce e os grupos A+ e A- : **e)** explantado/ receptor: $X^2=0,13$; $p= 0,72$; OR=1,27; IC=0,35- 4,58; **f)** transplantado/ doador: $X^2=4,1$; $p=0,04^*$; OR= 3,80; IC= 1,02- 14,20. Análise da associação entre reativação precoce e os grupos G+ e G-: **g)** explantado/ receptor: Nenhuma estatística é calculada porque G+ é uma constante; **h)** transplantado/ doador: $X^2=1,98$; $p= 0,16$;

Analisando o genótipo do receptor, a comparação entre os genótipos e a frequência alélica não apresentou resultado estatisticamente significativo quando se comparou os grupos com e sem reativação precoce pós-transplante. Assim, como não existe diferença significativa no número de reativação nos grupos A+/ A- e G+/ G-.

Entretanto, quando avaliados em combinação o genótipo do receptor e do doador, foi observado maior número de pares A-/A+ no grupo com reativação chagásica até 120 dias do que no grupo sem reativação ou com reativação tardia.

Ademais, nossos dados sugerem um papel determinante do genótipo do doador, na reativação precoce da doença de Chagas, estando o alelo A associado a uma maior susceptibilidade à reativação.

Tabela 3.13 – Combinação das frequências genótípicas para IL-17A em relação a rejeição do enxerto cardíaco pós-transplante

<i>Explantado</i>	COM reativação chagásica até 120 dias				SEM reativação chagásica ou reativação após 240 dias				
	<i>Transplantado</i>				<i>Explantado</i>	<i>Transplantado</i>			
	A+ (AG + AA)		A- (GG)			A+ (AG + AA)		A- (GG)	
A+ (AG + AA)	03/15	20,0%	02/15	13,3%	A+ (AG + AA)	06/29	20,7%	04/29	13,8%
A- (GG)	07/15	46,7%*	03/15	20,0%	A- (GG)	05/29	17,24%*	14/29	48,3%

Nota. * Proporções estatisticamente diferentes (Teste t para comparação de duas proporções- nível de significância de 5%).

Reis *et al* (2017) também detectaram o envolvimento de polimorfismos do gene da IL17A (-197 A/G) na suscetibilidade à doença de Chagas crônica e no desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia em pacientes brasileiros. Tendo em vista que o alelo A e o genótipo AA (alto produtor) estavam significativamente aumentados nos pacientes com cardiopatia chagásica crônica comparado ao grupo controle, constituído de indivíduos saudáveis com sorologia negativa para *T. cruzi*.

Esses dados são ainda mais curiosos, considerando que a variante alélica A tem sido associada à maior produção da citocina IL-17A, que é uma citocina reconhecidamente pro-inflamatória com papel aventado na defesa de hospedeiros contra patógenos (Revisado por Normanton *et al.*, 2013).

Todavia, o papel da IL-17 na doença de Chagas ainda não está completamente esclarecido. Se por um lado, seu papel inflamatório, induzindo a infiltração celular, a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, e ativação de apoptose em células potencialmente infectadas é bem conhecido (Korn *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2005), por outro lado, é também sugerido que essa citocina possa ter um papel anti-inflamatório, reduzindo a expressão de IL-12 e conseqüentemente a produção de IFN- γ e TNF- α (O'Connor *et al.*, 2009; Guedes *et al.* 2010). Logo, elevados níveis de IL-17A, relacionados ao genótipo A+ (AG ou AA), podem estar contribuindo para níveis mais baixos de IFN- γ , o que pode estar tornado o paciente mais susceptível a reativação.

CAPÍTULO 4- Estudo de mecanismos moleculares envolvidos no tropismo placentário diferencial de populações de *Trypanosoma cruzi*

4.1. Tropismo tecidual

Conforme já mencionado, um dos grandes enigmas na doença de Chagas relaciona-se à variação na prevalência e severidade das diferentes formas clínicas dessa infecção, em diversas regiões da América Latina (Prata, 2001; Macedo & Segato, 2010). Até o momento, nenhuma correlação clara foi estabelecida entre o perfil genético do parasito, as DTUs, o tropismo tecidual diferencial das populações de *T. cruzi* e as manifestações clínicas crônicas da doença. O Modelo Histotrópico-Clonal da doença de Chagas, proposto por nosso grupo, no final da década de 90, buscou explicar essa aparente falta de correlação (Macedo *et al.*, 1998). De acordo com esse modelo, como os métodos de estudos de diversidade genética do *T. cruzi* dependiam do isolamento e manutenção dos parasitos em laboratório, as populações usualmente estudadas poderiam diferir significativamente daquelas realmente presentes na circulação sanguínea do paciente, que, por sua vez, poderiam, por diferença de tropismos, ser distintas daquelas presentes no coração ou outro tecido do mesmo paciente. Isso oferecia uma explicação para a dificuldade de se demonstrar correlação entre a genética do parasito e a forma clínica da doença (Macedo *et al.*, 1998; Macedo *et al.*, 2004; Macedo & Segato 2010).

Nesse contexto, o desenvolvimento da técnica de LSSP-PCR, representou a primeira estratégia de análise dos parasitos presentes diretamente nas lesões de pacientes, na fase crônica da infecção (Vago *et al.*, 1996). Com esta metodologia foi possível caracterizar as populações do parasito presente no coração de pacientes com cardiopatia chagásica e esôfagos de pacientes com a forma digestiva da doença. Em dois casos, onde amostras de coração e esôfago do mesmo paciente foram analisadas, foram observadas diferenças nas populações do parasito presentes em cada órgão (Vago *et al.*, 2000). Esses resultados, além de confirmarem a expectativa teórica contida no Modelo Histotrópico Clonal, da existência de tropismo tecidual diferencial de populações de *T. cruzi*, também previram a relevância deste tropismo na determinação das diferentes manifestações clínicas da doença.

Do ponto de vista da doença de Chagas experimental, diferentes trabalhos também têm contribuído para elucidar a interferência das variações no perfil genético do parasito na distribuição preferencial de populações de *T. cruzi*, e na patogênese da infecção. Por exemplo, estudos de infecção de camundongos BALB/c com mistura de populações de *T. cruzi* pertencentes a diferentes DTUs – TcI (Col 1.7 G2) e TcII (JG) demonstraram a ocorrência de distribuição tecidual diferencial dessas populações (Andrade *et al.*, 1999; 2002).

Por outro lado, estudos posteriores mostraram que a predominância tecidual de cada subpopulação depende tanto da população de *T. cruzi* envolvida, quanto da linhagem de camundongo infectada. Por exemplo, a distribuição tecidual de Col1.7G2 (DTU I) e JG (DTU II) nos camundongos BALB/c e DBA-2, que compartilham mesmo haplótipo H2d, foi a mesma: JG predominou no coração e Col1.7G2 nos demais tecidos analisados, mas especificamente no reto desses animais. Todavia, nos camundongos C57BL/6, cujo haplótipo de MHC é H-2b, distinto dos anteriores, Col1.7G2 predominou em todos os tecidos analisados, sendo JG encontrado, ocasionalmente, no reto dos animais (Andrade *et al.*, 2002).

4.2. Transmissão congênita

A transmissão congênita do *T. cruzi*, continua sendo um problema de impacto na saúde pública, especialmente em áreas endêmicas, onde a transmissão vetorial foi controlada, ou em países não endêmicos, devido a movimentos migratórios (Strasen *et al.*, 2014). Casos de infecção congênita da doença de Chagas já foram descritos no Japão, Estados Unidos e Europa, especialmente na Espanha (Gascon *et al.*, 2010; Imai *et al.*, 2014).

Pesquisas antecedentes encontraram um índice de prevalência de doença de Chagas em gestantes de cerca de 0,1 a 1% no Brasil, 2% a 3% no Chile, 4% a 6% na Argentina, e acima de 12% na Bolívia (Schmunis, 2000; Macedo & Segatto, 2010). A infecção transplacentária por *T. cruzi* tem sido associada a trabalho de parto prematuro, baixo peso ao nascer, e natimortos. Altas taxas de mortalidade e morbidade já foram descritas, mas estudos recentes referem casos congênitos não letais (Carlier & Truyens, 2015; Liempi *et al.*, 2014).

As causas exatas desta disparidade nos riscos de transmissão vertical entre as diferentes regiões e as razões pela qual as manifestações clínicas variam de formas assintomáticas a formas severas e mortais da doença ainda não são claras. Sendo que vários elementos podem estar envolvidos, tais como fatores placentários, intensidade da resposta imune materna e fetal/neonatal, assim como a patogenicidade, o tropismo tecidual e a virulência do parasito (Hermann *et al.*, 2002, 2004, Liempi *et al.*, 2014).

Todas as DTUs de *T. cruzi*, exceto TcIV, já foram identificadas em casos humanos de infecção congênita pelo *T. cruzi* (Revisado por Carlier & Truyens, 2015; Carlier *et al.*, 2015), o que levou alguns autores a concluírem que não haveria uma DTU específica de

T. cruzi na transmissão vertical da doença de Chagas (Virreira *et al.*, 2006, Burgos *et al.* 2007).

Em contrapartida, do ponto de vista experimental, alguns autores sugerem que é possível que DTUs de *T. cruzi* de maior virulência ou parasitemia mais elevadas, possam ser transmitidas mais facilmente através da placenta e/ou ser mais patogênica para o feto (Andrade *et al.*, 1982; Gonzalez *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 2003; Torrico *et al.*, 2005).

Estudos preliminares epidemiológicos de nosso e outros grupos de pesquisa indicam ainda que áreas de alto risco para a transmissão congênita coincidem com regiões de maior prevalência de TcV e TcVI, sugerindo que estas DTUs poderiam estar especialmente associadas a este tipo de transmissão (Valadares, 2007, Dias *et al.*, 2016).

4.3. Justificativa e objetivos

Após o controle da transmissão via vetorial da doença de Chagas outros mecanismos de transmissão, como a transmissão oral ou a via congênita vêm surgindo as principais responsáveis pela transmissão dessa doença nos dias atuais. Em relação à transmissão vertical, diversas questões ainda precisam ser respondidas, tais como, se há DTUs de *T. cruzi* com maior tropismo para os tecidos placentários, e se há variações na expressão gênica do hospedeiro, como resposta biológica à presença da infecção por diferentes DTUs de *T. cruzi* no ambiente placentário, que podem atenuar os riscos de transmissão congênita.

Assim, nesta parte do trabalho, investigamos os efeitos, no ambiente placentário, da infecção de camundongos C57Bl/6J com duas cepas de *T. cruzi* de diferentes DTUs — VD (TcI) e K98 (TcVI) — analisando a expressão gênica e a persistência parasitária neste tecido.

Para isso, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- I- Avaliar se há tropismo tecidual diferencial das populações VD e K98 de *T. cruzi* para os tecidos placentários, na busca de possível associação entre as DTUs do parasito e a transmissão congênita.
- II- Analisar, por meio da estratégia de *microarray*, a cinética da expressão diferencial de mRNAs em placentas de camundongos C57Bl/6J infectados ou não com as cepas VD e K98 de *T. cruzi*, buscando esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na transmissão congênita experimental.

4.4. Material e métodos

Uma parte importante da metodologia usada nesta etapa do trabalho, especialmente aquela associada às análises de *microarray*, foi realizada pelo grupo do Dr. Alejandro Schjiman, no Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET), Buenos Aires, Argentina. Assim, neste capítulo, essa metodologia será apresentada de maneira sucinta. Maiores detalhes poderão ser encontrados no artigo anexo a ele.

4.4.1. Abordagem experimental e coleta de amostras

A estratégia de investigação escolhida foi a realização de estudos *in vivo* e *ex vivo* da variação do perfil de expressão gênica de tecidos placentários de camundongos C57Bl/6J, infectados com cepas VD ou K98 de *T. cruzi*. A infecção pelo *T. cruzi* foi realizada em fêmeas de 6-8 semanas de vida, e a fertilização cerca de 30 dias após a infecção. Um terceiro grupo de fêmeas não infectadas pelo *T. cruzi* foi utilizado como controle. A eutanásia das mães e a retirada dos fetos ocorreu no 19º dia de gravidez, e amostras de sangue materno e tecidos musculares dos fetos foram conservadas em -80°C para posterior extração de DNA e análise por qPCR. As placentas inteiras foram removidas, lavadas exaustivamente com PBS estéril e colocado em solução *RNAlater* (Applied Biosystems, Foster City, CA) até serem utilizadas. Como vestígios de sangue materno e outros tecidos não podem ser descartados como parte das amostras, essas amostras foram denominadas como ambiente placentário.

4.4.2. Estoques de *T. cruzi*

Foram utilizados dois estoques de *T. cruzi*: o clone miotrópico K98 (TcI), uma subpopulação derivada da cepa CA-I, previamente descrita por Mirkin *et al.* (1997) e a cepa VD (TcVI) isolada a partir de um caso de transmissão congênita da Doença de Chagas (Risso *et al.*, 2004). A cepa VD (TcVI) é mais virulenta e alcança seu pico de parasitemia cerca de 18 ± 25 dias após a infecção, enquanto a K98 (TcI) apresenta uma infecção leve e seu pico de parasitemia é ligeiramente retardado.

A identificação da DTU foi realizada seguindo a metodologia descrita por Burgos *et al.* (2007), e a monoclonalidade foi verificada pela análise dos *loci* de microssatélites, conforme descrito por Valadares *et al.* (2007) – Ver Capítulo 2 (item 2.6.2) para maiores informações.

4.4.3. Microarray

Na busca de perfis de expressão gênica, a técnica de *microarray* foi realizada por meio da plataforma de matriz Illumina.

Para a extração de RNA, foram utilizadas amostras do ambiente placentário correspondente a cada um dos fetos. O RNA total foi extraído dos tecidos placentários usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante e tratado com RQ1 RNase Free DNase (Promega, Madison, EUA) e armazenados a -80 °C até serem utilizados. A pureza e integridade do RNA foram avaliadas pelo Espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, EUA), Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA).

4.4.4. Determinação da carga parasitária e caracterização de *T. cruzi* nas amostras

Para a determinação quantitativa de *T. cruzi* presente nas amostras, o DNA do sangue materno, tecidos placentários e fetais foi extraído usando o kit *High Purpose PCR Template Preparation* (Roche Diagnostics Corp), de acordo com instruções do fabricante. A detecção do DNA satélite de *T. cruzi* nas amostras foi realizada por meio de qPCR em tempo real, conforme descrito por Duffy *et. al*, 2013.

A fim de se elucidar se o DNA do *T. cruzi* detectado no ambiente placentário correspondia a parasitas vivos, uma RT-qPCR do gene 18S RNA do *T. cruzi* foi projetada e realizada nestas amostras. Maiores detalhes poderão ser encontrados no artigo anexo a ao capítulo.

4.4.5. Análise de polimorfismo nas assinaturas de kDNA e de polimorfismos de microssatélites

Para a caracterização da diversidade genética das populações de *T. cruzi* presentes nas amostras biológicas foram utilizadas as metodologias de análise LSSP-PCR, também conhecida como assinaturas de kDNA e análise dos polimorfismos de microssatélites.

A análise de polimorfismo nas assinaturas de kDNA das amostras foi realizada conforme descrito por Vago *et al.*, (2000).

Para a amplificação de microssatélites de *T. cruzi* diretamente das amostras de DNA extraído de sangue e tecido dos animais foi utilizada a estratégia de *full-nested* PCR para os *loci* TcTAC15, TcATT14, TcGAG10, TcCAA10 e TcTAT20. A primeira amplificação continha iniciadores externos para cada marcador (Ver Capítulo 2- Tabela 2.1) e foram utilizados 2 µl de DNA obtidos a partir de amostras de sangue e de placenta.

Na segunda etapa foram realizadas PCRs utilizando 1 µl do produto da primeira amplificação como DNA molde e iniciadores localizados mais internamente (Ver Capítulo 2- Tabela 2.1) em relação aos usados na primeira rodada. Cada reação de PCR foi realizada com volume total de 15 µl, usando 1 U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Para a determinação do tamanho dos alelos dos microssatélites, uma alíquota de 0,5 µL dos produtos fluorescentes da segunda rodada de PCR, foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante no sequenciador automático de DNA (A.L.F-GE Healthcare). Os cromatogramas foram editados no programa Allelelocator e os fragmentos amplificados detectados em forma de picos. Os tamanhos dos alelos foram obtidos a partir do alinhamento da corrida com padrões fluorescentes de pesos moleculares conhecidos.

4.5. Resultados e discussão

Nosso objetivo, nesta etapa do trabalho, foi o de investigar aspectos relacionados ao parasito e à resposta de camundongos infectados com diferentes populações de *T. cruzi* pertencentes a duas DTUs (I e VI), especialmente no tocante ao papel desses fatores na susceptibilidade dos camundongos à transmissão congênita.

A genômica funcional é uma ferramenta importante para estudar as interações patógeno-hospedeiro, uma vez que fornece informações importantes sobre os mecanismos moleculares que podem controlar o início da doença. Assim, em colaboração com o grupo de pesquisa do Dr. Alejandro Schijman, Argentina, o presente estudo empregou a abordagem transcriptômica de *microarray* combinada com a análise de redes biológicas para destacar as diferenças entre as respostas do ambiente da placenta murina à infecção por essas duas cepas diferentes de *T. cruzi*.

Usando essa estratégia foram observados no total 247 genes diferencialmente expressos (GDE) — 140 genes superexpressos e 107 genes subexpressos — nos camundongos infectados em relação ao grupo controle. Mais notavelmente nos ambientes placentários de animais infectados com a estirpe VD (211 GDE) comparado àqueles infectados com K98 (89 GDE). Sendo que na infecção com a DTU VI, os genes relacionados a resposta imunoinflamatória tiveram sua expressão aumentada, enquanto os relacionados ao metabolismo celular foram modulados negativamente, o que não foi observado para a DTU I.

Essa forte resposta imune no ambiente placentário gerado em resposta à infecção por VD pode ser resultado do tropismo placentário mais elevado por esta cepa, visto que nossos resultados mostraram que a concentração de DNA, assim como de RNA 18S do *T. cruzi*, no ambiente placentário foi maior nos animais infectados com a cepa VD (TcVI) comparado àqueles infectados com cepa K98 (TcI). Por outro lado, no ambiente sanguíneo, foi encontrada maior concentração de DNA de *T. cruzi* naqueles animais infectados pela cepa K98 (TcI), indicando que a DTU VI possui um tropismo placentário mais forte do que a DTU I, pelo menos para as duas populações utilizadas e para camundongos C57Bl/6J.

Como já abordado, estudos diversos revelam que praticamente todas as DTUs de *T. cruzi*, exceto TcIV, já foram identificadas em casos humanos de infecção congênita. Com base nesses achados, diferentes grupos têm proposto que não há associação de DTUs específicas e a transmissão vertical (Virreira *et al.*, 2006, Burgos *et al.* 2007).

Entretanto, estudos do nosso e outros grupos de pesquisa, envolvendo infecções congênicas em diferentes regiões do Brasil e da Argentina, revelaram que a prevalência de casos congênicos da doença de Chagas em regiões com maior predominância de TcV e TcVI. Por exemplo, no Brasil, a ocorrência de casos de infecção congênita na região Sul, onde predominam estas linhagens é 10 vezes superior àquela encontrada em outras regiões (Valadares, 2007; Dias *et al.*, 2016). Assim, propusemos a hipótese de que a alta frequência de casos congênicos da doença de Chagas nessas áreas endêmicas poderia estar associada com a maior predominância dessas DTUs de *T. cruzi* circulantes nestas regiões. Estes achados podem estar relacionados com o fato de que TcV e TcVI constituem populações híbridas de *T. cruzi* e que promovem uma maior parasitemia nas mães infectadas (Burgos *et al.*, 2007). Isso por si só poderia facilitar a passagem transplacentária do parasito, ocasionando a transmissão vertical da doença de Chagas em neonatos. Além disso, estas populações de *T. cruzi* poderiam apresentar uma maior capacidade de invasão na placenta ou uma maior capacidade de colonização neste tecido (Valadares, 2007; Macedo & Segatto, 2010; Dias *et al.* 2016, Volpato *et al.*, 2017).

Em parte, nossos atuais achados suportam a hipótese de uma associação de DTUs híbridas com o aumento do risco para a transmissão, visto que foi verificado que a cepa mais virulenta (VD – TcVI) apresentou maior concentração de parasito no ambiente placentário. Assim como vale ressaltar que a cepa VD foi isolada de um caso humano de infecção congênita (Risso *et al.*, 2004), reforçando o elevado tropismo dessa cepa e seu possível envolvimento com a transmissão congênita.

Por outro lado, a utilização de qPCR para o DNA satélite de *T. cruzi*, utilizada para quantificar a presença do parasito nas amostras dos fetos, não foi capaz de confirmar a transmissão congênita em camundongos C57Bl/J6 para ambas as cepas utilizadas. Isso sugere que, embora fortemente presente nos tecidos placentários, a estirpe VD não é capaz de causar infecção congênita pelo menos na linhagem de camundongos utilizada. Esses achados também ratificam estudos anteriores que mostram que a transmissão congênita em camundongos é um evento muito raro (Solana *et al*, 2002). Ademais, é razoável supor que alterações na expressão gênica placentária, com aumento de expressão de genes associados à resposta imune nos animais infectados com a estirpe VD possam ter sido determinantes em dificultar a sua transmissão para a prole.

Algumas questões levantadas, foi se as estirpes inicialmente escolhidas para este estudo poderiam ser populações multiclonais e se ao longo do curso de infecção poderiam ter sido selecionadas subpopulações distintas daquelas escolhidas. Para responder a estas questões foram utilizadas duas metodologias desenvolvidas em nosso grupo: as assinaturas de kDNA e a análise de microssatélites.

Todavia, mesmo utilizando essas metodologias sensíveis a pequenas variações genéticas, não foram detectadas diferenças na constituição genética entre as populações do parasito utilizadas para a infecção daquelas presentes nos ambientes sanguíneo e placentário por nenhuma das metodologias utilizadas. De fato nossos resultados demonstraram que as estirpes K98 e VD utilizadas eram geneticamente estáveis e monoclonais, visto que apenas um ou dois alelos foram observados para os *loci* de microssatélites utilizados.

Infelizmente, nesse trabalho, não foi incluído um grupo de camundongos infectados com uma mistura das duas populações, visto que estudos anteriores demonstraram que o comportamento das populações de *T. cruzi*, bem como a resposta dos hospedeiros, pode ser bem diferente, quando misturas de cepas são utilizadas (Andrade *et al*, 1999, 2000; Rodrigues *et al*, 2010). Essa inclusão certamente contribuiria para um melhor entendimento do tropismo tecidual diferencial das duas populações utilizadas, visto que esta seria observada no mesmo animal.

4.6. Publicação da autora relacionada ao capítulo:

Publicação 3- Juiz, N. A.; Solana, M. E.; Acevedo, G. R.; Benatar, A.F.; Ramirez, J. C.; Costa, P.A.; Macedo, A. M.; Longhi, S. A.; Schijman, A, G. Different genotypes of

Trypanosoma cruzi produce distinctive placental environment genetic response in chronic experimental infection. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 11, n. 3, p. 1- 19.

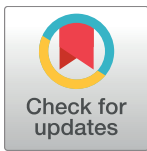
RESEARCH ARTICLE

Different genotypes of *Trypanosoma cruzi* produce distinctive placental environment genetic response in chronic experimental infection

Natalia Anahí Juiz¹, María Elisa Solana², Gonzalo Raúl Acevedo¹, Alejandro Francisco Benatar¹, Juan Carlos Ramirez¹, Priscilla Almeida da Costa³, Andrea Mara Macedo³, Silvia Andrea Longhi¹, Alejandro G. Schijman^{1*}

1 Grupo de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (LaBMECh), Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET), Buenos Aires, Argentina, **2** Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (UBA), Buenos Aires, Argentina, **3** Departamento de Bioquímica e Inmunología, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

* schijman@dna.uba.ar



OPEN ACCESS

Citation: Juiz NA, Solana ME, Acevedo GR, Benatar AF, Ramirez JC, da Costa PA, et al. (2017) Different genotypes of *Trypanosoma cruzi* produce distinctive placental environment genetic response in chronic experimental infection. PLoS Negl Trop Dis 11(3): e0005436. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005436>

Editor: Shan Lv, National Institute of Parasitic Diseases, CHINA

Received: August 29, 2016

Accepted: February 24, 2017

Published: March 8, 2017

Copyright: © 2017 Juiz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The data discussed in this publication have been deposited in the National Center for Biotechnical Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO Series accession number GSE85996 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE85996>).

Funding: The study was done thanks to grants from the Argentinean Ministry of Science and Technology, namely PICT 2014-1188 and PICT

Abstract

Congenital infection of *Trypanosoma cruzi* allows transmission of this parasite through generations. Despite the problematic that this entails, little is known about the placenta environment genetic response produced against infection. We performed functional genomics by microarray analysis in C57Bl/6J mice comparing placentas from uninfected animals and from animals infected with two different *T. cruzi* strains: K98, a clone of the non-lethal myotropic CA-I strain (TcI), and VD (TcVI), isolated from a human case of congenital infection. Analysis of networks by GeneMANIA of differentially expressed genes showed that “Secretory Granule” was a pathway down-regulated in both infected groups, whereas “Innate Immune Response” and “Response to Interferon-gamma” were pathways up-regulated in VD infection but not in K98. Applying another approach, the GSEA algorithm that detects small changes in predetermined gene sets, we found that metabolic processes, transcription and macromolecular transport were down-regulated in infected placentas environment and some pathways related to cascade signaling had opposite regulation: over-represented in VD and down-regulated in K98 group. We also have found a stronger tropism to the placental organ by VD strain, by detection of parasite DNA and RNA, suggesting living parasites. Our study is the first one to describe in a murine model the genetic response of placental environment to *T. cruzi* infection and suggests the development of a strong immune response, parasite genotype-dependent, to the detriment of cellular metabolism, which may contribute to control infection preventing the risk of congenital transmission.

2015-0074, and from the European Union's Research and Innovation funding programme (ERANET-LAC HD 328) to AGS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author summary

Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, remains a problem of global public health impact in endemic areas where vectorial and transfusional transmission have been controlled and in non-endemic countries due to migration movements. Little is known about how the parasite's presence and genetic variability affect placental capacity to protect the fetus. This study explores, for the first time, the effects of placental environment infection by analyzing parasite persistence and gene expression using functional genomics and biological network analyses in mice infected by two strains of *T. cruzi*, with differential capacity of congenital transmission. The infection with the strain with a stronger placental tropism was associated to a higher degree of up-regulation in genes related to innate immunity and response to interferon-gamma. Our findings suggest that the placental environment exerts a strong immune response in detriment of cellular metabolism modulated by the parasite strain. These findings constitute a significant contribution to better understand the mechanisms causing congenital infection of *T. cruzi*.

Introduction

Maternal–fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, remains a public health problem that allows uncontrolled transmission of parasites from one generation to another, in endemic and non-endemic regions. Certainly, cases of congenital *T. cruzi* infection have been described in Japan, USA and Europe, especially in Spain [1, 2]. The risk of transmission is higher in the acute phase because of the great number of circulating parasites, but it may occur at any phase of the maternal disease [3]. Congenital infection has been associated with an increased risk of premature delivery, low birth weight, and more premature ruptures of the amniotic membranes, effects that may be related to placenta inflammation [4]. Studies in mice have reported also infertility and fetal growth retardation, associated or not with congenital infection, in both chronic and acute phase [5, 6, 7].

T. cruzi has been classified in six different discrete typing units (DTUs), named TcI to TcVI, according to biological, biochemical and genetic diversity [8]. Each DTU is formed by several parasite strains which are related to each other based on common molecular markers, but different to strains from other DTUs. These molecular markers currently used to define the *T. cruzi*-DTUs do not focus on the genes responsible for congenital transmission or pathogenicity of the parasite. In addition, except TcIV, the other five DTUs have been identified in human cases of congenital *T. cruzi* infection [3, 9]. Thus, the different genotypes of *T. cruzi* and their population characteristics, as parasite pathogenicity, virulence and tissue tropism may play an important role in congenital infection. However, until now it has not been found differences in the distributions of congenital cases and their respective parasite populations [3, 10–13]. Same genotypes are found in mothers and their infected newborns [11, 12, 14], although it was found a natural selection at clonal level in the parasite populations transmitted to the newborns [10, 12–15]. In murine models, previous studies comparing two different strains (K98 and RA, belonging to TcI and TcVI, respectively) showed differences in inflammatory compromise of the genital tract, the outcome of pregnancy and transmission of congenital infection [16]. Therefore, even though available data in humans suggested no association between particular *T. cruzi* genotypes with congenital infection, these findings cannot be omitted and deserve further study.

Because little is known about the genetic response to the infection by the most important barrier that *T. cruzi* faces to reach the fetus, the placenta, studies in infected mice might be a suitable model for understanding the potential role of *T. cruzi* genotypes on pregnancy and congenital infection.

Functional genomics is an important tool to study host-pathogen interactions, since it gives insight into the molecular mechanisms that control the onset of disease. The present study employed a transcriptomic approach combined with biological network analysis to highlight the differences between the responses of murine placenta environment to infection by two different *T. cruzi* strains, K98 a clone of the non-lethal myotropic CA-I strain, and VD (TcVI), a strain isolated from a human case of congenital infection.

Methods

Ethics statement

Animal care was in accordance with institutional guidelines of the “Asociación Argentina para la Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio” (AACyTAL) and the project was approved by the “Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” (CICUAL) of the School of Medicine, University of Buenos Aires, *Resol* 2426/2015.

T. cruzi stocks

Two *T. cruzi* stocks were used: the myotropic clone K98 (TcI), a subpopulation derived from the CA-I strain, previously described by Mirkin [17] and, the monoclonal strain VD (TcVI) isolated by Risso from a case of congenital Chagas’ disease [18]. These two strains have polar phenotypes: VD is more virulent and reaches its peak of parasitemia at 18–25 after infection whereas K98 displays a mild infection and its parasitemia peak is slightly delayed. Moreover, VD shows a slender shape in the bloodstream stage while K98 shows a stumpy shape [18]. DTU identification was done following the methodology reported by Burgos and coworkers [12] and monoclonality was verified by analysis of microsatellite loci as described Valadares and coworkers [19].

Experimental approach and sample collection

C57Bl/6J mice were supplied by the animal facilities of Facultad de Ciencias Exactas y Naturales and were housed at the Department of Microbiology, School of Medicine, University of Buenos Aires, respectively. To obtain chronically infected mice, 4 inbred females between 6 and 8 weeks old were inoculated by the intradermoplantar (idp) route with 500 bloodstream trypomastigotes of K98 or with 50 bloodstream trypomastigotes of VD, because higher inocula of VD are lethal for this mouse strain by the intraperitoneal route [18]. Parasitemia was measured weekly by counting in a Neubauer chamber the number of parasites obtained from the tail vein blood diluted (1/10) in red blood cell lysis solution (Tris-NH₄ Cl 0.83% pH 7.2). Chronic phase was considered when no parasites were detected in chamber (around 3 weeks post-infection). At day 30 post-infection two females were housed with 1 uninfected male per cage. To assess the day of fertilization, the vaginal plug was macroscopically searched [16], being the day of vaginal plug appearance considered as day 0.5 of pregnancy. A third group of 4 uninfected females of the same age and weight were used as control.

On day 18.5±1 of pregnancy, dams were euthanized and samples of maternal blood were taken by cardiac puncture and stored in EDTA solution until processed. The fetuses were withdrawn and samples from skeletal muscle were conserved at –80 °C, for DNA extraction and qPCR analysis.

Finally, entire placentas from the naturally mated crosses were removed, thoroughly washed with sterile PBS and placed in RNAlater solution (Applied Biosystems, Foster City, CA) until used. As traces of maternal blood and other tissues such as decidua cannot be discarded as part of the samples, we have termed them as placental environment.

Microarray

We analyzed total RNA from placental environments (the most proximal placentas from uterine horn of each dam were selected) for global gene expression via the Illumina array platform and using the mouse WG-6 v2.0 Expression BeadChip, service provided by Macrogen, Seoul, Korea.

Microarray data analysis

Two approaches were performed, the Over-Representation Analysis and the Gene Set Enrichment Analysis [20]. Statistical significance of the expression data was determined using LPE test and fold change (FC) in which the null hypothesis was that no difference exists among groups. False discovery rate (FDR) was controlled by adjusting p value using Benjamini-Hochberg algorithm. Gene-Enrichment and Functional Annotation analysis for significant probe list was performed using DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). The free and open-source gene function prediction service, GeneMANIA (<http://www.genemania.org>), was used along with the widely used large-scale network visualization and integration tool, Cytoscape [21] to formulate and visualize the resultant integrated gene network. A gene set analysis using the GSEA package Version 2.0 [22, 23] from the Broad Institute (MIT, Cambridge, MA) was also used to analyze the pattern of differential gene expression between the two groups. Gene set permutations were performed 1000 times for each analysis. The normalized enrichment score (NES) was calculated for each gene set. GSEA results with a nominal $p < 0.05$ were considered significant. Biological process of GO was the pathway database used (<http://geneontology.org/>).

Microarray validation

To validate the results of the microarray, two placentas from each dam (one already used in the microarray assay) were analyzed by means of RT-qPCR, as described below (total sample size = 8 placentas/ group). The number of genes analyzed and the selection criteria followed the recommendations previously described [24, 25] in microarray analyses in order to obtain a good correlation between microarray findings and RT- qPCR data: 14 genes exhibiting at least 1.4 fold change and a p-value ≤ 0.0001 (*Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl7*, *Cd274*, *Cd3d*, *Cd8b1*, *Edn2*, *Gbp2*, *Gbp3*, *Gzmd*, *Igtp*, *Irgb10*, *Irgm1*, *H2-Aa*, *H2-Eb1*). *Cxcl1* and *S100a9* were chosen because these genes were among the few ones up-regulated in K98 group and *Gbp6* because it is involved in the secretory granule pathway. The expression levels were normalized to *Gapdh*. Primer sequences are listed in S1 Table. Moreover, in order to test expression at protein level, Western Blot was performed for CXCL1 and CD274 proteins. Briefly, placentas were homogenized in buffer 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4 (TBS) in the presence of 0.1% SDS and a protease inhibitor kit (Complete Mini EDTA-free, Roche, Germany). The homogenates were centrifuged at 17,000×g for 10 minutes at 4°C to remove insoluble material. Protein concentration of supernatants was determined by Bradford reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and equal amount of protein (100 µg per lane) was resolved on a 10% SDS-PAGE. After blotting and blocking of nitrocellulose membranes with TBS, 0.1% Tween 20 (TBS-T) 3% BSA, they were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-CXCL1 polyclonal Ab 1:2000 (PAI-2920, Thermo Fischer, Rockford, IL, USA) or rat anti-CD274 monoclonal Ab 1:1000 (10F.9G2, Bio X Cell, West Lebanon, NH, USA) in TBS-T 1% BSA. Blots were then incubated

with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG 1:3000 (Vector Labs, UK) or horseradish peroxidase-conjugated anti-rat IgG 1:3000 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), respectively. Immunoreactive proteins were revealed by enhanced chemiluminescence (Pierce ECL-Plus, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) according to manufacturer's instructions. The bands were scanned and quantified using ImageJ software (version 1.410).

To probe same membranes with rabbit anti-GAPDH monoclonal Ab 1:5000 (14C10, Cell Signalling, Boston, MA, USA) as a loading control, the membranes first were incubated in stripping buffer (200 mM Glycine-HCl pH 2.2, 0.1% SDS, 1% Tween 20) twice for 10 minutes at room temperature while shaking, washed with TBS-T, and then blocked and immunodetected as describe above.

Determination of *T. cruzi* loads and characterization

DNA from maternal blood, placental and fetal tissues was extracted using the High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics Corp., Indiana, USA) following manufacture instructions.

Total RNA was extracted from placentas using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to manufacturer's instructions, treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, USA) and stored at -80°C until used. RNA purity and integrity were evaluated by ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, USA), Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA).

Determination of Satellite *T. cruzi* DNA loads in maternal, placental and fetal samples was performed by means of quantitative Real Time PCR, as previously reported [26] and normalized with murine β -Actin DNA (housekeeping gene) in the same sample (β -ACT Fw: 5' CGGAACCGCTCATTGCC 3' and β -ACT Rv: 5' ACCCACACTGRGCCCATCTA 3'). Results were expressed as relative amplification respect to that of β -Actin DNA fragment.

Detection of Satellite *T. cruzi* DNA in fetal samples was performed by qualitative Real Time PCR [26] without using a standard curve for quantification.

The presence of viable parasites in placental tissue was evaluated by amplification of 18S *T. cruzi* RNA. For this purpose, 1 μg of RNA per sample was reversed transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase kit and random primer (Life technologies, Ontario, Canada). Reactions for quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) were prepared with 0.15 μM forward and reverse primers (18S Fw: 5' TGGAGATTATGGGGCAGT 3' and 18S Rv: 5' GTTCGTCTTGGTGCGGTCTA 3'), 1X FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostics Corp., Indiana, USA) and each of the diluted template cDNAs (1:100 in DNase free water). RT-qPCR was analyzed on the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System using following cycling conditions, as recommended by the manufacturer (Applied Biosystem, California, USA): 95°C 10 min; 5 cycles of 95°C for 15 sec and 64°C 1 min, 35 cycles of 95°C for 15 sec and 63°C 1 min; melt from 60 to 95°C rising at 0.2°C per second. *Gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was used as internal control to normalize mRNA levels using the following primers: GAPDH Fw: 5' ACTCCCACTCTTCCA 3' and GAPDH Rv: 5' TCCACCACCCTGTTG 3' and the standard curve method was applied.

Analysis of minicircle signatures and microsatellite loci polymorphism

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)-PCR profiling was performed as described by Burgos [12] with 1 μg of purified minicircle amplicons that were digested with 1 U of MspI + RsaI + HinfI restriction enzymes for 4 h at 37°C . The digestion products were visualized after 10% PAGE and SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stained (Invitrogen, Eugene, Oregon). Markers of 10 and 25 bp, DNA Step Ladder (Promega, Madison, USA), were included in runs.

Full nested-PCR targeted to sequences flanking microsatellite repeats for the loci TcTAC15, TcATT14, TcGAG10, TcCAA10 and TcTAT20, were carried out as previously described [19]. Each PCR was performed in a total volume of 15 μ L using 1 U of Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The first PCR rounds were carried out using 2 μ L of DNA obtained from blood and placental tissue samples, whereas for the second PCR rounds 1 μ L of the amplified products obtained in the first PCR round were used as DNA template. Amplifications were performed in a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). To determinate the allele sizes, 0.5 μ L of PCR fluorescent products were analyzed in 6% denaturing polyacrylamide gels of an ALF DNA sequencer (GE Healthcare, Milwaukee, WI) and compared with fluorescent DNA fragments of 75–320 bp using Allelelocator software (GE Healthcare).

Statistics

Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 6.01 and InfoStat version 2015. (<http://www.infostat.com.ar>). Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis with multiple comparisons were employed for comparison between two groups and among three groups, respectively.

Accession numbers

The data discussed in this publication have been deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO Series accession number GSE85996 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE85996>).

Results

Analysis of differential placental gene response to *T. cruzi*

We performed a microarray analysis to screen for genes whose expressions were altered in the placental environment upon infection with K98 or VD strains. Two different approaches were faced in order to determine the pathways involved. The first approach was “Over-Representation Analysis”, intended to detect protein and gene interactions. This analysis statistically evaluates the fraction of genes of a particular pathway among the complete set of genes that show changes in expression. The second approach used was “Gene Set Enrichment Analysis” (GSEA), which detects small changes in predetermined gene sets, in order to identify significant enrichment pathway-level effects. It was used to perform Gene Ontology (GO) analysis with those gene sets derived from the “Biological Process Ontology”.

Over-representation analysis. The microarray analysis from C57Bl/6J mice between infected groups and the uninfected control group rendered a total of 247 differentially expressed genes (DEGs), with a fold change $|FC| \geq 1.5$ and a significance level ≤ 0.05 (S2 Table). Out of them, 140 genes were up-regulated and 107 were down-regulated (Fig 1, S3 and S4 Tables). The greatest fold differential expressions encountered were a 17-fold up-regulated *Cxcl9*, a T-cell chemoattractant which is induced by IFN- γ , inVD and a 4-fold down-regulated *Tph1* gene, which codifies for an isoenzyme of tryptophan hydroxylase in K98.

A stronger response to infection was observed in those placental environments from animals infected with VD strain, with 211 DEGs, than in those infected with K98, with only 89 DEGs (Fig 1). Fifty three DEGs compared with the control group were shared between both infected groups (Fig 1). However, there was an opposite effect in animals infected by both tested strains: while 69% (59/89) of genes were down-regulated by K98 infection, VD was able to produce this effect on 39% (83/211) of them compared with uninfected animals.

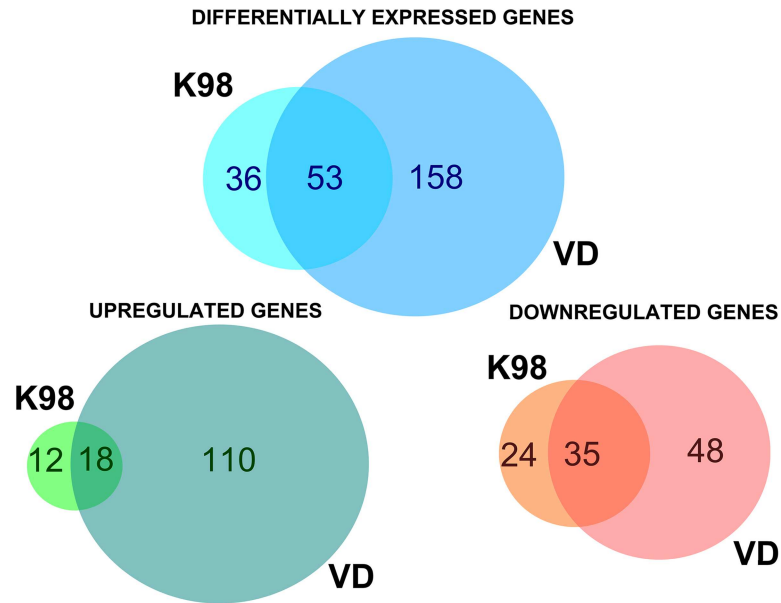


Fig 1. Venn diagrams analysis. Numbers embedded in each complete circle denote the total numbers of DEGs of the indicated infected groups in comparison to the uninfected control group; those in the overlapping region depict the number of shared genes between the two conditions.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005436.g001>

Analysis using GeneMANIA function prediction service was performed along with the widely used large-scale network visualization and integration tool, Cytoscape, in order to formulate and visualize the resultant integrated gene network with genes with $|FC| \geq 1.5$. The colocalization, co-expression, shared pathways, protein domains and genetic, physical and predictive interactions of DEGs in K98 and VD infected groups compared with the control group are shown in Fig 2.

Among the networks predicted by GeneMania, Fig 3 illustrates the “Secretory granule”, “Innate Immune Response” and “Response to Interferon-gamma”. The “Secretory Granule” was a down-regulated pathway respect to control in both VD and K98 groups (q-value = 0.02). *Serpina5*, *Gzmd*, *Gzmg* and *Scgb1a1* are genes which transcription was negatively affected by the infection by both strains. Only a single gene related to this network encoding *Il-1β* was up-regulated in VD group related to the uninfected animals. IL-1β is produced in activated macrophages and is an important mediator of the inflammatory response involved in a variety of cellular activities, including cell proliferation, differentiation, and apoptosis. The gene *Cuzdl1*, which has been found to play a role in the uterus during late pregnancy, was the only gene down-regulated in K98 but not in VD when compared to controls (Fig 3).

“Response to Interferon-Gamma” (q-value = 2.40×10^{-2}) and “Innate Immune Response” (q-value = 4.90×10^{-2}) were detected after analysis of DEGs in VD but not in K98 group (Fig 3).

Moreover, “Response to Interferon-Beta” (q-value = 3.17×10^{-3}) and “Antigen Processing and Presentation” (q-value = 1.85×10^{-4}) among others were also detected in VD but not in K98 group in the comparison against the control group. IFN-γ and IFN-β and Innate Immune Response pathways shared *H2-Aa*, *H2-Ab1*, *H2-Eb1* genes, while networks of response to IFN-γ and IFN-β shared additional genes: *Gbp2*, *Gbp3*, *Gbp6*, *Irf1*, *Irg1*, *Ifitm3* and *Stat1*. Considering the network of response of IFN-γ, all eleven genes up-regulated in VD group displayed a higher transcription FC compared with the uninfected mice. The only gene with positive FC

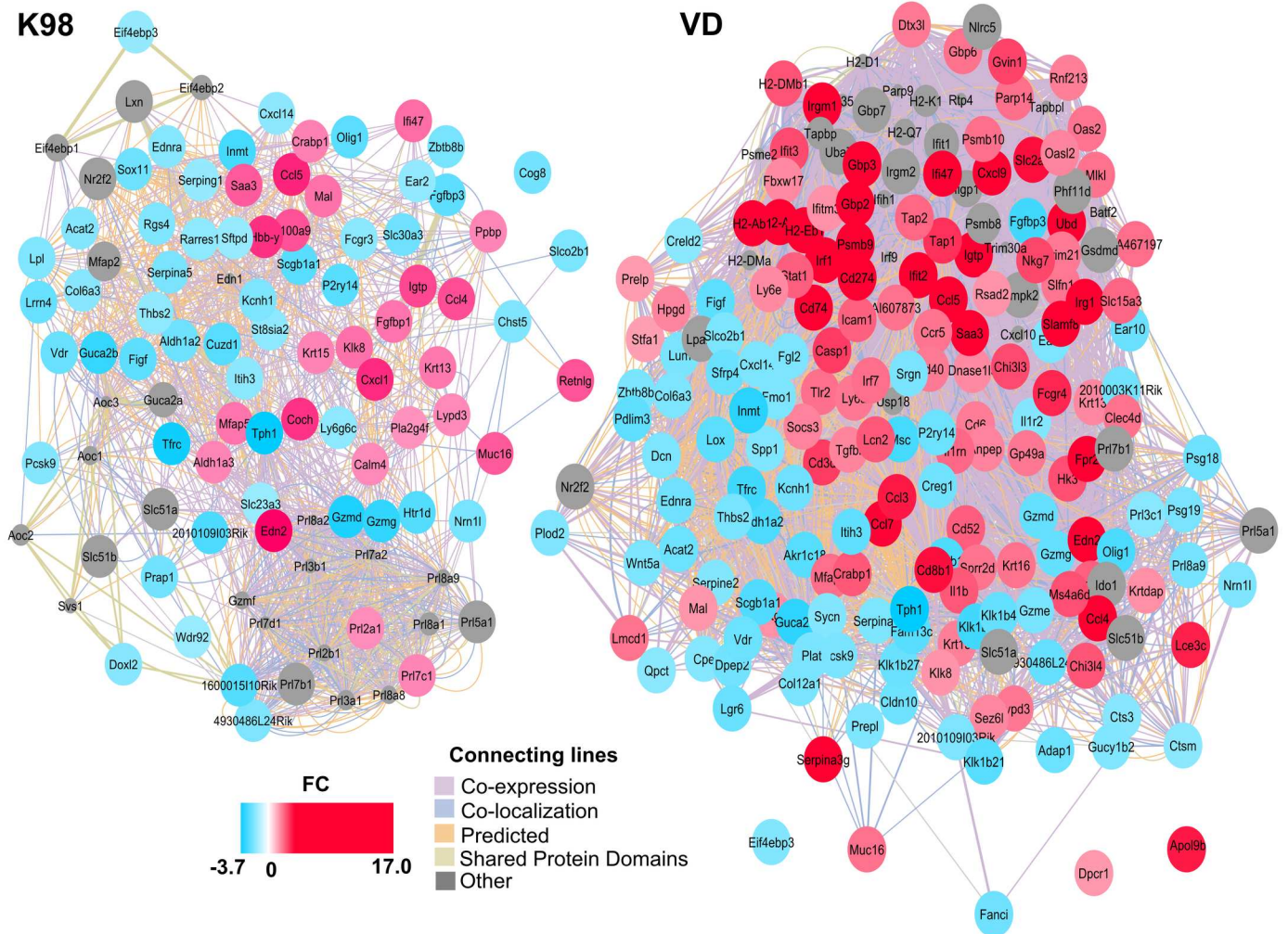


Fig 2. The interaction networks for DEGs between K98 and VD infected groups compared with the control groups predicted by GeneMania and visualized in Cytoscape. Genes/proteins are depicted as colored circles and indicated by the color scheme, where shades in red correspond to $FC > 1.5$, shades in light blue correspond to $FC < -1.5$ and gray circles are other genes/proteins related to these DEGs, but not found in the microarray. Experimentally detected associations between genes/proteins are shown as connecting lines.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005436.g002>

related to IFN- γ response in K98 group was *Ccl5* ($FC = 3.11$, $p < 0.0001$); however this FC increased to 8.57 ($p < 0.0001$) in VD, showing a clear stronger effect of this strain in the latter.

Furthermore, the “Innate Immune Response” network showed an up-regulation of most genes in VD group (Fig 3). Interestingly, two genes had a negative rate of transcription respect to control: the gene *Wnt5a* in VD group ($FC = -1.80$, $p = 0.010$), which is implicated in several developmental processes, including regulation of cell fate and patterning during embryogenesis and the gene *Serping1* in K98 group ($FC = -1.63$, $p = 0.040$). This gene encodes a highly glycosylated plasma protein involved in the regulation of the complement cascade.

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). For this approach two parameters were taken into account, 1) The Normalized Enrichment Score (NES): the degree to which each gene set is over-represented, comparing each infected group (K98 and VD) with the uninfected control group at the top or bottom of the ranked list of genes in the expression dataset, after being normalized across analyzed gene sets; and 2) False Discovery Rate (FDR) q-value: the estimated probability that the NES may represent a false positive finding.

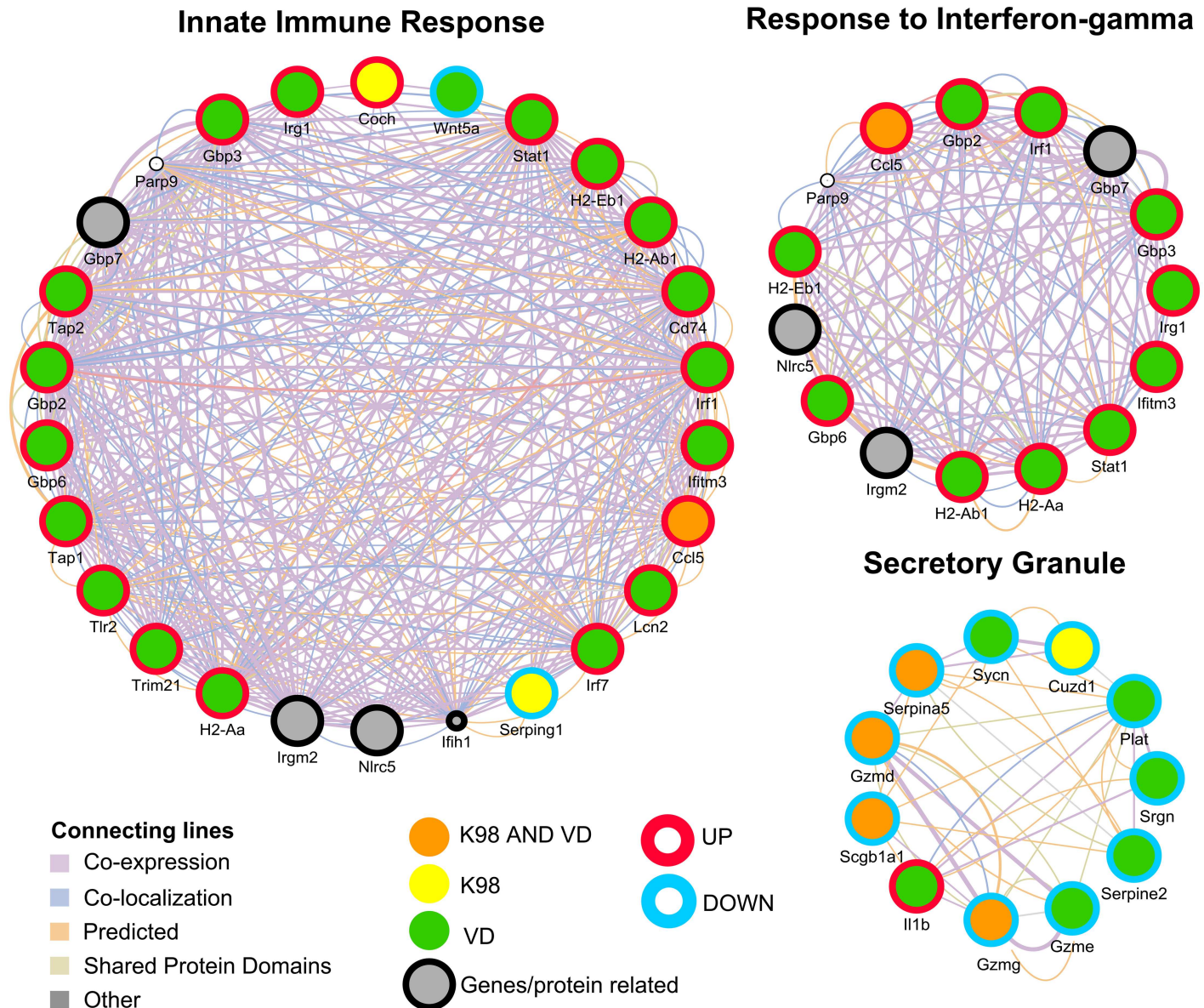


Fig 3. Visualization of three networks for DEGs between K98 and VD infected groups compared with the control group as predicted by GeneMania: “Innate Immune Response”, “Response to Interferon-gamma” and “Secretory Granule”. Genes/proteins are depicted as colored circles, where yellow indicates a DEG in K98 group, green in VD group and orange in both K98 and VD groups. The color of border lines indicates up-regulation (red) or down-regulation (light blue) and gray circles are other genes/protein related but not found in the microarray. Experimentally detected relationships between genes/proteins are shown as connecting lines.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005436.g003>

Several pathways involved in metabolic processes and macromolecular transport were found to be down-regulated in both infected groups (Fig 4, S5 and S6 Tables). Among metabolic processes, the three following ones were down-regulated in both K98 and VD infected groups: “Lipid Metabolic Process” (NES = -3.79 and -3.42, respectively; FDR.q.val < 0.0001), “Carbohydrate Metabolic Process” (NES = -3.55 and -3.46, respectively; FDR.q.val < 0.0001) and “Proteolysis” (NES = -2.96 and -2.86, respectively; FDR.q.val < 0.0001). With respect to macromolecular transport, “Intracellular Transport” was one of the down-regulated processes in both infected groups (K98: NES = -1.99 and FDR.q.val = 0.003; VD: NES = -2.8 and FDR.q.

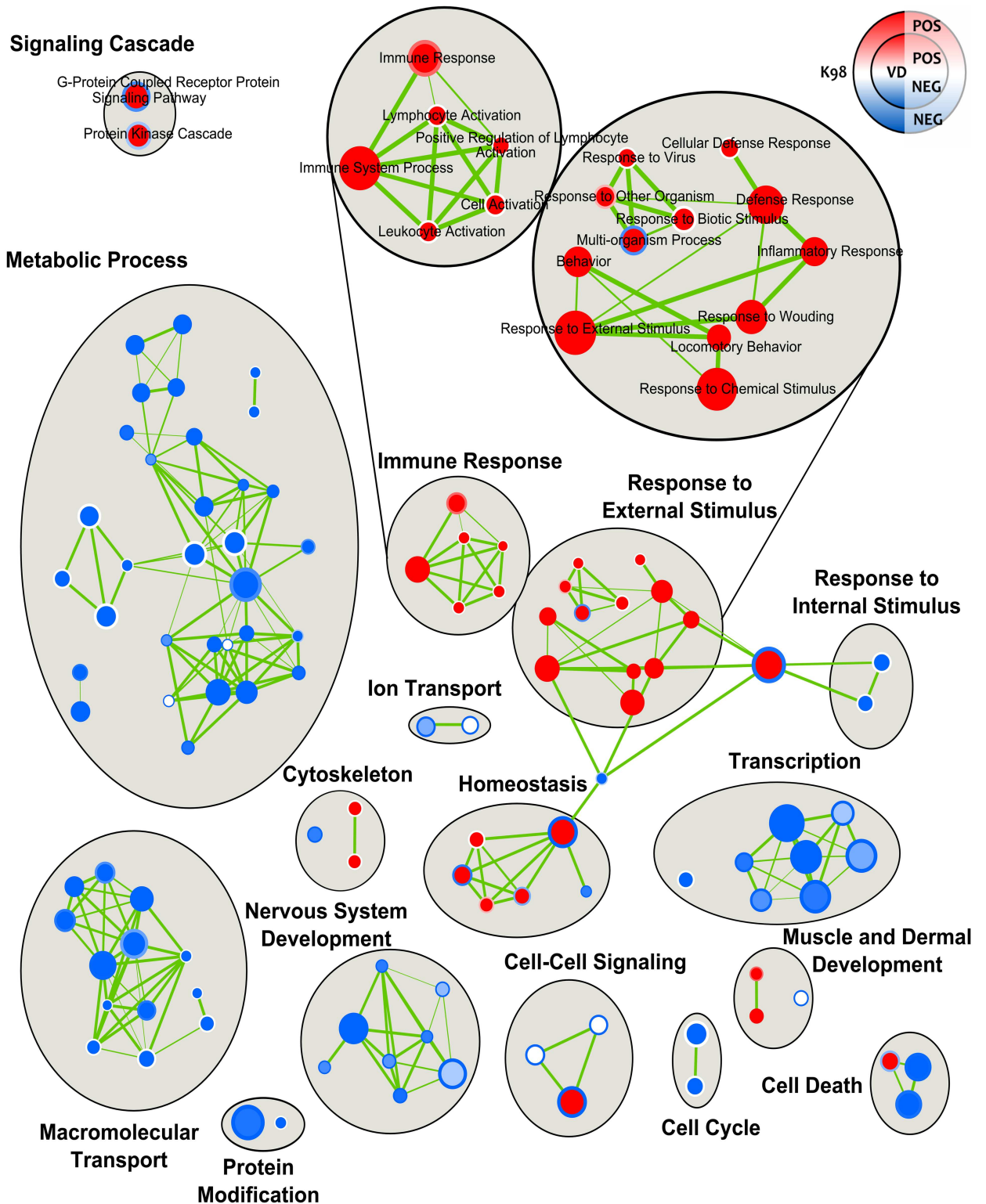


Fig 4. Enrichment map of the placental environment response to infection by *T. cruzi*. The Enrichment Map arranges enriched gene-sets as a similarity network, where nodes correspond to gene-sets and links correspond to overlap of member genes. The network was manually rearranged to improve layout, and major clusters were manually labeled. Predicted pathways are depicted as circles, where shades in red correspond to up-regulated gene-sets and shades in light blue correspond to down-regulated gene-sets. The filling color corresponds to VD group and the border line color to K98 group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005436.g004>

val = 0.0001). Transcription was also affected negatively by *T. cruzi* infection, being some of the most representative pathways “Regulation of Transcription DNA-Dependent” (K98: NES = -2.67 and FDR.q.val = 0.001; VD: NES = -2.01 and FDR.q.val = 0.022) and “Regulation of RNA Metabolic Process” (K98: NES = -2.67 and FDR.q.val = 0.001; VD: NES = -2.13 and FDR.q.val = 0.013).

Moreover, a negative regulation of cell death processes was observed in both infected groups with two pathways down-regulated: “Regulation of Programmed Cell Death” (K98: NES = -1.80 and FDR.q.val = 0.057; VD: NES = -2.18 and FDR.q.val = 0.011) and “Regulation of Apoptosis” (K98: NES = -1.80 and FDR.q.val = 0.058; VD: NES = -2.20 and FDR.q.val = 0.010).

A markedly positive regulation of “Immune System Process” was associated with infection by both strains (K98: NES = 2.05 and FDR.q.val = 0.049; VD: NES = 4.15 and FDR.q.val = 0.0001). However, the immune response was stronger in VD group showing up-regulation of the pathways “Leukocyte Activation” (NES = 2.48 and FDR.q.val = 0.006), “Cell Activation” (NES = 2.43 and FDR.q.val = 0.008) and “Lymphocyte Activation” (NES = 2.38 and FDR.q.val = 0.009). For “External Stimulus”, an opposite result was observed in “Multi-organism Process”, up-regulated in VD (NES = 2.70 and FDR.q.val = 0.002) and down-regulated in K98 (NES = -1.77 and FDR.q.val = 0.065). “Cellular Defense Response” was also a pathway overrepresented in VD (NES = 3.29 and FDR.q.val <0.0001) but not in K98.

Certain pathways related to homeostasis were differentially represented between infected groups. For example, NES for “Homeostasis Process” was negative in K98 (-1.85 and FDR.q.val = 0.05), whereas it was positive in VD (2.41 and FDR.q.val = 0.0085). Other gene sets with differential representation between infected groups were those related to signaling pathways: “G-Protein Coupled Receptor Protein Signaling Pathway” (K98: NES = -2.02 and FDR.q.val = 0.027; VD: NES = 2.683 and FDR.q.val = 0.003) and “Protein Kinase Cascade” (K98: NES = -1.55 and FDR.q.val = 0.146; VD: NES = 2.338 and FDR.q.val = 0.010). Finally, the biological process “Cell-Cell Signaling” (K98: NES = -2.42 and FDR.q.val = 0.004; VD: NES = 2.46 and FDR.q.val = 0.007), as well as “Negative Regulation of Developmental Process” (K98: NES = -1.62 and FDR.q.val = 0.114; VD: NES = 2.22 and FDR.q.val = 0.016) were down-regulated in K98 but up-regulated in VD.

Microarray validation. To confirm the findings from the microarray assay, a subset of 18 genes were selected for validation at the mRNA and/or protein levels. RT-qPCR analysis (S1 Fig) demonstrated that infection with both strains of *T. cruzi* resulted in increased expression of *Ccl4* and *Edn2* genes compared with control ($p = 0.0014$ and $p = 0.0111$, respectively), whereas *Gzmd* was down-regulated in both infected groups ($p = 0.0047$). *Cxcl1* and *S100a9* were up-regulated in K98 but not in VD infected samples when normalized to control group ($p = 0.0413$ and $p = 0.0074$, respectively). Consistently with the microarray data, the following genes were up-regulated in VD but not in K98 groups, when the expression levels were normalized to control group: *Cd3d* ($p \leq 0.0001$), *Cd8b1* ($p = 0.0005$), *Gbp2* ($p = 0.0009$), *Gbp3* ($p = 0.0249$), *Gbp6* ($p = 0.0052$), *H2-Aa* ($p = 0.0019$), *H2-Eb1* ($p = 0.0039$), *Igtf* ($p = 0.0002$), *Irgb10* ($p = 0.0023$), *Irgm1* ($p = 0.0005$) genes. Although no differential expressions of *Ccl7* and *Cd274* was found using Mann-Whitney test ($p = 0.1877$ and $p = 0.0648$, respectively), Kruskal-Wallis analysis comparing the three groups showed a greater level of expression in VD group ($p = 0.0070$ and $p = 0.0015$, respectively) compared with the control.

Protein expression levels were also examined by Western blot for CXCL1 and CD274 proteins (S2 Fig). According to microarray and RT-qPCR experiments, a major expression of CXCL1 was observed in K98 group compared with VD ($p < 0.01$) and control groups ($p < 0.05$). Moreover, the expression level of this protein in VD infected mice was lower than in the control group, but this difference was not significant (S2 Fig).

In the other hand, the microarray assay could detect differences in VD but not in K98 in the expression of *Cd274* gene, however by Western blot and RT-qPCR, samples from both infected mice expressed comparable protein levels of CD274 and higher than control mice ($p < 0.01$) (S2 Fig). These data confirmed that mRNA expression changes observed upon *T. cruzi* infection were associated with parallel changes at the protein level.

Characterization of parasitic burden in placental environment vs maternal blood stream

We aimed to find out whether the differential gene expression detected in the placental environment of infected animals with VD and K98 strains was associated with organ parasite persistence. Indeed, parasite burden in VD infected animals was two times higher (Log (median) = 3.134; $Q_1 = 3.04$ and $Q_3 = 3.37$) than those from K98 infected mice (Log (Median) = 1.554; $Q_1 = 0.94$ and $Q_3 = 1.93$) ($p = 0.0002$) (Fig 5c). The median logarithmic parasitic loads observed in maternal blood where 1.965 ($Q_1 = 1.84$ and $Q_3 = 2.00$) for K98 and 1.058 ($Q_1 = 0.82$ and $Q_3 = 1.10$) for VD ($p = 0.029$) (Fig 5a). In K98 group, the parasite load in dams'

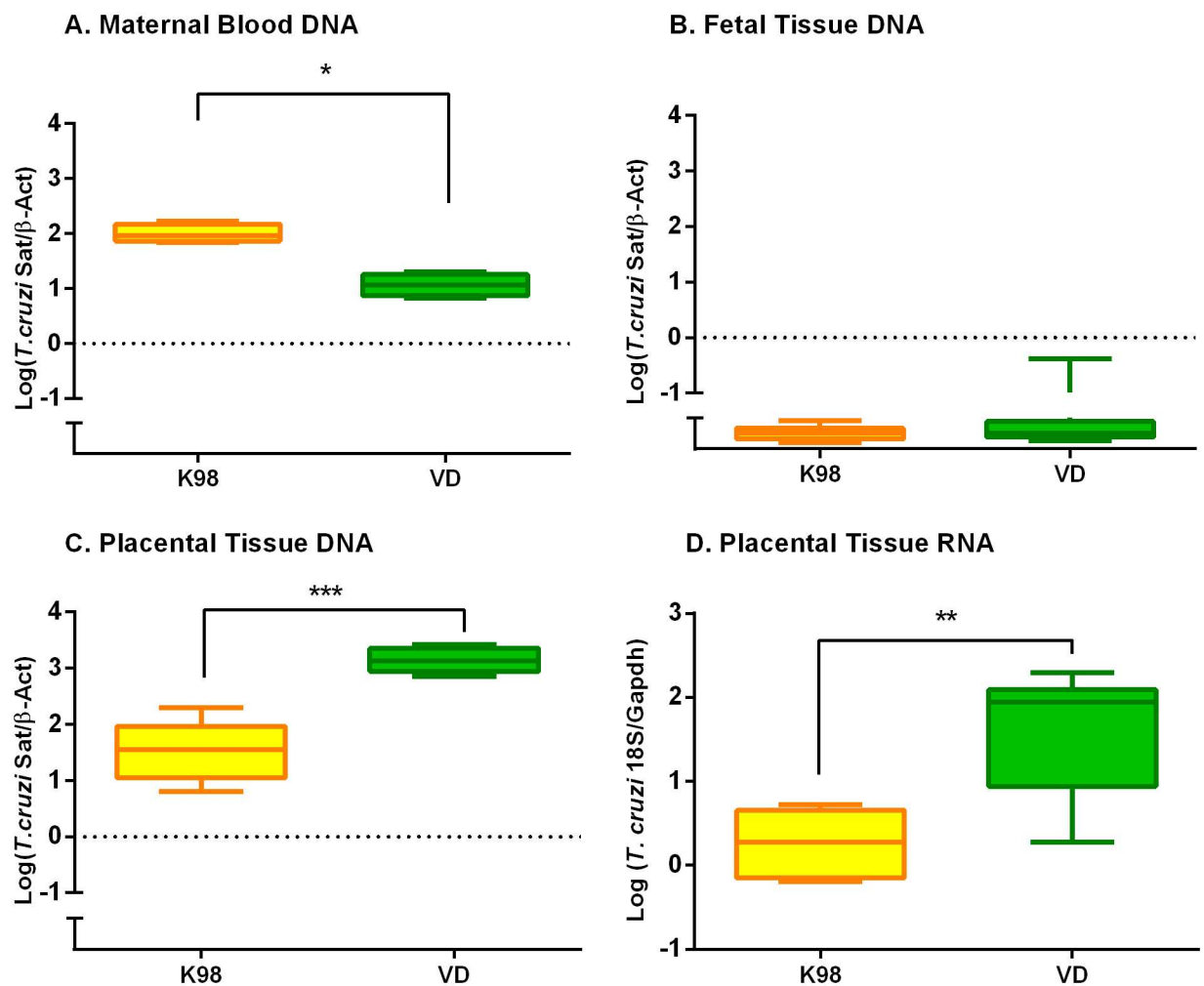


Fig 5. *T. cruzi* VD strain displayed a higher placental tropism than K98. The parasite load was quantified by Real Time amplification of Satellite DNA in: (A) maternal blood; (B) fetal tissues and (C) placental environment, normalized with mouse β -Actin DNA. (D) The detection in placental environment of *T. cruzi* gene expression was analyzed by RT-qPCR targeted to the parasite 18S RNA and normalized with mouse *Gapdh* RNA in K98 and VD groups. *** $p < 0.0001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005436.g005>

blood compared with that detected in placental environment was approximately three times higher, whereas in VD group the increment was 120 times higher than in bloodstream, suggesting placental tropism of VD ($p < 0.0001$).

In order to elucidate if *T. cruzi* DNA detected in the placental environment corresponded to living parasites and not to mere DNA, RT-qPCR of *T. cruzi* 18S RNA gene was designed and performed in these samples (Fig 5d). RT-qPCR results were in agreement with those observed in DNA samples from infected mice; in fact the expression level of *T. cruzi* 18S RNA in these samples infected with VD were significantly higher (Log (Median) = 1.941, $Q_1 = 0.78$ and $Q_3 = 2.06$) than in K98 group (Log (Median) = 0.275, $Q_1 = -0.18$ and $Q_3 = 0.49$) ($p = 0.002$), confirming placental tissue preferential site for VD spreading.

Minicircle signatures were characterized in bloodstream and placental environment (Fig 6). They showed identical intra-group profiles with Jaccard's coefficients (JD) of 0 for K98 and VD in all tested paired samples ($n = 8$ for K98 and VD), and clearly distinctive for each strain group (inter-group JD = 0.875). Microsatellite loci polymorphism analysis confirmed the monoclonality of the parasite strains and showed identical profiles between paired bloodstream-placental samples (S7 Table).

PCR-based analysis of skeletal tissues from fetuses of infected dams

We analyzed by qualitative Real Time-PCR skeletal tissue samples from fetuses withdrawn from dams infected by both parasite stocks ($N = 27$ and $N = 24$ from K98 and VD groups,

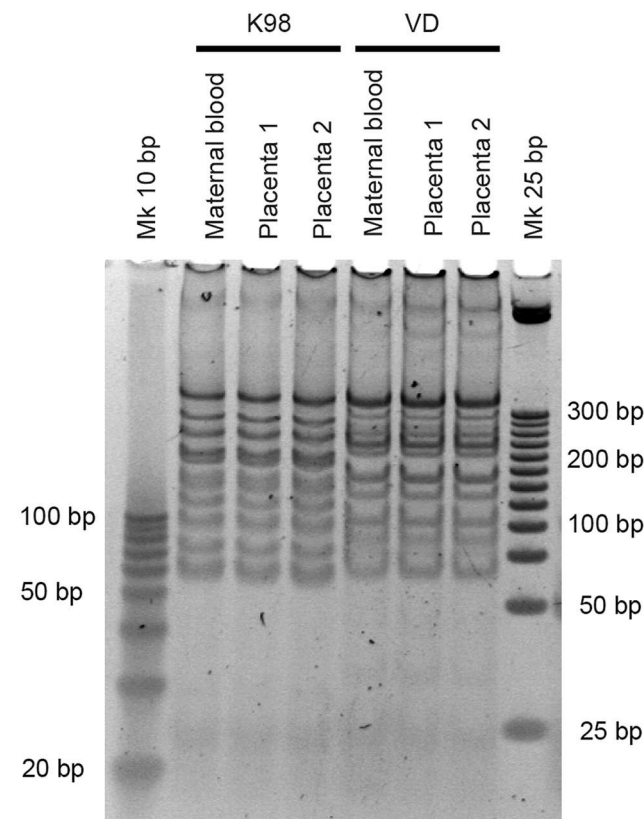


Fig 6. Examples of minicircle signatures by restriction fragment length polymorphism of maternal and placental parasite populations for K98 and VD groups. Minicircle signatures were visualized after 10% PAGE and SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stained. Molecular weight markers of 10 and 25 bp were included.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005436.g006>

respectively), obtaining detectable amplification in all samples, though with Ct values between 35 and 40 in all samples, indicative of very low parasitic burden. Furthermore, the fetuses belonging to the eight placentas used in the microarray validation experiments were tested by qPCR (Fig 5b). These samples presented median logarithmic values of parasitic load significantly lower than those obtained in placental tissues and maternal blood of both infection groups ($p < 0.001$ for both groups and tissue types; Fig 5). These findings suggest contamination with DNA traces from maternal tissues rather than congenital infection.

Discussion

Chagas disease is a problem of global public health impact and congenital (mother to child) infection is a remaining problem in endemic countries and the most common form of transmission in non-endemic regions. Host response against *T. cruzi* infection is still being investigated and little is known about how the presence of this parasite affects the placenta that usually represents a barrier for *T. cruzi* to reach the fetus during pregnancy. Several difficulties arise when studying the association between *T. cruzi* genotypes and risk of congenital infection and the placental genetic response: small sample volume of neonatal blood, small sample sizes (as a result of reduced transmission rate), low sensitivity of conventional diagnostic and genotyping methods, and deficient follow-up [27]. In the present study, we explored the effects of the infection in the placental environment with two different genotypes of *T. cruzi*, by analyzing gene expression and parasite persistence in a murine model using microarray analysis. Several genes were affected in their expression levels, up and down, in association to infection and more remarkably in VD group, perhaps as a result of the higher placental tropism displayed by this strain. The present study also combined this transcriptomic approach with biological network analyses to highlight the differences between the responses of murine placental environment to the infection with different *T. cruzi* genotypes.

Our first approach of Over-Representation Analysis evaluated the fraction of genes in a particular pathway found among DEGs with $FC \geq |1.5|$. One of the down-regulated networks shared by both infected groups was the “Secretory Granule”, in which granzymes play a fundamental role. A down-regulation of these proteins has been observed in fetal NK cells of umbilical cords from newborns congenitally infected with *T. cruzi* as a mechanism of modulating the immune response [28]. These might be one of the multiple strategies to escape or modulate antigen presentation and T-cell-mediated anti-*T. cruzi* response of the host leading to intracellular parasite persistence during chronic infection. It has been described that the maternal CD8 T-cell response to placental antigens and to pathogen antigens are independent pathways [29], so the up-regulation of several genes that participate in events of antigenic processing and presentation in the placental environment during VD infection, might indicate that it displays all its weapons to defend the fetus from infection. The IFN- γ response, an essential mechanism to control survival and proliferation of intracellular pathogens, was another up-regulated network observed in VD group. Among the up-regulated genes involved in that network, three members of the guanylate binding protein family (GBPs), showed FCs higher than 2. Interestingly, although it is known that *T. cruzi* and *Toxoplasma gondii*, both intracellular protozoans and producers of congenital infections, have different mechanisms of cellular invasion, it has been reported that *T. gondii* produces a recruitment of GBPs in vacuoles and, each GBP has a specific role in resistance, also depending on the virulence of the strains involved [30, 31].

We have performed another approach with a hypothesis of functional class scoring, since great changes in individual genes may have significant effects on pathways but also weaker and coordinated changes in sets of functionally related genes (i.e., pathways) can have significant impact. Applying GSEA and using the dataset of Biological Process of GO, we found that

metabolic processes as well as transcription and macromolecular transport were in general down-regulated in the placental environment of infected animals and these data are consistent with fetal growth retardation observed in mice from dams infected by *T. cruzi* [5, 32].

Mammalian cell invasion by *T. cruzi* requires cell signaling and the pathways induced may be different depending on the parasite strain [33]. It has been reported that inhibition of protein kinases significantly inhibits the infection of macrophages by *T. cruzi* [34] and also the pro-kineticin receptors in mammalian cells, which are G protein-coupled receptors [35]. Moreover, it has been described an activation of host protein kinase C by RA strain (TcVI) that favors infection [36]. In this study, we found that *T. cruzi* infection by different genotypes had a distinct effect on protein kinase cascade as well as on the signaling pathway of G-protein coupled receptor protein, up-regulated by VD and down-regulated by K98 infected samples. So, the negative regulation of these pathways could explain the lower levels of placental infection observed in K98 group. Likewise, positive regulation by VD could explain the found high parasite loads.

Another interesting finding of our analysis was the down-regulation of apoptosis observed in the placental environment of animals infected by both strains. This prevention of apoptosis might be a mechanism used by the parasite to persist all along infection, reducing potential damage, as observed in cardiomyocytes [37].

Different placental tropism of *T. cruzi* strains has been described [38]. Our results show that VD displays stronger placental tropism than K98 strain, revealed as an increased in the amount of parasitic burden and 18S RNA expression there compared with dams' blood parasitic loads. It is worth mentioning that VD strain was isolated from a human case of congenital infection [18]. In dams infected with K98, higher levels of bloodstream parasites were observed at around 48 days post-infection compared with mice infected with VD. This is in agreement with findings in C3H/HeN female mice infected with K98 (44 days post-inoculation) that showed higher parasitemias than mice infected with RA [16]. No significant differences in parasite burden were observed for K98 parasites in dams' blood and the placenta, suggesting poor tropism, in contrast to VD, demonstrated by both qPCR and RT-qPCR, although a higher duplication rate in VD might not be discard. Both K98 and VD stocks were monoclonal, so no differences in genetic constitution between parasite populations were detected in bloodstream and placental environment by means of minicircle signatures and microsatellite *loci* polymorphism analyses (Fig 6 and S7 Table).

In order to detect congenital infection, we analyzed by qPCR fetuses from dams infected by both parasite strains, obtaining very low parasitic burden in all tested samples from both infection groups, below maternal bloodstream and placental loads (Fig 5a and 5b). This was indicative of DNA contamination from maternal tissues rather than of true congenital infection. In fact, K98 has been demonstrated not to cause congenital transmission in mice [16]. In agreement with our findings, it has been reported that PCR positivity in pups close to delivery may not be reliable [7]. Besides, we have tested by qPCR one month-old pups born to dams infected with the VD stock, with negative results, demonstrating no congenital infection (unpublished results). Altogether, these observations are in agreement with previous studies showing that congenital transmission in mice is a very rare event; changes in placental gene expression driven by *T. cruzi* infection appear efficient to control the parasite, precluding congenital transmission.

The placenta is a complex environment where mother and fetus coordinately interact and, during an infection, the presence of the pathogen adds complexity by altering the immunoregulatory circuits. To our knowledge, the present study is the first one to describe the genetic response of this environment to *T. cruzi* infection and reveals host pathways leading to generate a strong immune response, in order to limit the risk of congenital infection, to the

detriment of cellular metabolism. Moreover, we have found that this effect may be modulated by the parasite genotype. New studies to deepen insight in this host response, at both the genetic and protein level, are necessary to better understand the mechanisms causing congenital infection of *T. cruzi*.

Supporting information

S1 Table. Primers used in RT-qPCR for validation of microarray results.

(PDF)

S2 Table. Fold change and adjusted p-values from microarray analysis.

(PDF)

S3 Table. Genomania results for K98 group.

(PDF)

S4 Table. Genomania results for VD group.

(PDF)

S5 Table. Go-biological process with FDR.q.val < 0.05 found by GSEA analysis in K98 group.

(PDF)

S6 Table. Go-biological process with FDR.q.val < 0.05 found by GSEA analysis in VD group.

(PDF)

S7 Table. Examples of microsatellite identification of *T. Cruzi* isolates from maternal and placental populations in mice infected with K98 and VD genotypes. The table shows only the polymorphic loci.

(PDF)

S1 Fig. Validation of microarray by RT-PCR. The expression levels of the selected genes were expressed as logarithms of fold change in arbitrary units (Log (FC)) normalized to *Gapdh*. Red symbols represent placenta samples used in microarray assay and black symbols represent independent samples. The line for each of the scatters represents the median value and significance obtained by Mann-Whitney test was indicated as follows: **** $p < 0.00001$; *** $p < 0.0001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

(TIF)

S2 Fig. Validation of microarray by western blot. Immunoblot analysis of CXCL1 and CD274 in placentas samples from K98, VD and control groups. Immunoreactive protein bands were quantified by densitometry. Results are expressed as arbitrary units (AU), related to GAPDH. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis with multiple comparisons.

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

(TIF)

Acknowledgments

We thank Animal Care Technicians Verónica Ríos and Valeria Cardozo for mouse mating screening and Soraia de Oliveira Silva for technical assistance. We thank Dr Ulrike Kemmerling and Ana Liempi (Faculty of Medicine, University of Chile) for histopathological analysis of placental specimens.

Author Contributions

Conceptualization: NAJ MES AGS.

Formal analysis: NAJ GRA AFB JCR SAL.

Funding acquisition: MES AGS.

Investigation: NAJ MES GRA AFB JCR SAL AGS.

Methodology: NAJ MES AFB JCR PAdC SAL.

Project administration: AGS.

Resources: MES AMM AGS.

Supervision: AGS.

Visualization: NAJ SAL AGS.

Writing – original draft: NAJ MES SAL AGS.

Writing – review & editing: NAJ MES SAL AGS.

References

1. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2010 Jul-Aug; 115(1–2):22–7. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.019> PMID: 19646412
2. Imai K, Maeda T, Sayama Y, Mikita K, Fujikura Y, Misawa K, et al. Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2014. 20,146–148. <https://doi.org/10.3201/eid2001.131071> PMID: 24378113
3. Carlier Y, Truyens C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop.* 2015 Nov; 151:103–15. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.016> PMID: 26293886
4. Cevallos AM, Hernández R. Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:401864. <https://doi.org/10.1155/2014/401864> PMID: 24949443
5. Carlier Y, Rivera MT, Truyens C, Puissant F, Milaire J. Interactions between chronic murine *Trypanosoma cruzi* infection and pregnancy: fetal growth retardation. *Am J Trop Med Hyg.* 1987 Nov; 37(3):534–40. PMID: 3120608
6. Mjihdi A, Lambot MA, Stewart IJ, Detournay O, Noël JC, Carlier Y, Truyens C. Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *Am J Pathol.* 2002 Aug; 161(2):673–80. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64223-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64223-X) PMID: 12163392
7. Cencig S, Coltel N, Truyens C, Carlier Y. Fertility, gestation outcome and parasite congenital transmissibility in mice infected with TcI, TcII and TcVI genotypes of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Jun 13; 7(6):e2271. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002271> PMID: 23785533
8. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Nov; 104(7):1051–4. PMID: 20027478
9. Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015 May; 110(3):363–8. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140405> PMID: 25760448
10. Virreira M, Alonso-Vega C, Solano M, Jijena J, Brutus L, Bustamante Z, et al. Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75, 871–879. PMID: 17123980
11. Virreira M, Truyens C, Alonso-Vega C, Brutus L, Jijena J, Torrico F, et al. Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 77,102–106. PMID: 17620638
12. Burgos JM, Altchek J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital

- Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 2007; 37, 1319–1327. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.015> PMID: 17570369
13. Corrales RM, Mora MC, Negrette OS, Diosque P, Lacunza D, Virreira M, et al. Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 2009; 9, 278–282. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.12.008> PMID: 19162237
 14. Llewellyn MS, Messenger LA, Luquetti AO, Garcia L, Torrico F, Tavares SB, Cheaib B, Derome N, Delepine M, Baulard C, Deleuze JF, Sauer S, Miles MA. Deep sequencing of the *Trypanosoma cruzi* GP63 surface proteases reveals diversity and diversifying selection among chronic and congenital Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Apr 7; 9(4):e0003458.
 15. Bisio M, Seidenstein ME, Burgos JM, Ballering G, Risso M, Pontoriero R, et al. Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: prospective polymerase chain reaction study in pregnancy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2011; 105, 543–549. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.07.003> PMID: 21803389
 16. Solana ME, Celentano AM, Tekiel V, Jones M, González Cappa SM. *Trypanosoma cruzi*: effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome. *J Parasitol.* 2002 Feb; 88(1):102–6. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0102:TCEOPS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0102:TCEOPS]2.0.CO;2) PMID: 12053948
 17. Mirkin GA, Celentano AM, Malchiodi EL, Jones M, González Cappa SM. Different *Trypanosoma cruzi* strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. *Clin Exp Immunol.* 1997 Feb; 107(2):328–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1997.267-ce1166.x> PMID: 9030871
 18. Risso MG, Garbarino GB, Mocetti E, Campetella O, Gonzalez Cappa SM, Buscaglia CA, et al. Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J Infect Dis.* 2004 Jun 15; 189(12):2250–9. <https://doi.org/10.1086/420831> PMID: 15181573
 19. Valadares HM, Pimenta JR, de Freitas JM, Duffy T, Bartholomeu DC, de Paula Oliveira R, et al. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int J Parasitol.* 2007 Nov 7.
 20. Khatri P, Sirota M, Butte AJ. Ten Years of Pathway Analysis: Current Approaches and Outstanding Challenges. Ouzounis CA, ed. *PLoS Computational Biology.* 2012; 8(2):e1002375. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002375> PMID: 22383865
 21. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003 Nov; 13(11):2498–504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303> PMID: 14597658
 22. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet.* 2003 Jul; 34(3):267–73 <https://doi.org/10.1038/ng1180> PMID: 12808457
 23. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003 Nov; 13(11):2498–504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303> PMID: 14597658
 24. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological Procedures Online.* 2006; 8:175–193. <https://doi.org/10.1251/bpo.126> PMID: 17242735
 25. Miron M, Woody OZ, Marciel A, Murie C, Sladek R, Nadon R. A methodology for global validation of microarray experiments. *BMC Bioinformatics.* 2006 Jul 5; 7:333. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-333> PMID: 16822306
 26. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(1):e2000. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002000> PMID: 23350002
 27. Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015 Aug; 13(8):995–1029. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1056158> PMID: 26162928
 28. Hermann E, Alonso-Vega C, Berthe A, Truyens C, Flores A, Cordova M, et al. Human congenital infection with *Trypanosoma cruzi* induces phenotypic and functional modifications of cord blood NK cells. *Pediatr Res.* 2006 Jul; 60(1):38–43. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000220335.05588.ea> PMID: 16690951
 29. Tay C-S, Tagliani E, Collins MK, Erlebacher A. Cis-Acting Pathways Selectively Enforce the Non-Immunogenicity of Shed Placental Antigen for Maternal CD8 T Cells. Zenclussen AC, ed. *PLoS ONE.* 2013; 8(12):e84064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084064> PMID: 24391885
 30. Virreira Winter S, Niedelman W, Jensen KD, Rosowski EE, Julien L, Spooner E, et al. Determinants of GBP recruitment to *Toxoplasma gondii* vacuoles and the parasitic factors that control it. *PLoS One.* 2011; 6(9):e24434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024434> PMID: 21931713

31. Yamamoto M, Okuyama M, Ma JS, Kimura T, Kamiyama N, Saiga H, et al. A cluster of interferon- γ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 2012 Aug 24; 37(2):302–13. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.009> PMID: 22795875
32. Truyens C, Mijhdi K, Lambot MA, Rivera MT, Noël JC, Carlier Y. [Effects of acute and chronic *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant mice]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38 Suppl 2:68–72.
33. Maeda FY, Cortez C, Yoshida N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in Immunology*. 2012; 3:361. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00361> PMID: 23230440
34. Vieira MC, de Carvalho TU, de Souza W. Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Sep 15; 203(2):967–71. PMID: 8093081
35. Khusal KG, Tonelli RR, Mattos EC, Soares CO, Di Genova BM, Juliano MA, et al. Prokineticin receptor identified by phage display is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* into mammalian cells. *Parasitol Res*. 2015 Jan; 114(1):155–65. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4172-6> PMID: 25324134
36. Belaunzarán ML, Wainszelbaum MJ, Lammel EM, Gimenez G, Aloise MM, Florin-Christensen J, et al. Phospholipase A1 from *Trypanosoma cruzi* infective stages generates lipid messengers that activate host cell protein kinase c. *Parasitology*. 2007 Apr; 134(Pt 4):491–502. Epub 2006 Nov 23. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001740> PMID: 17121684
37. Petersen CA, Krumholz KA, Carmen J, Sinai AP, Burleigh BA. *Trypanosoma cruzi* infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. *Infect Immun*. 2006 Mar; 74(3):1580–7. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1580-1587.2006> PMID: 16495529
38. Andrade SG. The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1982; 76(1):123–8. PMID: 6805103

CAPÍTULO 5- Considerações finais

Este ano comemora-se 110 anos da descoberta da doença de Chagas (Chagas, 1909). E mesmo tendo se passado mais de um século, esta parasitose ainda representa um sério problema de saúde pública em 21 países da América Latina, onde estima-se que 5,7 milhões de pessoas estão infectadas (1,2 milhões no Brasil) (WHO 2010; 2015). Ademais, devido à crescente mobilidade das pessoas no mundo, e a possibilidade de transmissão por meio de transfusão de sangue, doação de órgãos de pessoas contaminadas e transmissão congênita, relatos de pessoas infectadas em regiões não endêmicas na América do Norte e na Europa têm se avolumado (Strasen *et al*, 2014).

Por conseguinte, a doença de Chagas ainda é uma doença de significativa morbidade e mortalidade. Cerca de 25-30% dos infectados evoluem para a forma mais grave da doença, levando à morte de 12.000 indivíduos por ano, com 6.000 apenas no Brasil (Martins-Melo *et al.*, 2014, Dias *et al* , 2016).

A insuficiência cardíaca é a principal causa de morte em decorrência de complicações da doença de Chagas, e embora no passado o paciente cardiopata chagásico fosse considerado contraindicado para o transplante cardíaco, atualmente, este é um procedimento de rotina para tratamento de pacientes chagásicos com insuficiência cardíaca em fase terminal, tornando-se a terceira principal indicação para o transplante cardíaco no país (Bocchi *et al.*, 1996; 2001a).

O Brasil tem ocupado cada vez mais destaque no campo dos transplantes, principalmente na América Latina, além de ser referência no transplante cardíaco de etiologia chagásica, guiando condutas que são incorporadas no mundo todo (Bacal *et al.*, 2009). E neste aspecto, o Hospital das Clínicas da UFMG representa um dos importantes centros brasileiros especializados em transplante cardíaco e, de uma maneira especial, em transplantes de pacientes chagásicos crônicos. De fato, o primeiro transplante cardíaco realizado no HC-UFMG, em julho de 2006, foi em um paciente chagásico, e somente entre os anos 2008-2018, foram realizados 280 transplantes cardíacos neste centro, sendo mais de 40% deles em pacientes portadores de cardiopatia de etiologia chagásica.

É preciso reconhecer que um marco importante para o sucesso do transplante de órgãos no mundo foi a introdução de drogas imunossupressoras. Todavia, o tratamento imunossupressor, que é essencial no período pós-cirúrgico para controlar a rejeição do órgão transplantado, leva ao comprometimento das defesas imunológicas do organismo, podendo aumentar a probabilidade de infecções, incluindo a reativação da doença de Chagas (Bochi *et al.* 1996, Schijman, *et al.*, 2000; Souza *et al.* 2001; Bestetti *et al.* 2007).

Advém que o diagnóstico diferencial de rejeição do transplante e reativação da infecção chagásica ainda é uma tarefa complexa para os clínicos acompanhando os pacientes chagásicos transplantados, dificultando muitas vezes a escolha correta do tratamento: intensificação do tratamento imunossupressor ou introdução da quimioterapia específica anti-*T. cruzi*. Além disso, o motivo pelo qual alguns dos pacientes cardiopatas chagásicos submetidos ao transplante cardíaco apresentam a reativação da doença, enquanto outros não o fazem, também é desconhecido.

De maneira similar, tampouco são esclarecidos os fatores que determinam as diferentes manifestações clínicas dos pacientes ou que os predispõem à transmissão oral, vertical, à resistência à quimioterapia específica, dentre outros aspectos. Nesse sentido, uma das questões mais intrigantes na doença de Chagas continua sendo a variação na prevalência e na severidade das diferentes formas clínicas dessa infecção, em diversas regiões endêmicas (Zingales *et al.*, 2012; Brenière *et al.*, 2016). As causas desta heterogeneidade epidemiológica e patológica não estão esclarecidas, mas um papel relevante da diversidade genética de populações do *T. cruzi* e outros fatores associados ao hospedeiro são aventados (Miles *et al.*, 1977; Macedo *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2003; Macedo *et al.*, 2004).

Nesse cenário, decidimos, no presente trabalho, investigar alguns desses aspectos moleculares potencialmente associados à patogênese da doença de Chagas, em especial aqueles envolvidos na cardiomiopatia chagásica grave e na reativação da infecção em pacientes chagásicos submetidos a transplante cardíaco no HC-UFMG. Paralelamente a esse estudo translacional, realizamos também análise de alguns fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro durante a transmissão congênita experimental da infecção por *T. cruzi*.

Para isso, o presente trabalho foi organizado em quatro objetivos principais abordados separadamente em cada um dos capítulos precedentes desta tese.

No Capítulo 1, nosso objetivo principal foi o de investigar a possibilidade de se utilizar metodologias baseadas em PCRs direcionadas para dois marcadores - um nuclear (rDNA 24S α) e um mitocondrial (kDNA) - para diagnóstico precoce da presença do *T. cruzi* em corações de pacientes chagásicos transplantados.

Nossa expectativa, era de obtermos uma metodologia simples, sensível e específica capaz de oferecer aos médicos uma alternativa confiável para o diagnóstico diferencial entre a rejeição do transplante e a reativação da infecção pelo *T. cruzi*, antes do aparecimento dos primeiros sinais clínicos dessa reativação. O racional por trás deste

objetivo, foi que se o tratamento quimioterápico específico anti-*T. cruzi* pudesse ser administrado tão logo o diagnóstico molecular fosse confirmado, o controle da parasitemia e do parasitismo celular poderia ser alcançado mais rapidamente e os sinais clínicos da reativação poderiam ser eventualmente evitados; melhorando-se, assim, o bem-estar e o prognóstico dos pacientes transplantados. A alternativa que seria tratar profilaticamente todos os pacientes chagásicos transplantados poderia submeter cerca de 30-40% desses pacientes já debilitados a um tratamento desnecessário que apresenta toxicidade para os pacientes (**PUBLICAÇÃO 1** – Costa *et al.*, 2017).

De fato, dos 98 pacientes cardiopatas chagásicos transplantados no HC-UFGM entre 2008 e 2018, acompanhados pelo presente estudo, 66% tiveram pelo menos um episódio de reativação chagásica após o transplante cardíaco durante o período do estudo, podendo chegar em até cinco episódios. Em média, a primeira reativação clínica ocorreu após sete meses da cirurgia, sendo que 3/4 dos pacientes apresentaram reativação em até 8 meses após transplante. No presente trabalho, denominamos esse grupo de pacientes, que reativaram a infecção dentro desse período, de grupo de reativação precoce. Nossos resultados indicam ser esta a fase de maior risco para a reativação da doença de Chagas após o transplante.

Do ponto de vista das principais manifestações clínicas associadas à reativação, a forma cutânea (51%), seguida da cardíaca (42%), foi a mais prevalente. Além dessas, 6% dos pacientes apresentaram reativação neurológica, sendo que 15% apresentaram dois ou mais tipos de manifestação clínica, ou subclínica.

A alta incidência de pacientes chagásicos crônicos imunossuprimidos com desenvolvimento de lesões cutâneas ratifica achados antecedentes (Almeida *et al.* 1996, Amato *et al.*, 1997; D'Avila *et al.*, 2005; Gallerano *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010; Kocher *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2016). Tomados em conjunto, esses resultados nos permitem sugerir que, à semelhança da forma nervosa, talvez essa seja uma nova forma clínica da doença de Chagas, uma vez que, diversos casos de aparecimento de lesões cutâneas têm sido relatados como expressão da reativação do parasitismo pelo *T. cruzi* em pacientes chagásicos após transplante (Costa *et al.*, artigo em preparação).

Tendo observado que quase 70% dos pacientes transplantados acompanhados neste trabalho reativaram clinicamente a doença de Chagas, uma das questões levantadas foi a respeito do nível de imunossupressores na circulação destes pacientes, e se este nível poderia constituir um fator de distinção entre os pacientes que apresentaram episódios de reativação clínica e aqueles que não apresentaram. Todavia, todos os pacientes demonstraram níveis

considerados dentro da normalidade, independente do grupo com ou sem reativação. Entretanto, quando comparados os tipos de imunossuppressores utilizados pós-transplante e a reativação chagásica, foi possível observar que enquanto 90% dos pacientes (37/41) em uso de ciclosporina apresentaram reativação, a proporção de reativação entre os pacientes em uso de tacrolimus foi de 53% (27/51), sendo essas proporções estatisticamente diferentes ao nível de $P \leq 5\%$.

De fato, já é de conhecimento da comunidade médica, que protocolos de imunossupressão realizados antes de 1992, que incluíam altas doses de ciclosporina e a sustentação de altas doses de esteroides pós-transplante de pacientes cardiopatas chagásicos estão associados a um maior risco de reativação, quando comparados aos protocolos posteriores que recomendavam doses mais baixas de ciclosporina e redução rápida dos esteroides (Fiorelli *et al.*, 2011).

Contudo, apesar da alta taxa de reativação observada em nosso grupo de estudo, durante os 10 anos acompanhamento, apenas dois pacientes tiveram o seu óbito relacionado à reativação ou outras complicações associadas à doença de Chagas, mostrando que a mortalidade diretamente relacionada à reativação da infecção pós-transplante é baixa e que há adequada sobrevida em longo prazo. Na verdade foi observada uma boa taxa de sobrevivência para toda a coorte de pacientes transplantados chagásicos e não-chagásicos, sendo estimada em cerca de 70% em 10 anos. Ademais não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a sobrevivência pós-transplante cardíaco para pacientes chagásicos em relação às outras causas de cardiopatia, constituindo-se maior que 80% no primeiro ano e maior que 75% no segundo ano para ambos os conjuntos de pacientes. Resultados similares foram obtidos comparando a sobrevivência dos pacientes com e sem reativação, quando também não encontramos diferença estatisticamente significativa para os dois grupos, sugerindo que mesmo em casos de reativação chagásica, se os pacientes são rapidamente tratados, a sobrevivência pós-transplante cardíaco é alta.

Devido à importância da introdução rápida do tratamento quimioterápico anti-*T. cruzi*, nos casos de reativação chagásica em pacientes chagásicos transplantados, diversos grupos de pesquisa têm buscado desenvolver e aperfeiçoar estratégias complementares de diagnóstico, capazes de distinguir a rejeição do enxerto cardíaco da reativação chagásica pós-transplante. E, neste aspecto, já está bem difundido na literatura as potencialidades das técnicas moleculares, especialmente aquelas baseadas em PCR (Sturm *et al.*, 1989; Avila *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 1999; Schijman, *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 2004; Diez *et al.*, 2007; Benvenuti *et al.*, 2011). Assim, foi neste

entendimento que avaliamos, inicialmente, a utilidade de duas estratégias de PCRs, direcionadas para o gene rDNA 24Sα e as regiões variáveis dos minicírculos da rede de kDNA, para diagnóstico precoce da presença do *T. cruzi* em corações de pacientes chagásicos transplantados.

No conjunto, foram analisadas, por essas duas estratégias, mais de mil amostras de tecidos de pacientes, entre biópsias endomiocárdicas, de pele e de SNC, oriundas de 98 pacientes chagásicos submetidos a transplante cardíaco e acompanhados no HC-UFMG entre os anos de 2008 e 2018. Essa é uma coorte impressionante, e dentro do nosso conhecimento, única. A presença de DNA de *T. cruzi* foi detectada em 21% dessas amostras (205 BEMs, oito biópsias de pele e três biópsias de SNC), obtidas de 70 pacientes que apresentaram algum resultado positivo para pelo menos um dos testes moleculares realizados para diagnóstico. Desses pacientes, apenas 23 (33%) apresentaram ninhos de amastigotas nas análises por histológica convencional (HE).

Uma questão que surge naturalmente é se o alto número de pacientes considerados positivos pelas PCR representa de fato pacientes com reativação da infecção ou resultam de artefatos falso-positivos frequentemente atribuído a esse tipo de abordagem (Castro *et al.*, 2002; Virreira *et al.*, 2003; Benvenuti *et al.*, 2011). Todavia, do total de pacientes com pelo menos um resultado positivo de PCR, 51 (73%) já apresentaram ao menos um episódio de reativação clínica da doença de Chagas ao decorrer dos anos de acompanhamento. Se retirarmos do restante, aqueles pacientes que faleceram por causas estranhas à doença de Chagas (4 pacientes), e que em decorrência deste fato não puderam continuar sendo avaliados clinicamente, restam apenas 15 pacientes da coorte com PCR positiva e ainda sem sinal de reatividade clínica. Esses resultados são bastante significativos e demonstram boa associação — cerca de 79% — entre os resultados gerados pelo diagnóstico molecular e a ocorrência de reativação clínica da doença, em algum momento após o transplante.

Ademais, há uma razoável concordância entre aqueles pacientes que apresentam PCR positiva já nas primeiras seis biópsias, com aqueles que reativam a infecção mais precocemente (**PUBLICAÇÃO 1** – Costa *et al.*, 2017). E se apenas essas primeiras BEMs tivessem sido analisadas, ainda assim a metodologia de PCR proposta neste trabalho teria sido capaz de detectar positividade em 73% dos pacientes que apresentaram alguma PCR positiva e 65% daqueles que reativaram clinicamente a doença. Esses resultados sugerem que a realização do diagnóstico molecular apenas nas primeiras biópsias já auxiliaria em muito os médicos nas decisões do tratamento.

Em um estudo inicial, abrangendo 29 pacientes e tomando como padrão-ouro os sinais clínicos de reativação, a comparação da técnica PCR (79%) com as técnicas de análise histopatológica (32%), esfregaço sanguíneo (37%) e hemocultura (26%) revelou que a metodologia molecular proposta por nós apresenta sensibilidade bem superior as demais. Resultados semelhantes foram obtidos pela comparação das áreas sob as curvas ROC, que indicou que o método de PCR descrito no presente estudo possui maior acurácia em relação aos demais testes (**PUBLICAÇÃO 1** – Costa *et al.*, 2017).

Além disso, considerando nossos dados obtidos até o momento, os primeiros resultados positivos para o diagnóstico molecular puderam ser obtidos mais precocemente, variando entre uma semana e 34 meses pós-transplante, com mediana de 1,7 meses (em média 5,2 meses). Isso permite, a antecipação da reativação clínica da doença de Chagas em até 4 anos, com uma mediana de cerca de 2 meses (em média 5,3 meses), revelando seu potencial para auxiliar nas decisões do médico sobre a melhor condução terapêutica em cada caso.

Tomados em conjunto nossos achados nos permitiram propor um algoritmo para vigilância da reativação chagásica, baseada nos testes moleculares, que poderiam contribuir para uma mudança significativa no protocolo de acompanhamento e tratamento dos pacientes chagásicos transplantados, a fim de melhorar a qualidade de vida dos mesmos (**PUBLICAÇÃO 1** - Costa *et. al* 2017).

De fato, estudos mais recentes reforçam que a abordagem preventiva proposta por nós, por meio do monitoramento da reativação da doença de Chagas, usando o diagnóstico molecular, pode ser eficaz em identificar a reativação antes que os sintomas se desenvolvam, introduzindo tratamento imediato à detecção por PCR, para evitar sintomas severos e danos ao coração transplantado (Gray *et al.*, 2018). No entanto, apesar do tratamento precoce já ser adotado em alguns centros nos Estados Unidos, no nosso entender são ainda necessários estudos futuros controlados nos moldes de *Clinical Trials* para que se comparem os desfechos dos pacientes tratados precocemente (assim que houver positividade da PCR), com aqueles pacientes tratados apenas quando as manifestações clínicas de reativação são detectadas (**PUBLICAÇÃO 1** - Costa *et. al* 2017, Gray *et al.*, 2018). Somente assim, poderemos confirmar o valor clínico dessa estratégia proposta no presente trabalho.

Ainda em relação ao Capítulo 1, além da metodologia baseada em PCR proposta neste trabalho, nós avaliamos também a eventual contribuição da introdução de análises

das BEMs por imuno-histoquímica no diagnóstico de reativação chagásica (**PUBLICAÇÃO 2-** Azevedo *et al*, 2018).

Nesse caso, quando utilizamos como padrão-ouro (controles positivos) BEMs em que ninhos de amastigotas haviam sido previamente detectados por histologia convencional (HE), e antissoro policlonal de coelho, padronizado no Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da UFOP, a técnica de imuno-histoquímica revelou altos valores de sensibilidade (81%) e especificidade (96%). Ademais, com essa estratégia, foi também possível a detecção de antígenos do parasito em 13% das BEMs negativas para HE, mas que haviam apresentado resultados positivos para pelo menos uma das técnicas de PCR. Dessa forma, concluímos que a introdução da análise de imuno-histoquímica poderia ser recomendada como método complementar à análise histopatológica convencional para o diagnóstico da reativação da infecção pelo *T. cruzi* em pacientes chagásicos submetidos a transplante cardíaco (**PUBLICAÇÃO 2-** Azevedo *et al*, 2018).

Todavia, como infelizmente não analisamos, nesse trabalho, BEMs de pacientes com sinais clínicos de reativação, cujas biópsias foram recorrentemente negativas, tanto para o HE quanto para a PCR, ainda não temos como afirmar o valor da introdução das análises por imuno-histoquímica, quando ambos os métodos de diagnóstico (HE e PCR) já estão sendo utilizados. Certamente, trabalhos futuros poderão responder a esta questão.

Na segunda parte deste trabalho, abordada no Capítulo 2, nosso objetivo foi o de investigar aspectos genéticos dos parasitos possivelmente associados à cardiopatia chagásica humana e à reativação da infecção em pacientes chagásicos transplantados. Para isso, utilizamos inicialmente as estratégias de genotipagem das DTUs dos *T. cruzi* presentes nas amostras de tecidos dos pacientes, realizada por meio de um triplo ensaio desenvolvido pelo nosso grupo (análise dos genes COII, espaçador intergênico do minicíon e rDNA 24S α).

Assim, no total, foram analisadas 216 amostras biológicas, que haviam apresentado resultado positivo para pelo menos um dos métodos de PCR utilizados para o diagnóstico molecular, das quais conseguimos a genotipagem, ainda que parcial, para 184 delas. Como já esperado, dadas as características da região de procedência da maior parte dos pacientes, em 85% das amostras, as populações do *T. cruzi* presentes nos tecidos foram genotipadas como pertencentes à DTU II. Esta é a DTU prevalente na região endêmica estudada (Macedo & Segatto, 2010). Todavia, entre as BEMs analisadas foi detectada, em um caso, a presença de populações do parasito pertencentes à TcVI, reforçando a associação dessa DTU como uma das causadoras da doença de Chagas.

De fato, tanto TcV quanto TcVI vêm sendo encontradas em casos de infecções humanas na região do Gran Chaco e países vizinhos, como Bolívia, Chile, Argentina e Brasil (Diosque *et al.*, 2003; Cardinal *et al.*, 2008). Essas duas DTUs são consideradas linhagens híbridas, resultantes de eventos de hibridação entre estirpes pertencentes à TcII – responsável pela maioria dos casos sintomáticos e graves da doença de Chagas – e à TcIII – linhagem mais associada ao ciclo silvestre e raramente observada em casos sintomáticos da infecção humana. Essas duas DTUs também têm sido implicadas no aumento do risco para a transmissão vertical da doença de Chagas (Macedo & Segatto, 2010; Dias *et al.* 2016, Volpato *et al.*, 2017).

A metodologia de genotipagem adotada, nesta parte do trabalho, se mostrou eficiente para a caracterização completa em 73% (157/216) das amostras diagnosticadas como positivas e parcial em 12,5% (27/216). Embora considerada uma boa estratégia, largamente utilizada, para distinguir as DTUs de *T. cruzi* em amostras de tecidos de pacientes chagásicos crônicos, nossos resultados demonstram que é necessário continuar a busca por marcadores e técnicas alternativas, ainda mais sensíveis, para a caracterização molecular em amostras com baixa quantidade de DNA do *T. cruzi*. Isso se faz especialmente relevante, visto que a completa caracterização das populações do parasito diretamente envolvidas nas lesões teciduais de pacientes chagásicos crônicos poderá contribuir para a melhor compreensão dos fatores genéticos do *T. cruzi* associados aos casos clínicos e à reativação da doença de Chagas.

Ao longo de nosso trabalho, observamos que cerca de 70% dos pacientes reativaram a infecção em algum momento pós-transplante. Nesse aspecto, indagamos se as populações do parasito presentes no coração dos pacientes antes do transplante (corações explantados), seriam as mesmas envolvidas nos episódios de reativação após o transplante (corações transplantados). Para investigar essa questão, além da genotipagem das DTUs do *T. cruzi*, foram realizadas análises de polimorfismos de seis microssatélites (TcCAA10, TcTAT20, TcAAAT6, TcGAG10, TcATT14, TcTAT15), utilizando dois sistemas de *full nested* PCR, buscando revelar a diversidade intralinhagens das populações dos parasitos. Essa parte do trabalho foi desenvolvida em colaboração com Wagson José de Carvalho Moreira, estudante de iniciação científica coorientado por mim.

No total, foram analisadas 20 amostras biológicas pareadas, oriundas de fragmentos de 10 corações explantados (retirados cirurgicamente) e 10 corações transplantados (representados pelas BEMs pós-transplante) dos mesmos pacientes.

A comparação das DTUs identificadas nos corações explantados e transplantados dos mesmos pacientes revelaram que o paciente que havia apresentado TcVI no coração transplantado, continha populações do parasito pertencentes à TcI em seu coração explantado. Esse achado é especialmente curioso por diferentes aspectos. Primeiro, porque confirma que *T. cruzi* de diferentes DTUs podem coexistir em um mesmo indivíduo. Segundo porque a presença de TcI em coração de paciente chagásico cardiopata procedente de Minas Gerais é um achado muito raro. Embora relativamente comum em pacientes sintomáticos de países do norte da América com Sul, como Colômbia e Venezuela, essa DTU tem predominância no ciclo silvestre da Amazônia brasileira e existem poucos casos que relacionem essa DTU com a forma cardíaca da doença de Chagas no país. Quando encontrada em humanos, no Brasil, esta DTU está mais associada a casos de infecções agudas por transmissão oral ou pacientes assintomáticos (Coura *et al.*, 2002; D’Avila *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2009; Mantilla, *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2017). Terceiro porque, embora TcVI seja relativamente frequente no ciclo doméstico, relatos da presença desta DTU diretamente nos corações de pacientes chagásicos são incomuns (Zingales *et al.*, 2012).

Igualmente intrigante foi a observação que nos outros nove casos em que também foi feita a comparação das DTUs identificadas no coração explantado e transplantado do mesmo paciente, houve a identificação apenas de TcII em ambos os corações. No entanto, por meio da análise do perfil dos seis *loci* microssatélites foi visto que em todos os casos a reinfeção foi realizada por cepas de *T. cruzi* diferentes das que promoveram a cardiopatia inicial, mostrando que há variabilidade intraespecífica dentro de uma mesma DTU (Moreira *et al.*, 2018- Moreira *et al.* 2019 – artigo em preparação).

Considerando a natureza policlonal das populações naturais do *T. cruzi* e levando em conta as intensas e complexas relações ecológicas envolvendo diversos insetos vetores, animais reservatórios e hospedeiros no ambiente silvestre, é sabido que o mesmo hospedeiro pode ser simultaneamente infectado por diferentes populações de *T. cruzi*. Além disso, segundo o modelo Histotrópico Clonal proposto por Macedo e Pena (1998), até mesmo diferentes clones provenientes de uma cepa podem apresentar tropismos teciduais diferentes nos hospedeiros. O trabalho de Vago *et al.*, (1996) confirmou pela primeira vez a existência de infecções policlonais em pacientes chagásicos, revelando que subpopulações diferentes de *T. cruzi* apresentam tropismos tecidual diferencial em pacientes humanos. O que foi posteriormente confirmado em modelos experimentais (Andrade *et al.*, 1999; 2002). Nossos achados para os pacientes cardíacos transplantados

reforçam essa teoria. Nesse sentido, é razoável supor que os pacientes analisados neste trabalho apresentavam misturas de populações de *T. cruzi*, com predomínio de uma delas no coração na ocasião do transplante. Assim, com a substituição do coração dos pacientes pelos corações dos doadores, e a adoção de tratamento imunossupressor, subpopulações de parasitos, até então indetectáveis pelas metodologias utilizadas, ou presentes em outros tecidos dos pacientes, tiveram a oportunidade de se estabelecerem nos corações transplantados.

Trabalhos anteriores de nosso e de outros grupos de pesquisa revelam que, além de aspectos genéticos associados ao parasito, fatores associados principalmente ao MHC e à resposta imune dos hospedeiros parecem também envolvidos na determinação do tropismo tecidual diferencial, na patogênese da cardiomiopatia chagásica, no processo de rejeição ao enxerto cardíaco e na reativação chagásica pós-transplante (Andrade *et al.* 2002; Gomes *et al.*, 2005; Zafra *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2009; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008; Dutra *et al.*, 2009; Nogueira *et al.* 2015). Assim, foi também nosso interesse investigar a existência de associação de polimorfismos nos genes codificadores das interleucinas IL-1 α , IL-6, IL-10 e IL-17 nos pacientes, com a reativação chagásica e/ou rejeição pós-transplante na coorte de pacientes chagásicos transplantados no HC-UFGM (Capítulo 3).

Para isso as frequências alélica e genotípica dos SNPs dessas quatro citocinas foram comparadas entre os grupos de pacientes com algum episódio de reativação chagásica ou rejeição durante o estudo e aqueles pacientes que não apresentaram essas ocorrências.

Nessa parte do trabalho, o grupo de estudo foi composto por 70 pares doador-receptor do enxerto cardíaco em transplantes realizados no HC-UFGM entre 2008- 2018. Dessa forma, foram analisadas 140 amostras, sendo 70 derivadas dos corações explantados — que consiste em fragmentos dos corações doentes retirados cirurgicamente e se refere ao que denominamos aqui de genótipo do receptor — e 70 amostras dos corações transplantados — obtidas por meio da BEMs realizadas pós-transplante e aqui reportados como genótipo do doador.

De acordo com os nossos achados, os polimorfismos detectados nos genes IL1 α (-889 C/T) e IL6 (-174 G/C) não estão associados à rejeição ou à reativação chagásica pós-transplante. Entretanto, os polimorfismos nos genes IL10 (-1082 G/A) e IL17A (-174 G/C) mostraram resultados intrigantes.

Em relação ao polimorfismo no gene IL10 (-1082 G/A), a variante alélica ancestral (G) tem sido associada, na literatura, à maior produção da IL-10. Foi realizada uma análise comparando-se frequência de rejeição com a presença (G+) ou ausência (G-) do alelo G em nossa coorte, tendo sido observado diferenças significativas no número de casos de rejeição nos subgrupos G+ e G-, tanto para o grupo dos doadores quanto dos receptores. Todavia, ao contrário do inicialmente esperado, indivíduos receptores do enxerto cardíaco portadores dos genótipos G+ (GG e GA), potencialmente maiores produtores de IL-10, demonstraram 4,2 vezes mais chances de apresentarem rejeição. De maneira similar, a presença do genótipo G+ no doador (coração transplantado) também aumentou o risco de rejeição em 3,1 vezes.

Quando analisamos a contribuição da combinação dos genótipos dos pares doador-receptor foi possível observar diferenças significativas entre os números de rejeições nos diferentes subgrupos. No subgrupo com rejeição, observou-se a presença de um maior número de combinação G+/G+ comparado ao subgrupo sem rejeição. Além disso, no subgrupo sem rejeição houve mais casos de combinação G-/G- do que o observado no subgrupo com rejeição, sugerindo que a combinação da presença do alelo G no doador e no receptor, aumenta ainda mais o risco para a rejeição pós-transplante cardíaco, pelo menos em pacientes cardiopatas chagásicos.

Por se tratar de uma citocina com conhecido papel anti-inflamatório, a nossa expectativa inicial era que a presença do alelo ancestral (G), que está relacionado à maior produção de IL-10, pudesse conferir proteção contra a rejeição aguda, conforme já foi demonstrado em estudos antecedentes, no contexto do transplante cardíaco (Martell, 1999; Turner *et al.*, 1997a e McDaniel *et al.* 2004). Todavia, nossos resultados demonstraram cenário bem diferente ao esperado.

Uma possibilidade que precisamos considerar é que esses resultados conflitantes estejam refletindo o fato de que o polimorfismo em questão foi detectado no coração dos pacientes e que as células cardíacas não produziram níveis relevantes destas citocinas. Todavia, estudos experimentais têm demonstrado a produção de diversas citocinas, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, pelos cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos (Yamauchi-Takahara *et al.* 1995; Comstock *et al.* 1998; Gwechenberger *et al.* 1999; Long *et al.* 2001; Song *et al.* 2010; Atefi *et al.* 2011; Hulsmans, *et al.* 2018).

Nesse sentido, tem sido apontando que a produção local dessas citocinas desempenha um papel importante no controle da reação inflamatória após lesão cardíaca, promovendo a infiltração de células inflamatórias na região lesionada (Gwechenberger *et*

al. 1999), atuando no processo subsequente de remodelação do miocárdio (Long *et al.* 2001; Porter *et al.* 2009; Aoyagi, *et al.* 2012), dentre outros fatores. Semelhantemente, estudos com cardiomiócitos isolados de camundongos infectados com *T. cruzi* indicaram que essas células participam ativamente na resposta à infecção, através da produção de citocinas e óxido nítrico, modulando a presença de células inflamatórias no tecido cardíaco e controlando a replicação do parasito (Machado, *et al.* 2000).

Outra possibilidade a ser considerada, são os diversos papéis da IL-10 na rejeição de enxertos. Essa citocina, se por um lado induz a supressão da inflamação, por regular negativamente moléculas de classe II do MHC, a expressão de ICAM, e a síntese de diversas citocinas pró-inflamatórias, por outro lado também possui papel pró-inflamatório ao regular positivamente a proliferação e diferenciação das células B. Assim, tanto a alta quanto a baixa produção de IL-10 pode ser prejudicial ao paciente, mediando diferentes vias de rejeição ao enxerto (Turner *et al.*, 1997a). Deveras, assim como em nossos achados, pelo menos para o transplante renal, o genótipo de alta expressão de IL-10 também já foi associado a uma maior suscetibilidade à rejeição aguda (Hutchinson *et al.*, 1998; Sankaran *et al.*, 1999; Thakkestian *et al.*, 2008).

Em relação ao polimorfismo IL17A (-197 A/G) e sua associação com a reativação precoce da doença de Chagas, diferenças significativas foram detectadas em relação ao grupo de doadores. Para esse grupo, a presença do alelo G, que está associada à baixa expressão de IL-17A, demonstrou um efeito protetor para a reativação da infecção quando presente no coração doado. Por outro lado, quando comparada a presença (A+) e a ausência (A-) da variante alélica A entre os grupos, foi observado que há diferença significativa no número de reativações precoces entre os doadores dos grupos A+ e A-. De fato, os indivíduos que receberam coração de doadores do grupo A+ tiveram 3,8 vezes mais chances de apresentarem reativação, em até 120 dias pós-transplante, do que os indivíduos do grupo A-. Além disso, quando avaliados em combinação o genótipo do receptor e do doador, foi observado um maior número de pares A-/A+ no grupo com reativação chagásica em até 120 dias do que no grupo sem reativação ou com reativação tardia. Curiosamente, a presença do alelo A, associado à maior produção da citocina pró-inflamatória IL17A, no doador, correlacionou-se com uma maior suscetibilidade à reativação chagásica nos pacientes cardiopatas transplantados.

Embora intrigantes, nossos achados reforçam estudos de Reis *et al* (2017) com polimorfismos do gene IL17A, que também detectaram um aumento da frequência do alelo A e do genótipo AA nos pacientes com cardiopatia chagásica crônica, quando

comparado ao grupo controle, constituído de indivíduos saudáveis com sorologia negativa para *T. cruzi*.

Esses dados são inusitados, considerando que a variante alélica A tem sido associada à maior produção da citocina IL-17A, que é uma citocina reconhecidamente pro-inflamatória com papel aventado na defesa de hospedeiros contra patógenos (Revisado por Normanton *et al.*, 2013).

Todavia, semelhante à IL-10, o papel da IL-17 na doença de Chagas ainda não está completamente esclarecido. Se por um lado, seu papel inflamatório, induzindo a infiltração celular, a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, e ativação de apoptose em células potencialmente infectadas é bem conhecido (Korn *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2005), por outro lado, é também sugerido que essa citocina possa ter um papel anti-inflamatório, reduzindo a expressão de IL-12 e consequentemente a produção de IFN- γ e TNF- α (O'Connor *et al.*, 2009; Guedes *et al.* 2010). Logo, elevados níveis de IL-17A, relacionados ao genótipo A+ (AG ou AA), podem estar contribuindo para níveis mais baixos de IFN- γ , o que pode estar tornado o paciente mais susceptível a reativação.

Finalmente, no Capítulo 4, em colaboração ao grupo do Dr. Alejandro Schjiman, abordamos nosso último objetivo, que foi investigar, com uma abordagem de doença de Chagas experimental, contribuições de fatores do parasito e do hospedeiro no tropismo tecidual diferencial, mais especificamente para a placenta, e a transmissão vertical. Para isso, investigamos os efeitos, no ambiente placentário, da infecção de camundongos C57Bl/6J com duas diferentes cepas de *T. cruzi*, VD (TcI) e K98 (TcVI), analisando a expressão gênica, por meio da estratégia de *microarray*, e a persistência parasitária nestes tecidos, por meio de técnicas de PCR.

Foi possível observar, por meio dessas estratégias, um maior número de genes diferencialmente expressos nos ambientes placentários de animais infectados com a estirpe VD (TcVI) comparado àqueles infectados com K98 (TcI). Sendo que na infecção com a DTU VI, os genes relacionados a resposta imunoinflamatória tiveram sua expressão aumentada, enquanto os relacionados ao metabolismo celular foram modulados negativamente, o que não foi observado para a DTU I. Esses achados podem estar relacionados ao fato de que também foi verificado maior tropismo placentário pela cepa VD (TcVI). Assim, essa forte resposta imune no ambiente placentário estaria sendo ativada pela presença do parasito nos tecidos da placenta (**PUBLICAÇÃO 3-** Juiz *et al.*, 2017).

De fato, já foi observado que as DTUs híbridas (TcV e TcVI) promovem maior parasitemia nas mães infectadas (Burgos *et al.*, 2007), o que conseqüentemente poderia facilitar a passagem transplacentária do parasito, ocasionando a transmissão congênita da doença de Chagas. Hipótese que, em parte, foi ratificada pelos nossos achados, visto que a cepa mais virulenta (VD – TcVI) apresentou maior concentração de parasito no ambiente placentário. No entanto, não foi verificado presença de DNA de *T. cruzi* nos fetos, tanto na infecção com K98 quanto com VD, logo, a transmissão congênita em camundongos C57Bl/J6 não foi confirmada para nenhuma das duas cepas utilizadas. Sugerindo que mesmo presentes nos tecidos placentários, essas cepas não são capazes de causar infecção congênita, pelo menos na linhagem de camundongos utilizada.

Esses achados ratificam estudos anteriores que mostram que a transmissão congênita em camundongos é um evento muito raro (Solana *et al.*, 2002). Assim como é também é razoável supor que alterações na expressão gênica placentária, com aumento de expressão de genes associados à resposta imune nos animais infectados com a estirpe VD possam ter sido determinantes em dificultar a sua transmissão para os fetos, mesmo estando presente em alta concentração no ambiente placentário.

Além disso, para saber se as populações inicialmente escolhidas para a realização da infecção eram monoclonais e verificar se teria ocorrido alguma seleção das subpopulações iniciais ao longo do curso da infecção, foram realizadas duas metodologias desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa, as assinaturas de kDNA e a análise de microssatélites. Mesmo utilizando essas metodologias capazes de distinguir diferentes populações do parasito diretamente nos tecidos de animais e pacientes infectados (Vago *et al.*, 1996, 2000; Andrade *et al.*, 1999; Lages-Silva *et al.*, 2006; Valadares *et al.*, 2007), não foram detectadas diferenças na constituição genética entre as populações do parasito utilizadas para a infecção daquelas presentes nos ambientes sanguíneo e placentário por nenhuma das metodologias utilizadas. Além disso, foi observado que as cepas utilizadas eram monoclonais, visto que apenas um ou dois alelos foram observados para os *loci* de microssatélites utilizados.

Neste trabalho, infelizmente, não foi incluído um grupo de camundongos infectados com uma mistura de cepas, estudo que certamente contribuiria para melhor entendimento do tropismo tecidual diferencial dessas cepas, visto que seria observada no mesmo animal. Além de já ter sido documentado que o comportamento das diferentes populações de *T. cruzi*, assim como na resposta dos hospedeiros, pode ser bem diferente, quando misturas de cepas são utilizadas (Andrade *et al.*, 1999, 2000; Rodrigues *et*

al.,2010). Certamente, a continuação de estudos envolvendo a infecção congênita com diferentes DTUs de *T. cruzi* poderão fornecer maior lucidez a estes questionamentos.

Em virtude de todos os aspectos mencionados, conclui-se que o presente trabalho certamente trouxe relevantes contribuições para o campo de diagnóstico da infecção crônica cardíaca, especialmente em pacientes transplantados. Mostrando que as técnicas moleculares são ferramentas diagnósticas e prognósticas muito úteis, que podem auxiliar na elaboração de estratégias terapêuticas antecipadas e trazendo a perspectiva de mudança significativa no protocolo de acompanhamento e tratamento dos pacientes chagásicos transplantados. Assim como revelou interessantes achados sobre a epidemiologia molecular do *T. cruzi* nesta região geográfica, por meio da caracterização do parasito diretamente em tecidos de pacientes. E apontou dados interessantes sobre os polimorfismos genéticos dos pacientes que podem estar associados à reativação chagásica e à rejeição após transplante cardíaco. Além de ajudar a lançar luz sobre a participação de aspectos genéticos ligados às cepas de *T. cruzi* envolvidos na transmissão congênita da infecção pelo *T. cruzi*, em nível experimental, abrindo novas perspectivas de estudo em todas essas áreas.

CAPÍTULO 6- Conclusão geral

- ✓ Entre 2008 e 2018 foram realizados 115 transplantes cardíacos no HC- UFMG em pacientes com cardiopatia chagásica crônica. Desses, 98 pacientes foram acompanhados pelo nosso estudo.
- ✓ Os pacientes possuem naturalidade e procedência majoritariamente de Minas Gerais. Cerca de 63% são do sexo masculino, e a média de idade na data do transplante entre homens e mulheres foi de 45,6 e 49 anos, respectivamente.
- ✓ Cerca de 66% dos pacientes tiveram pelo menos um episódio de reativação chagásica após o transplante cardíaco, durante o período do estudo.
- ✓ O número médio de episódios de reativação chagásica pós-transplante foi de 1,25 (variando de 1 a 5 episódios).
- ✓ Em média, a primeira reativação clínica da doença de Chagas ocorreu 215,7 dias após o transplante, com mediana de 125 dias pós-transplante.
- ✓ Cerca de 75% dos pacientes apresentaram o primeiro episódio de reativação chagásica em até 240 dias (8 meses) pós-transplante, apontando essa fase como a de maior risco para a reativação.
- ✓ As principais formas de reativação foram a cutânea (33 dos 65 pacientes - 50,77%) e a cardíaca (26 dos 65 pacientes- 41,54%). Além desses, 4 pacientes apresentaram reativação neurológica (6,15%) e alguns pacientes apresentaram mais de um tipo de manifestação clínica ou subclínica.
- ✓ A comparação entre o medicamento imunossupressor utilizado pós-transplante e a reativação chagásica revelou que cerca de 90% dos pacientes em uso de ciclosporina apresentaram reativação, enquanto que essa proporção para os pacientes em uso de tacrolimus foi de cerca de 53%, sendo essas proporções estaticamente diferentes ao nível de significância de 5%.
- ✓ Apesar do alto número de casos de reativação chagásica, a mortalidade pós-transplante associada à doença de Chagas foi baixa. Dos 21 pacientes que faleceram durante os 10 anos de acompanhamento, apenas dois tiveram o seu óbito relacionado à reativação ou complicações associadas à doença de Chagas.
- ✓ Não observamos diferença estatisticamente significativa entre a sobrevivência pós-transplante cardíaco para pacientes chagásicos em relação às outras causas de cardiopatia, constituindo –se cerca de 80% no primeiro ano e maior que 75% no segundo ano para ambos os grupos. Resultados similares foram obtidos comparando a sobrevivência dos pacientes chagásicos com e sem reativação clínica da doença de Chagas pós-transplante.

- ✓ A metodologia de PCR proposta neste trabalho se mostrou adequada para o diagnóstico da presença do *T. cruzi* em amostras oriundas de pacientes cardiopatas chagásicos submetidos a transplante cardíaco, mostrando uma boa correlação entre o diagnóstico molecular e o diagnóstico clínico.
- ✓ 205 BEMs (20,68%) oriundas de 70 pacientes apresentaram algum resultado positivo para pelo menos um dos testes moleculares realizados. Desses, 51 (72,86%) já apresentaram algum episódio de reativação clínica da doença de Chagas ao decorrer desses anos.
- ✓ O primeiro resultado positivo para o diagnóstico molecular teve mediana de 1,0 mês após o transplante.
- ✓ Análise histopatológica da BEM — convencional ou imuno-histoquímica —, esfregaço sanguíneo e hemocultura mostraram menor sensibilidade e maior tempo médio para o primeiro resultado positivo, comparado ao diagnóstico molecular.
- ✓ As técnicas de PCR anteciparam os sinais clínicos de reativação chagásica em até 36 meses, com mediana de 6 meses e média de 9,1 meses.
- ✓ Através da genotipagem das amostras positivas, foi notado a ocorrência preferencial de TcII, reiterando a ideia de que esta é a principal DTU associada à forma cardíaca da doença de Chagas e as diferentes formas de reativação clínica, pelo menos nesta região geográfica.
- ✓ Foi observado um caso de infecção inicial por TcI com reativação por TcVI, indicando que as linhagens do parasito podem variar durante os episódios de reativação e que outras DTUs podem estar associadas à cardiopatia chagásica no Brasil.
- ✓ Por meio da análise do perfil de microssatélites, comparando as amostras obtidas de corações explantados e transplantados, foi visto que, em todos os casos analisados, a população do parasito predominante na reinfecção era diferente daquela detectada no coração do paciente na ocasião do transplante, mesmo entre aqueles pacientes que mantiveram a mesma DTU durante a reativação.
- ✓ A análise da existência de eventual associação dos polimorfismos genéticos encontrados nos genes de determinadas interleucinas apontou que não houve associação entre os polimorfismos IL1 α (-889 C/T) e IL6 (-174 G/C) e a rejeição e a reativação chagásica pós-transplante cardíaco em pacientes brasileiros.
- ✓ Foi encontrada associação entre o polimorfismo IL10 (-1082 G/A), no receptor e no doador e a rejeição ao enxerto cardíaco. O grupo dos portadores de genótipo

G+ (GG e GA), potencialmente maior produtor de IL-10, demonstrou aumento do risco de rejeição em 4,2 vezes quando encontrado no receptor e 3,1 vezes quando observado no doador.

- ✓ No grupo de pacientes com rejeição há um número estatisticamente maior de combinação de genótipos — doador e receptor — G+/G+ comparado ao grupo sem rejeição.
- ✓ Foi encontrada associação entre o polimorfismo IL17A (-197 A/G) no doador e a reativação chagásica precoce pós-transplante, tendo o grupo dos portadores de genótipo A+ (AG e AA) 3,8 vezes mais chance de causar reativação em até 120 dias pós-transplante do que o grupo dos portadores de genótipo A- (GG).
- ✓ A investigação dos efeitos, no ambiente placentário, da infecção de camundongos C57Bl/6J com duas cepas de *T. cruzi* de diferentes DTUs- VD (TcVI) e K98 (TcI), por meio da análise da expressão gênica e a persistência parasitária nestes tecidos, revelou maior desenvolvimento de resposta imune contra à infecção pela cepa VD (TcVI), possivelmente consequente do tropismo mais forte ao órgão placentário para essa cepa.

CAPÍTULO 7- Referências Bibliográficas

- Abolis, N. G.; Araújo, S. M.; Toledo, M. J.; Fernandez, M. A.; Gomes, M. L. *Trypanosoma cruzi* I-III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. **Acta Tropica**, v. 120, n. 3, p. 167- 72, 2011.
- ABTO - Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: janeiro / setembro – 2018. **Registro Brasileiro de Transplantes**, ano XXIV, n. 3, p. 1- 23, 2018.
- Agabian, N. Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v.61, p. 1157- 1160, 1990.
- Alba, A. C.; Bain, E.; Ng, N. *et al.* Complications after Heart Transplantation: Hope for the Best, but Prepare for the Worst. **International Journal of Transplantation Research and Medicine**, v. 2, n. 2, p. 2- 22, 2016.
- Almeida, D. R.; Carvalho, A. C.; Branco, J. N. *et al.* Chagas' disease reactivation after heart transplantation: efficacy of allopurinol treatment. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 15, n. 10, p. 988- 992, 1996.
- Almeida, B. R.; Santiliano, F. C. Assessment of the diagnostic methods for Chagas' disease. **Enciclopédia biosfera**, v. 8, n. 14, p. 1586- 1603, 2012.
- Altclas, J.; Sinagra, A.; Dictar, M. *et al.* Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy. **Bone Marrow Transplant**, v. 36, p. 23- 29, 2005.
- Amato, J. G.; Amato Neto, V.; Amato, V. S. *et al.* Lesões cutâneas como únicas manifestações de reativação da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em receptora de rim por transplante. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 61- 63, 1997.
- Andrade, Z. A. & Andrade, S. G. Pathogenesis of Chagas' chronic myocarditis; importance of ischemic lesions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, n. 7, p. 279- 288, 1955.
- Andrade, Z. A. & Lopes E. A. A histochemical study of experimental Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v. 5, p. 236- 242, 1963.
- Andrade, S. G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano: contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio. **Revista de Patologia Tropical**, v. 3, p. 65-121, 1974.
- Andrade, S. G.; Andrade, V.; Brodskyn, C.; Magalhães, J. B.; Netto, M. B. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 79, n. 4, p. 397- 407, 1985.
- Andrade, L.O; Machado, C. R.; Chiari, E.; Pena, S. D; Macedo, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, p. 163- 172, 1999.
- Andrade, L. O; Machado, C. R.; Chiari, E.; Pena, S. D.; Macedo, A. M. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental Parasitology**, v. 100, p. 269- 275, 2002.
- Andrade, L. O.; Galvão, L. M.; Meirelles, N. *et al.* Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 834- 837, 2010.
- Andrade, J. A.; Marin-Neto, J. A.; Paola, A. A. V.; *et al.* I Diretriz Latino Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 97, p. 1- 48, 2011.
- Antonyamy, M. A.; Fanslow, W. C.; Fu, F. *et al.* Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. **Journal of immunology**, v. 162, p. 577- 584, 1999.
- Aoyagi, T.; Matsui, T. The Cardiomyocyte as a Source of Cytokines in Cardiac Injury. **Journal of Cell Science and Therapy**, v. 2012, n.3, p. 1- 6, 2011.
- Araújo, F. F.; Vitelli- Avelar, D. M.; Teixeira- Carvalho, A. *et al.* Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. **PLoS Neglected Tropical Disease**. v. 5, p. e992, 2011.

- Arend, W. P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 223, p. 20- 38, 2002.
- Arisawa, T.; Tahara, T.; Shibata, T. *et al.* The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 28, p. 44- 49, 2008.
- Atefi, G.; Zetoune, F. S.; Herron, T. J. *et al.* Complement dependency of cardiomyocyte release of mediators during sepsis. **The FASEB Journal**, v. 25, p. 2500- 2508, 2011.
- Augusto-Pinto, L., S. M. Teixeira, S. D. Pena; C. R. Machado. Single-nucleotide polymorphisms of the *T. cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. **Genetics**, v. 164, n. 1, p. 117-126, 2003.
- Avila, H.A.; Sigman, D.S.; Cohen, L. M. *et al.* Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. **Molecular And Biochemical Parasitology**, v. 48, p. 211- 222. 1991.
- Avila, H; Borges-Pereira, J.; Thiemann, O. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2421- 2426, 1993.
- Awasthi, A.; Kuchroo, V. K. Th17 cells: from recursors to players in inflammation and infection. **International Immunology**, v. 21, p. 489- 498, 2009.
- Azevedo, P. H. R; Xavier, M. A. P.; Silva, G. N.; Costa, P. A.; Carneiro, C. M.; Brasileiro Filho, G. **Anti- serum validation for use in immunohistochemistry for *Trypanosoma cruzi* detection.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 51, n. 4, p. 467- 474, 2018.
- Bacal, F.; Silva, C. P.; Bocchi, E. A. *et al.* Mycophenolate mofetil increased Chagas disease reactivation in heart transplanted patients: comparison between two different protocols. **American Journal of Transplantation**, v. 5, n. 8, p. 2017- 2021, 2005.
- Bacal, F.; Souza-Neto, J. D.; Fiorelli, A. I. *et al.* II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, p. E16- 73, 2009.
- Bacal, F.; Silva, C. P.; Pires, P. V. *et al.* Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. **Clinical transplantation**, v. 24, n. 2, p. 29- 34, 2010.
- Bacal, F.; Marcondes-Braga, F. G.; Rohde, L. E. P.; *et al.* 3ª Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 111, n. 2, p. 230- 289, 2018.
- Barbosa, A. J. Immunocytochemical method for the identification of *Trypanosoma cruzi* amastigotes in routine histological sections. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, n. 6, p. 293- 297, 1985.
- Barbosa, A. J.; Gobbi, H.; Lino, B. T. *et al.* Comparative study of the conventional method and the peroxidase-antiperoxidase method in the search for tissue parasitism in chronic Chagas' cardiopathy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 2, p. 91- 96, 1986.
- Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. **South African Medical Journal**, v. 41, n. 48, p. 1271– 1274, 1967.
- Barretto, A. C.; Arteaga, E.; Mady, C. *et al.* Sexo masculino. Fator prognóstico na doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 60, p. 225- 227, 1993.
- Benatti, R. D.; Oliveira, G. H.; Bacal, F. Heart Transplantation for Chagas Cardiomyopathy. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 36, n. 6, p. 597– 603, 2017.
- Benvenuti, L. A.; Roggério, A.; Sambiase, N. V.; Fiorelli, A.; Higuchi, M. L.; Polymerase chain reaction in endomyocardial biopsies for monitoring reactivation of Chagas' disease in heart transplantation A case report and review of the literature. **Cardiovascular Pathology**, v. 14, p. 265- 268, 2005.
- Benvenuti, L. A., Roggerio, A.; Coelho; G.; Fiorelli, A. I. Usefulness of qualitative polymerase chain reaction for *Trypanosoma cruzi* DNA in endomyocardial biopsy specimens of

- chagasic heart transplant patients. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 30, n.7, p. 799- 804, 2011.
- Beraún, Y.; Nieto, A.; Collado, M. D.; González, A.; Martín, J. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. **Tissue Antigens**, v. 52, p. 81-83, 1998.
- Bestetti, R. B. Predictors of unfavourable prognosis in chronic Chagas' disease. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, p. 476- 483, 2001.
- Bestetti, R. B.; Souza, T. R.; Lima, M. F. *et al.* Effects of a mycophenolate mofetil- based immunosuppressive regimen in Chagas' heart transplant recipients. **Transplantation** v. 84, p. 441- 442, 2007.
- Bestetti, R. B.; Theodoropoulos, T. A. D. A systematic review of studies on heart transplantation for patients with end- stage Chagas' heart disease. **Journal of Cardiac Failure**, v. 15, n. 3, 2009.
- Bidwell, J.; Keen, L.; Gallagher, G. *et al.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. **Genes and Immunity**, v. 1, p. 3- 19, 1999.
- Bocchi, E. A.; Bellotti, G.; Mocelin, A. O. *et al.* Heart transplantation for chronic Chagas' heart disease. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 61, n. 6, p. 1727- 1733, 1996.
- Bocchi, E. A.; Fiorelli, A. The brazilian experience with heart transplantation: a multicenter report. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 20, p. 637- 645, 2001a.
- Bocchi, E. A.; Fiorelli, A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. First guidelines group for heart transplantation of the brazilian society of cardiology. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 71, p. 1833- 38, 2001b.
- Bontempi, I. A.; Bizai, M. L.; Ortiz, S. Simple methodology to directly genotype *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in single and mixed infections from human blood samples. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 123- 129, 2016.
- Boros, P.; Suehiro, T.; Curtiss, S. *et al.* Differential contribution of graft and recipient to perioperative TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 levels and correlation with early graft function in clinical liver transplantation. **Clinical Transplantation**, v. 11, p. 588– 592, 1997.
- Bosseno MFY, Vargas N., Brenière F., S. F. Selection of clonal genotypes (clonet 20 and 39) isolated from Bolivian triatomines following subculture in liquid medium. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 601– 607, 2000.
- Brener, Z.; Chiari, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. n. 5, p. 220-224, 1963.
- Brener, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Advances in Parasitology**, v. 18, p. 247- 292, 1980.
- Brener, Z. & Gazzinelli, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 114, p. 103- 110, 1997.
- Brener, Z. *Trypanosoma cruzi*: Morfologia e ciclo evolutivo. In: Dias, J. C. P.; Coura, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: Uma abordagem prática para o clínico geral. **Fiocruz**, p. 25- 31, 1997.
- Brenière, S.F.; Bosseno, M. F.; Telleria, J. *et al.* Field amplification of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in bolivian triatomines. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 179- 184, 1995.
- Brenière, S. F; Bosseno, M. F.; Telleria, J., *et al.* Different behavior of two major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. **Experimental Parasitology**, v. 89, n.3, p. 285- 295, 1998.
- Brenière, S. F.; Aliaga, C.; Waleckx, E. *et al.* Genetic characterization of DTUs in wild *Triatoma infestans* from Bolivia: predominance of TcI. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. e1650, 2012.
- Brenière, S. F.; Waleckx, E.; Barnabé, C. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into Discrete Typing Units (DTUs): attempt at an inventory. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1- 19, 2016.

- Brisse, S.; Verhoef, J.; Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 11, p. 1218- 1226, 2001.
- Britto, C.; Cardoso, M.A.; Monteiro, V. C. M *et al.* Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. **Parasitology**, v. 110, p. 241- 247, 1995.
- Bromberg, J. S. IL-10 immunosuppression in transplantation. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, p. 639, 1995.
- Brumpt, E. Le xénodagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la trypanosome de Chagas. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 7, p. 706- 710, 1914.
- Burgos, J. M.; Altcheh, J.; Bisio, M. *et al.* Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 12, p. 1319- 1327, 2007.
- Burgos, L. G.; Ortiz, B. D.; Canese, A. *et al.* Reactivation of Chagas disease by immunosuppressive therapy in a patient with systemic lupus erythematosus: report of an exceptional case. **American Journal of dermatopathology**, v. 34, e84- 89, 2012.
- Caliari, M. V.; de Lana, M.; Cajá, R. A. *et al.* Immunohistochemical studies in acute and chronic canine chagasic cardiomyopathy. **Virchows Archiv: European Journal of Pathology**, v. 441, n. 1, p. 69-76, 2002.
- Campos, S. V.; Strabelli, T. M. V.; Amato Neto, V. Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 27, n. 6, p. 597- 602, 2008.
- Campos, F. P.; Pansard, H. M.; Arantes, L. C. *et al.* Paniculite chagásica pós-transplante renal: relato de caso, **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 38, n. 1, 2016.
- Cardinal, M. V.; Lauricella, M. A.; Ceballos, L. A. *et al.* Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 13, p. 1533- 1543, 2008.
- Carriazo, C.S.; Sembaj, A.; Aguerri, A. M. *et al.* Polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 30, p. 183- 186, 1998.
- Carlier, Y.; Truyens, C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. **Acta Tropica**. v. 151, p. 103- 15, 2015.
- Carlier, Y.; Sosa-Estani, S.; Luquetti, A. O.; Buekens, P. Congenital Chagas disease: an update. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 363- 368, 2015.
- Castelluci *et al.* IL-6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 4, p. 519- 527, 2006.
- Castro, A. M.; Luquetti, A. O.; Rassi, A.; Rassi, G. G.; Chiari, E. *et al.* Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 88, n. 10, p. 894- 900, 2002.
- Chagas, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159- 152, 1909.
- Chiari, E.; Dias, J. C. P.; Lana, M.; Chiari, C. A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, p. 19- 23, 1989.
- Chomarat, P.; Rissoan, M.; Banchereau, J. Interferon γ inhibits Interleukin 10 production by monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 523- 527, 1993.
- Coelho, V. P. C.V.; Ioschpe1, R.; Caldas, C. *et al.* Contrasting roles of donor and recipient TGFB1 and IFNG gene polymorphic variants in chronic kidney transplant rejection. **Einstein**, v. 9, n. 1, p. 46- 51, 2011.

- Comstock, K. L.; Krown, K. A.; Page, M. T. *et al.* LPS-induced TNF-alpha release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 30, p. 2761- 2775, 1998.
- Cooper, L. T.; Baughman, K. I.; Feldman, A. M. *et al.* The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, v. 116, p. 2216- 2233, 2007.
- Cordeiro, C. A.; Moreira, P. R.; Costa, G. C. *et al.* Interleukin-1 gene polymorphisms and toxoplasmic retinochoroiditis. **Molecular Vision**, v. 14, p. 1845- 1849, 2008.
- Cossermelli, W.; Friedman, H.; Pastor, E. H. *et al.* Polymyositis in Chagas's disease. **Annals Of The Rheumatic Diseases**, v. 37, p. 277- 280, 1978.
- Costa, G. C.; Rocha, M. O. C.; Moreira, P. R. *et al.* Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. **Journal of Infectious Disease**, v. 199, p. 451-454, 2009.
- Costa, P. A.; Segatto, M.; Durso, D.F.; Moreira, M. C. V.; Macedo, A. M. *et al.*, Early PCR detection of Chagas disease reactivation in heart-transplanted patients. **The Journal Heart and Lung transplantation**, v. 36, n. 7, p. 797- 805, 2017.
- Couper, K. N.; Blount, D. G.; Riley, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **Journal of immunology**, v. 180, n. 9, 5771- 5777, 2008.
- Coura, J. R.; Abreu, L. L.; Pereira, J. B.; Willcox, H. P. Morbidade da doença de Chagas. IV Estudo longitudinal de dez anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 1, p. 73- 80, 1985.
- Coura, J. R.; Junqueira, A. C.; Fernandes, O.; Valente, A. S.; Miles, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 4, p. 171- 176, 2002.
- Criado, L.; Flórez, O.; Martín, J.; González, C.I. Genetic polymorphisms in *TNFA/TNFR2* genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. **Cytokine**, v. 57, p. 398- 401, 2012.
- Cruz, G. S.; Angelo, A. L. D.; Larocca, T. F. Assessment of Galectin-3 Polymorphism in Subjects with Chronic Chagas Disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 105, n. 5, p. 472- 478, 2015.
- Cruz-Robles, D.; Chavez-Gonzalez, J.P.; Cavazos-Quero *et al.* Association between IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms and Chagas' disease development susceptibility. **Immunological investigations**, v. 38, p. 231- 239, 2009.
- Cunha-Neto, E. *et al.* Immunological and non- immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, s. 1, p. 252- 258, 2009.
- Cura, C. I.; Duffy, T.; Lucero, R. H. Multiplex real-time PCR assay using TaqMan probes for the identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in biological and clinical samples. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, e0003765, 2015.
- Damsker, J. M.; Hansen, A. M.; Caspi, R. R. Th1 and Th17 cells adversaries and collaborators. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1183, p. 211- 221, 2010.
- DATASUS. SIM – Sistema de Informações de Mortalidade. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: janeiro de 2019.
- D'Avila, S.C.G.P.; D'Avila, A. M. M. P.; Pagliari, C.; Gonçalves, V. M.; Duarte, M. I. S. Eritema nodoso como forma de reativação da doença de Chagas em transplantado cardíaco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 61- 63, 2005.
- D'Avila, D. A.; Macedo, A. M.; Valadares, H. M. *et al.* Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1718- 1725, 2009.
- Del Castillo, M.; Mendoza, G.; Oviedo, J. *et al.* AIDS and Chagas' disease with central nervous system tumor-like lesion. **The American Journal of Medicine**, v. 88, p. 6934, 1990.
- DeLong, E. R.; DeLong, D. M.; Clarke-Pearson, D. L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach, **Biometrics**, v. 44, n. 3, p. 837- 845, 1988.

- Devillers, H.; Lobry, J. R.; Menu F. An agent-based model for predicting the prevalence of I and II in their host and vector populations. **The Journal of Theoretical Biology**, v. 255, n. 3, 307- 315, 2008.
- Dias, J.C.; Amato Neto, V. Prevention concerning the diferente alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, s. 2, p. 68- 72, 2011.
- Dias, J. C. P. Evolution of Chagas Disease screening programs and control programs: historical perspective. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 193- 202, 2015.
- Dias, J. C. P.; Ramos Jr, A. N.; Gontijo, E. D. *et al.* Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 7- 86, 2016.
- Diez, M.; Favalaro, L.; Bertolotti, A. *et al.* Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 7, n. 6, p. 1633- 1640, 2007.
- Dinardi, L. F. L.; Palazzo, J. F.; Pereira, T. V. *et al.* Heart transplantation in Chagas' disease. **Revista de Medicina (São Paulo)**, v. 91, n. 4, p. 229- 240, 2012.
- Dinarello, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, p. 2095- 2147, 1996.
- Dinarello, C. A. Immunological and inflamatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519- 550, 2009.
- Diosque, P.; Barnabe, C.; Padilla, A. M. *et al.* Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 997- 1003. 2003.
- Drigo, S. A.; Cunha- Neto, E.; Ianni, B. *et al.* Lack of association of tumor necrosis factor- α polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. **Immunology Letters**, v. 108, p. 109- 111, 2007.
- Duffy, T.; Cura, C. I.; Ramirez, J. C. *et al.* Analytical performance of a multiplex. Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.
- Dutra, W. O. *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 208- 218, 2009.
- Espinoza, J. L.; Takami, A.; Nakata, K. *et al.* A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26229, 2011.
- Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 911- 919, 2005.
- Fernandes, J. V.; Meissner, R. V.; Fernandes, T. A. A. M. *et al.* Comparison of three DNA extratction protocols from formaldehyde and paraffin- embedded tissues. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 3, p. 141- 146, 2004.
- Fernandes, L. A. Diagnóstico e caracterização das linhagens de *Trypanosoma cruzi*: desenvolvimento de PCR multiplex para os loci de microssatélites TcTAT20, TcAAAT6 E TcCAA10. **Monografia**, Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.
- Ferreira, M. S.; Nishioka, S. de A.; Silvestre, M. T. *et al.* Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p. 1397- 1400, 1997.
- Fife, E. H. & Muschel, L. H. Fluorescent antibody technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 101, p. 540- 543, 1959.
- Filardi, L. S. & Z. Brener. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygien**, v. 81, n. 5, p. 755- 759, 1987.
- Fiorelli, A. I.; Santos, R. H., Oliveira, J. L. Jr. *et al.* Heart transplantation in 107 cases of Chagas' disease. **Transplantation proceedings**, v. 43, n. 1, p. 220- 224, 2011.
- Fishman, D.; Faulds, G.; Jeffrey, R. *et al.* The effect of novel polymorphisms in the Interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with

- systemic-onset juvenile chronic arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, p. 1369, 1998.
- Fleiss, J. L. Statistical methods for rates and proportions, 1981.
- Flórez, O.; Zafra, G.; Morillo, C.; Martín, J.; González, C. I. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in Chagas Disease in a Colombian case- control study. **Human Immunology**, v. 67, n. 9, p. 741- 748, 2006.
- Flórez, O.; Martín, J.; González, C. I. Interleukin 4, interleukin 4 receptor- and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 506- 511, 2011.
- Fowles, R. E.; Mason, J. W. Myocardial biopsy [editorial]. **Mayo Clinic Proceedings**. p. 459- 62, 1982.
- Fuenmayor, C. Higuchi, M. L.; Carrasco, H. *et al.* Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with T. cruzi parasitic antigens. **Acta cardiologica**, v. 60, n. 1, p. 33-37, 2005.
- Freitas, J. M.; Lages-Silva, E.; Crema, S. D. Pena; Macedo, A. M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 411- 417, 2005.
- Freitas, J. M.; Augusto-Pinto, L.; Pimenta, J. R. *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Pathogens**, v. 2, n. 3, p. e24, 2006.
- Freitas, J.M.; Andrade, L.O.; Pires, S.F. *et al.*, 2009. The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting *Trypanosoma cruzi* strains. **PLoS One** v. 4, e5113.
- Gallerano, V.; Consigli, J.; Pereyra, S. *et al.* Chagas' disease reactivation with skin symptoms in a patient with kidney transplant. **International Journal of Dermatology**, v. 46, p. 607- 610, 2007.
- Gao, W.; Pereira, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Parasitology**, v. 32, p. 167- 170, 2002.
- Garcia, M. N.; Burroughs, H.; Gorchakov, R. *et al.* Molecular identification and genotyping of *Trypanosoma cruzi* DNA in autochthonous Chagas disease patients from Texas, USA. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p. 151- 156, 2017.
- Gascon, J.; Bern, C.; Pinazo, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**. v. 115, n. 1, p. 22- 27, 2010.
- Gatti, L. L.; Burbano, R. R.; Zambaldi- Tunes M. *et al* Interleukin-6 polymorphisms, *Helicobacter pylori* infection in adult Brazilian patients with chronic gastritis and gastric adenocarcinoma. **Archives of Medical Research**, v. 38, n. 5, p. 551- 555, 2007.
- Gazzinelli, R. T.; Oswald, I. P.; Hieny, S. *et al.* The microbicidal activity of interferon- gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves a 1- arginine- dependent, nitrogen oxide- mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- beta. **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 2501- 2506, 1992.
- Gluckstein, D.; Ciferri, F.; Ruskin, J. *et al.* Chagas' disease: another cause of cerebral mass in the acquired immunodeficiency syndrome. **The American Journal of Medicine**, v. 92, p. 429- 432, 1992.
- Goldstein, D. B. E.; Pollock, D. D. Launching microsatellites: a review of mutation process and methods of phylogenetic inference. **Journal of Heredity**, v. 88, p. 335- 342, 1997.
- Golgher, D. & Gazzinelli, R.T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, v. 37, p. 399- 409, 2004.
- Gomes, Y. M. Diagnóstico Etiológico. In: Malta J. (Org). Doença de Chagas. São Paulo: **Editora Savier**, p. 119- 132, 1996.
- Gomes, M. L.; Macedo, A. M.; Vago, A. R.; Pena, S. D.; Galvão, L. M.; Chiari, E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. **Experimental Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 28- 33, 1998.
- Gomes, M. L; Galvão, L. M.; Macedo, A. M. *et al.* Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 205- 210, 1999.

- Gomes, M. L.; Toledo, M. J.; Nakamura, C. V. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: genetic group with peculiar biochemical and biological behavior. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 649- 54, 2003.
- Gomes, J. A. *et al.* Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 7960- 7966, 2005.
- Gomes, Y.M.; Lorena, V. M. B.; Luquetti, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, s. 1, p. 115-121, 2009.
- Gomez, C. A.; Banaei, N. *Trypanosoma cruzi* reactivation in the brain. **The New England Journal of Medicine**, v. 378, p. 1824, 2018.
- Gray, E. B.; La Hoz, R. M.; Green, J. S. Reactivation of Chagas disease among heart transplant recipients in the United States, 2012-2016. **Transplant Infectious Disease**, v. 20, e12996, 2018.
- Grimm, M.; Rinaldi, M.; Yonan, N. A. Superior prevention of acute rejection by tacrolimus vs. cyclosporine in heart transplant recipients- a large European trial. **American Journal of Transplantation**, v. 6, n. 6, p. 1387- 1397, 2006.
- Guedes, P. M. M.; Gutierrez, F. R. S.; Maia, Flavia L. *et al.* IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 4, p. 1- 11, 2010.
- Guerri-Guttenberg, R. A.; Ciannameo, A.; Di Girolamo, C. *et al.* Chagas disease: an emerging public health problem in Italy? **Le Infezioni in Medicina**, v. 17, n. 1, p. 5- 13, 2009.
- Guiang, K. M. U.; Cantey, P.; Montgomery, S. P. *et al.* Reactivation of Chagas disease in a bone marrow transplant patient: case report and review of screening and management. **Transplant Infectious Disease**; v. 15, p. e264- 67, 2013.
- Gutierrez, F.R. *et al.* The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, v. 31, 673- 685, 2009.
- Gwechenberger, M.; Mendoza, L. H.; Youker, K. A. *et al.* Cardiac myocytes produce Interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. **Basic Science Reports**, p. 546- 551, 1999.
- Henderson, S. T. & T. D. Petes. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 6, p. 2749- 2757, 1992.
- Hermann, E.; Truyens, C.; Alonso-Vega, C. *et al.* Human fetuses are able to mount an adult like CD8 T-cell response. **Blood**, v.100, p. 2153- 2158, 2002.
- Hermann, E.; Truyens, C.; Alonso-Vega, C. *et al.* 2004. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon-gamma in response to parasite antigens. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1274- 1281.
- Herrera, C.; Bargues, M. D.; Fajardo, A. *et al.* Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 535- 539, 2007.
- Herwaldt, B. L.; Grijalva, M. J.; Newsome, A. L. *et al.* Use of polymerase chain reaction to diagnose the fifth reported US case of autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, in Tennessee, 1998. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 395- 399, 2000.
- Hoare, C.A. Morphological and taxonomic studies mammalian trypanosomes X. Revision of the systematics. **Journal of Protozoology**, v. 11, p. 200, 1964.
- Hoffmann, S. C.; Stanley, E. M.; Cox, E. D. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. **American Journal of Transplantation**, v. 2, n. 6, p. 560- 567, 2002.
- Hopkins, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Leg Méd**, 2002.
- Hulsmans, M.; Sager, H. B.; Roh, J. D. *et al.* Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 2, p. 423- 440, 2018.
- Hutchinson, I. V.; Turner, D. M.; Sankaran, D. *et al.* Influence of cytokine genotypes on allograft rejection. **Transplantation Proceedings**. v. 30, p. 862- 863, 1998.

- Huth, C., *et al.*, Joint analysis of individual participants' data from 17 studies on the association of the IL6 variant -174 G>C with circulating glucose levels, interleukin-6 levels, and body mass index. **Annals of Medicine**, v. 41, n. 2, p. 128- 138, 2009.
- Imai, K.; Maeda, T.; Sayama, Y. *et al.* Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 20, p. 146- 148, 2014.
- Jackson, Y.; Gétaz, L.; Wolff, H.; Holst, M.; Mauris, A. *et al.* Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. e592, 2010.
- Juiz, N. A.; Solana, M. E.; Acevedo, G. R. *et al.* Different genotypes of *Trypanosoma cruzi* produce distinctive placental environment genetic response in chronic experimental infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005436>, 2017.
- Junqueira, C.; Caetano, B.; Bartholomeu, D. C. *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12. e29, 2010.
- Karimi, M. H.; Daneshmandi, S.; Pourfathollah, A. A. Association of IL-6 promoter and IFN- γ gene polymorphisms with acute rejection of liver transplantation. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 4437- 4443, 2011.
- Kawashita, S. Y.; Sanson, G. F. O.; Fernandes, O.; Zingales, B.; Briones, M. R. S.; Maximum-likelihood divergence data estimates based on *rRNA* gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 2250- 2259, 2001.
- Keen, L. J. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. **Transplant Immunology**, v. 10, p. 143- 146, 2002.
- Keller, C.; Steensberg, A.; Pilegaard, H. *et al.* Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. **FASEB Journal**, v. 15, p. 2748- 2750, 2001.
- Kiszel, P.; Makó, V.; Prohászka, Z.; Cervenak, L. Interleukin-6 – 174 promoter polymorphism does not influence IL-6 production after LPS and IL-1 β stimulation in human umbilical cord vein endothelial cells. **Cytokine**, v. 40, n. 1, p. 17– 22, 2007.
- Knapik, E. W.; Goodman, A.; Ekker, M. *et al.* A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). **Nature Genetics**, v. 8, p. 338- 343, 1998.
- Kobashigawa, J. A.; Patel, J.; Furukawa, H. *et al.* Five-year results of a randomized, single-center study of tacrolimus vs microemulsion cyclosporine in heart transplant patients. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 25, n. 4, p. 434- 439, 2006;
- Kohl, S.; Pickering, L. K.; Frankel, L. S. *et al.* Reactivation of Chagas' disease during therapy of acute lymphocytic leukemia. **Cancer**, v. 50, p. 827- 828, 1982.
- Komatsu, Y.; Galicia, J. C.; Kobayashi, T. Association of interleukin-1 receptor antagonist +2018 gene polymorphism with Japanese chronic periodontitis patients using a novel genotyping. **International Journal of Immunogenetics**, v. 35, p. 165- 170, 2008.
- Kocher, C.; Segerer, S.; Schleich, A. *et al.* Skin lesions, malaise, and heart failure in a renal transplant recipient. **Transplant Infectious Disease**, v. 14, p. 391- 397, 2012.
- Korn, T.; Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p 485- 517, 2009.
- Kransdorf, E. P.; Czer, L. S. C.; Luthringer, D. J. *et al.* Heart Transplantation for Chagas Cardiomyopathy in the United States American. **Journal of Transplantation**, v. 13, p. 3262- 3268, 2013.
- Kubistova, S.; Mrazek, F.; Petrek, M. *et al.* Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic**, v. 153, p. 93- 102, 2009.
- Lages-Silva, E.; Ramirez, L. E.; Pedrosa, A. L. *et al.* Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2167- 2171, 2006.

- Lana, M.; da Silveira, P. A.; Barnabe, C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 20- 25, 1998
- Laranja, F. S.; Dias, E.; Nobrega, G.; Miranda, A. A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic. **Circulation of American Heart Association**, 1956. Disponível em: <http://circ.ahajournals.org/> Laranja *et al.*, 1956.
- Lee H.; Clark, B.; Gooi, H. C. *et al.* Influence of recipient and donor IL-1a, IL-4, and TNF α genotypes on the incidence of acute renal allograft rejection. **Journal of clinical pathology**, v. 57, p. 101- 103, 2004.
- Levinson, G. & G. A. Gutman. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in Escherichia coli K-12. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 13, p. 5323- 5338, 1987.
- Lewis, M. D.; Ma, J.; Yeo, M. *et al.* Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, 1041- 1049, 2009.
- Liempi, A.; Castillo, C.; Duaso, J. D. *et al.* *Trypanosoma cruzi* induces trophoblast differentiation: a potential local antiparasitic mechanism of the human placenta? **Placenta**, v.35, p. 1035-1042, 2014.
- Lima, R. J. A biópsia endomiocárdica no controle de rejeição em transplante cardíaco. **Revista da SOCERJ**, v. XV, n. 37, 2002.
- Litt, M.; Luty, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 397- 401, 1989.
- Long, C.S. The Role of Interleukin-1 in the Failing Heart. **Heart Failure Reviews**, v. 6, p. 81- 94, 2001.
- Lopes, R. D.; Batista Júnior, M. L.; Rosa, J. C. *et al.* Changes in the production of IL-10 and TNF- α in skeletal muscle of rats with heart failure secondary to acute myocardial infarction. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 3, p. 293- 300, 2010.
- López, L.; Arai, K.; Giménez, E. *et al.* C-reactive protein and Interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure. **Revista Española de Cardiología**, v. 59, p.50- 56, 2006.
- Lund, L. H.; Edwards, L. B.; Kucheryavaya, A.Y. *et al.* The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-second official adult heart transplantation report. **Journal Heart and Lung transplantation**, v. 34, n. 10, p. 1244- 1254, 2015.
- Luquetti, A. O.; Miles, M. A; Rassi, A. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 462- 470, 1986.
- Luquetti, A. O.; Rassi, A. Diagnóstico laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. ***Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas***, Editora Guanabara Koogan, 2ª edição, p. 344- 378, 2000.
- Macedo, A. M. & Pena, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitology Today**, v. 14, n. 3, p. 119- 124, 1998.
- Macedo, A. M., C. R. Machado, R. P. Oliveira and S. D. Pena. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 1- 12, 2004.
- Macedo, A. M. & Segatto, M. Implications of *Trypanosoma cruzi* intraspecific diversity in the pathogenesis of Chagas disease. In: Tibayrenc, M & Telleria, J. American Trypanosomiasis Chagas disease one hundred years of research. **Elsevier**, v. 1, p. 498- 522, 2010.
- Machado, F. S.; Martins, G. A.; Aliberti, J. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, n. 24, 3003- 3008, 2000.
- Machado, F. S.; Jelicks, L. A.; Kirchoff, L. V. *et al.* **Cardiology in Review**, v. 20, n. 2, p. 53- 65, 2012.

- Maldonado, C.; Albano, S.; Vettorazzi, L.; *et al.* Using polymerase chain reaction in early diagnosis of re-activated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation. **The Journal Heart and Lung transplantation**, v. 23, n. 12, p. 1345- 1348, 2004.
- Mangini, S.; Alves, B. R.; Silvestre, O. M. *et al.* Heart transplantation: review. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 2, p. 310- 318, 2015.
- Mantilla, J. C.; Zafra, G. A.; Macedo, A. M.; Gonzales, C. I. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. **Human Pathology**, v. 41, p. 610- 613, 2010.
- Marchiori, P. E.; Alexandre, P. L.; Britto, N. *et al.* Late reactivation of Chagas' disease presenting in a recipient as an expansive mass lesion in the brain after heart transplantation of chagasic myocardiopathy. **The Journal Heart and Lung transplantation**, v. 26, n. 11, p. 1091- 1096, 2007.
- Marcon, G. E. B.; Andrade, P. D.; de Albuquerque, D. M. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, p. 39- 43, 2002.
- Martell, J. Cytokines and their effects on transplant rejection. **American Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, p. 10- 11, 1999.
- Martins-Melo, F. R.; Ramos, A. N. Jr.; Alencar, C. H.; Heukelbach, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta- analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p. 167- 174, 2014.
- McDaniel, O.; Roten, P.; Yamout, S. Z. *et al.* Cytokine gene polymorphism might affect the outcome of clinical rejection in cardiac transplantation, **The Journal of Applied Research**, v. 4, n.1, p. 68- 80, 2004.
- Meira, W.S.F.; Galvão, L. M. C.; Gontijo, E. D. *et al.* *Trypanosoma cruzi* recombinant complemente regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3735- 3740, 2002.
- Melo, R. C. & Brener, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **Journal of Parasitology**, v. 64, n. 3, p. 475- 482, 1978.
- Milei, J.; Guerri-Guttenberg, R. A.; Grana, D. R. *et al.* Prognostic impact of Chagas disease in the United States. **American Heart Journal**, v. 157, n. 1, p. 22- 29, 2009.
- Miles, M. A.; Toye, P. J.; Oswald, S. C; Godfrey, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 217- 225, 1977.
- Miles, M. A.; Souza, A.; Povoá, M. *et al.* Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, n. 5656, p. 819- 821, 1978.
- Miles, M. A.; Povoá, M. M.; de Souza, A. A. *et al.* Chagas's disease in the Amazon Basin. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para State, north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 5, p. 667- 674, 1981.
- Miyazaki, Y.; Hamano, S.; Wang, S. *et al.* IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Immunology**, v. 185, p 1150- 1157, 2010.
- Montera, M.W.; Mesquita, E. T.; Colafranceschi, A. S. *et al.* I Diretriz Brasileira de Miocardites e Pericardites. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 4, s. 1, p. 1- 36, 2013.
- Moreira, P. R.; Costa, J. E.; Gomez, R. S.; Gollob, K. J.; Dutra, W. O. The IL1A (889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. **Journal of Periodontal Research**, v. 42, n. 1, p. 23- 30, 2007.
- Moreira, M. C.V. Hospital das Clínicas se destaca entre centros de transplante de coração. Nota da Assessoria de Imprensa Hospital das Clínicas da UFMG, 2011. Disponível em: <https://www.ufmg.br/online/arquivos/021819.shtml>

- Moreira, W. J. C. Caracterização molecular de populações de *Trypanosoma cruzi* presentes em amostras de coração de pacientes cardiopatas chagásicos submetidos a transplante cardíaco. **Monografia**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.
- Morel, C.; Chiari, E.; Camargo, E. P. *et al.* Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 11, p. 6810-6814, 1980.
- Moreno, P. L.; Wender, O. B.; Barra, M. Endomyocardial biopsy foretells ventricular function recovery after coronary artery bypass grafting. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, n. 5, 2004.
- Moreno, M.; D'Avila, D. A.; Silva, M. N. *et al.* *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 918- 924, 2010.
- MS. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 4, p. 475- 478, 2013.
- Neal, R. A. & Miles, M. A. Indirect hemagglutination test for Chagas' disease with a simples method survey work. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 12, p. 325- 332, 1970.
- Noedir, A. G. S.; Domingo, M. B. Euryclides de Jesus Zerbini: uma biografia. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 27, n. 1, 2012.
- Nogueira, L. G.; Frade, A. F.; Ianni, B. M. Functional IL18 polymorphism and susceptibility to chronic Chagas disease. **Cytokine**, v. 73, p. 79- 83, 2015.
- Normanton, M.; Marti1, L. C. Dados recentes em IL-17 e células Th17, e implicações na doença do enxerto contra hospedeiro. **Einstein**, v. 11, n. 2, p. 237- 246, 2013.
- O'Connor, W. Jr. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. **Nature Immunology**, v. 10, p. 603- 609, 2009.
- Oellerich, M. *et al.* Therapeutic drug monitoring of cyclosporine and tacrolimus. **Clinical Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 309- 16, 1998.
- Oliveira, R. P.; Broude, N. E.; Macedo, A. M. *et al.* Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 7, p. 3776- 3780, 1998.
- Oliveira, L. C.; Ramasawmy, R.; Borges, J. D. Frequency of single nucleotide polymorphisms of some immune response genes in a population sample from São Paulo, Brazil. **Einstein**, v. 9, n. 3, p. 359- 366, 2011.
- Oliveira, T. S. F.; Santos, B. N.; Galdino, T. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* I genotype among isolates from patients with chronic Chagas disease followed at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (FIOCRUZ, Brazil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.50, n.1, 2017.
- Onishi, R. M.; Gaffen, S. L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. **Immunology**, v. 129, p. 311- 321, 2010.
- Pan American Health Organization (PAHO). Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da Doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS, Rio de Janeiro, 2009.
- Park, H.; Li, Z.; Yang, X. O. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1069- 1070, 2005.
- Pedersen, B. K.; Petersen, A. M. The anti- inflamamatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 4, p. 1154- 1162, 2005.
- Pena, S. D.; Barreto, G.; Vago, A. R. *et al.* Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 5, p. 1946- 1949, 1994.
- Pena, S. D. J. Giuliano, D. P.; Fuchshuber-Moraes, M. *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS ONE**, v. 6, p. e.17063, 2011.
- Pittella, J. E. H.; Meneguette, C.; Barbosa, A. J.; Bambirra, E. A. Histopathological and immunohistochemical study of the brain in the acute and chronic phases of experimental

- trypanosomiasis cruzi in dogs. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 84, n. 6, p. 615-621, 1990.
- Plaza, D. M.; Fernandez, D.; Builes, M.; Villegas, A.; Garcia, L. F. Cytokine gene polymorphisms in heart transplantation: association of low IL-10 production genotype with Quilty effect. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 22, p. 851- 856, 2003.
- Portela-Lindoso, A. A. B. & Shikanai-Yasuda, M. A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Revista de Saúde Pública**, v.37, n.1, p. 107- 115, 2003.
- Porter, K. E.; Turner, N. A. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 123, n. 2, p. 255- 278, 2009.
- Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92- 100, 2001.
- Prestes, J.; Donatto, F. F.; Dias, R.; Frolinni, A. B.; Cavaglieri, C. R. Papel da Interleucina-6 como um sinalizador em diferentes tecidos durante o exercício físico. **Fitness & Performance Journal**, v.5, n. 6, p. 348- 353, 2006.
- Punukollu, G.; Gowda, R. M.; Khan, I. A. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology** 115(3): 279- 283, 2007.
- Ramirez, J.D; Tapia-Calle, G.; Munoz-Cruz, G. *et al.* *Trypanosome* species in neo-tropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 22, p. 250- 256, 2014.
- Rassi Jr, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, s. I, p. 152- 158, 2009.
- Rassi Jr, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas' disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388- 402, 2010.
- Reis, P. G.; Ayo, C. M.; de Mattos, L. C. *et al.* Genetic polymorphisms of *IL17* and Chagas disease in the South and Southeast of Brazil. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, Article ID 1017621, p. 1- 8, 2017.
- Rexrode, K. M.; Pradhan, A.; Mansos, J. E.; Buring, J.; Ridker, P. M. Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. **Annals of Epidemiology**, v. 13, p. 1- 9, 2003.
- Rey, L. **Parasitologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 856p, 2001.
- Riarte, A.; Luna, C.; Sabatiello, R. *et al.* Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989– 1996. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 561- 567, 1999.
- Risso, M. G.; Garbarino, G. B.; Mocetti, E. *et al.* Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 12, p. 2250- 2259, 2004.
- Rodrigues, C. M.; Valadares, H. M. S.; Francisco, A. F. Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, p. e846, 2010.
- Rozas, M.; Doncker, S.; Adai, V.; Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. **Journal of Infectious Diseases**, v. 195, p. 1381- 1388, 2007.
- Russomando, G.; Figueredo, A.; Almiron, M. *et al.* Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2864- 2868, 1992.
- Sankaran, D.; Asderakis, A.; Ashraf, S. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. **Kidney International**, v. 56, 281- 288, 1999.
- Santos, F. R.; Epplen, J. T.; Pena, S. D. Testing deficiency paternity cases with a Ylinked tetranucleotide repeat polymorphism. **EXS**, v. 67, p. 261- 265, 1993.
- Sartori, A. M.; Ibrahim, K. Y.; Nunes Westphalen, E. V. *et al.* Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 101, p. 31- 50, 2007.
- Schiavelli, R.; Maiolo, E.; Sabatiello, D. *et al.* Chagas disease and Kidney transplant. **World Transplant Congress Boston**. Abstract n. 1120, 2006.

- Schijman, A. G.; Vigliano, C.; Burgos, J. *et al.* Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 19, n. 11, 1114-1117, 2000.
- Schmunis, G. A. A Tripanosomíase Americana e seu impacto na Saúde Pública das Américas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editors. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 1- 15.
- Segatto, M.; Rodrigues, C. M.; Macedo, A. M. *et al.* LSSP-PCR of *Trypanosoma cruzi*: how the single primer sequence affects the kDNA signature. **BMC Research Notes**, v. 6, p. 174, 2013.
- Seiderer, J.; Elben, I.; Diegelmann, J. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 14, p. 437- 445, 2008.
- Silva, J. S. *et al.* Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, p. 169- 174, 1992.
- Silva, J.S. *et al.* Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 4862- 67, 1995.
- Silva, A. E., Silva, A. C.; Faleiros, A. C. *et al.* Acute Chagas' disease in postrenal transplant and treatment with benznidazole. **Annals Diagnostic Pathology**, v. 14, p. 199- 203, 2010.
- Simões, T. C.; Borges, L. F.; Parreira de Assis, A. C. *et al.* Chagas disease mortality in Brazil: A Bayesian analysis of age-period-cohort effects and forecasts for two decades. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006798, 2018.
- Simpson, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual Review of Microbiology** v.41, p.363-382, 1987.
- Smith, A. J. P.; Humphries, S. E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 20, p. 43- 59, 2009.
- Smith, K. & Marcos, L. A. Pathogenesis of Chagas Disease: an Emphasis for Transplant Patient Populations. **Current Tropical Medicine Reports**, disponível em <https://doi.org/10.1007/s40475-019-0168-8>, 2019.
- Solana, M. E.; Celentano, A. M.; Tekiel, V. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 102-106, 2002.
- Song, X.; Kusakari, Y.; Xiao, C. Y.; Kinsella, S. D.; Rosenberg, M. A, *et al.* mTOR attenuates the inflammatory response in cardiomyocytes and prevents cardiac dysfunction in pathological hypertrophy. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 299, p. 1256- 1266, 2010.
- Souto, R. P. & Zingales, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 62, n. 1, p. 45- 52, 1993.
- Souto, R. P.; Fernandes, O.; Macedo, A. M.; Campbell, D. A.; Zingales, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, n.2, p.141-152, 1996.
- Souza, M. M.; Franco, M.; Almeida, D. R. *et al.* Comparative histopathology of endomyocardial biopsies in chagasic and non-chagasic heart transplant recipients. **The Journal Heart and Lung transplantation**, v. 20, n. 5, p. 534- 543, 2001.
- Stewart, S.; Winters, G. L.; Fishbein, M. C. *et al.* Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. **The Journal Heart and Lung transplantation**, v. 24, n. 11, p.1710- 1720, 2005.
- Strasen, J.; Williams, T.; Ertl, G. *et al.* Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. **Clinical Research in Cardiology**, v. 103, n. 1, p. 1- 10, 2014.

- S Sturm, N. R.; Degrave, W.; Morel, C.; Simpson, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 205- 214, 1989.
- Tardin, O. M. A.; Velozo, M.; Bernardez, S. Study of genetic polymorphisms in heart failure (GenetIC): outline of the study and methodology. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro** v. 22, n. 1, p. 36-42, 2009.
- Taylor, D.; Edwards, L.; Aurora, P. *et al.* Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult heart transplant report. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 27, n. 9, p. 943- 56, 2008.
- Teixeira, A. R.; Arganaraz, E. R.; Freitas, L. H. *et al.* Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. **Mutation Research**, v. 305, n. 2, p. 197- 209, 1994.
- Teixeira, M. M.; da Silva, F. M.; Marcili, A. *et al.* Short communication: *Trypanosoma cruzi* lineage I in endomyocardial biopsy from a northeastern Brazilian patient at end-stage chronic Chagasic cardiomyopathy. **Tropical Medicine & International Health**, v. 11, n. 3, p. 294- 298, 2006.
- Thakkinstian, A.; Dmitrienko, S.; Gerbase-DeLima, M. Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, p. 3017- 3023, 2008.
- Thompson & Thompson Genética Médica. Editora: Elsevier; 8ª Edição. ISBN-13: 978-8535284003, 2016.
- Tibayrenc, M. & Ayala, F. J. Isoenzyme variability of *T. cruzi*. The agent of Chagas' disease: Genetical, taxonomic and epidemiological significance. **Evolution**, v. 42, p. 277- 292, 1988.
- Tibayrenc, M. & Ayala, F. J. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitology Today**, v. 7, n. 9, p. 228- 232, 1991.
- Tibayrenc, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 85- 104, 1998.
- Tibayrenc, M.; Barnabé, C.; Telleria, J. Reticulate Evolution in: Medical and Epidemiological Implications. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. American trypanosomiasis: Chagas disease One hundred years of research. Burlington: **Elsevier**, p. 475- 488, 2010.
- Toledo, M. J.; Bahia, M. T.; Carneiro, C. M. *et al.* Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 223- 230, 2003.
- Torres, O. A. Lack of association between IL-6 -174G/C gene polymorphism and Chagas disease. **Tissue antigens**, p. 1- 4, 2010a.
- Torres, O. A. Calzada, J.E.; Beraún Y. *et al.* Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 682- 685, 2010b.
- Traina, M.I.; Sanchez, D. R.; Hernandez, S. *et al.* Prevalence and impact of Chagas disease among Latin American immigrants with nonischemic cardiomyopathy in Los Angeles California. **Circulation: Heart Failure**, v. 8, n. 5, p. 938- 943, 2015.
- Trevilatto, P. C.; Pardo, A. P. S.; Scarel-Caminaga, R. M. Association of IL1 gene polymorphisms with chronic periodontitis in Brazilians. **Archives of oral biology**, v. 56, p. 54- 62, 2011.
- Turner, D.; Grant, S. C.; Yonan, N. *et al.* Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. **Transplantation**, v. 64, n. 5, p. 776- 779, 1997a.
- Turner, D. M.; Williams, D. M., Sankaran, D. An investigation of polymorphism in the interleukin- 10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics**, v. 24, p. 1- 8, 1997b.
- Turner, S.; Loren L.; Armstrong, Y. Quality control procedures for genome wide association studies. **Current Protocols in Human Genetics**, u. 1.19, p. 1- 24, 2012.

- Vacas, A. S.; Gomez- Santana, L.V.; Torre, A. C. *et al.* Reactivation of Chagas- Mazza disease during treatment with infliximab. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, p. 899- 900, 2017.
- Vago, A. R.; Macedo, A. M.; Oliveira, R. P. *et al.* Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **American Journal of Pathology**, v. 149, n. 6, p. 2153- 2159, 1996.
- Vago, A. R.; Andrade, L. O.; Leite, D. *et al.* Genetic characterization of *T. cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1805- 1809, 2000.
- Vago, A. R.; Silva, D. M.; Adad, S. J. *et al.* Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the esophagus of patients without mega esophagus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 308- 309, 2003.
- Valadares, H. M. S. Análises populacionais em *Trypanosoma cruzi* baseados em microssatélites polimórficos de DNA. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- Valadares, H. M.; Pimenta, J. R.; de Freitas, J. M. *et al.* Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 7, p. 839- 850, 2008.
- Valente, S. A.; Valente, V. C.; Pinto, A. Y. N. *et al.* O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 291- 297, 2009.
- Vamvakopoulos, J. E.; Taylor, C. J.; Green, C. *et al.* Interleukin 1 and chronic rejection: possible genetic links in human heart allografts. **American Journal of Transplantation**, v. 2, n. 1, p. 76- 83, 2002.
- Vanaudenaerde, B. M.; Dupont, L. J.; Wuyts, W. A. *et al.* The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation. **European Respiratory Journal**, v. 27, p. 779- 787, 2006.
- Vicenová, B.; Vopálenský, V.; Burýsek, L.; Pospíšek, M. Emerging role of interleukin-1 in cardiovascular diseases. **Physiological Research**, v. 58, p. 481- 498, 2009.
- Virreira, M.; Torrico, F.; Truyens, C. *et al.* Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 5, p. 574- 582, 2003.
- Virreira, M.; Alonso-Vega, C.; Solano, M. *et al.* Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 871- 879, 2006.
- Visentainer, J. E.; Sell, A. M.; da Silva, G. C.; Cavichioli, A. D. TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFβ1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. **International Journal of Immunogenetics**, v. 35, n. 4, p. 287- 293, 2008.
- Vitelli-Avelar, D.M. *et al.* Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, n. 5, p. 516- 525, 2008.
- Voller, A.; Draper, C. C.; Bidwell, D. E.; Aertlett, A. Microplate enzyme-linked immunoabsorbent assay for Chagas' disease. **Lancet**, v. 1, p. 426- 429, 1975.
- Volpato, F. C. Z.; Sousa, G. R.; D'Ávila, D. A.; Galvão, L. M. C. Combined parasitological and molecular-based diagnostic tools improve the detection of *Trypanosoma cruzi* in single peripheral blood samples from patients with Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 50, n. 4, p. 506- 515, 2017
- Weber, A.; Wasiliew, P.; Kracht, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Science Signaling**, v. 3, n. 195, 2010.
- Weber, J. L.; David, D.; Heil, J. *et al.* Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v. 71, n. 4, p. 854- 862, 2002.
- Welsh, J. & M. McClelland. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 24, p. 7213- 7218, 1990.

- Williams, J. G.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531- 6535, 1990.
- Wincker, P.; Britto, C.; Pereira, J. B; Cardoso, M. A. W.; Oelemann, *et al.* Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *T. cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 6, p. 771- 777, 1994.
- World Health Organization. Special programme for research and training in tropical diseases. Report of scientific group in Chagas disease, p. 17- 20, 2007.
- World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). **Weekly Epidemiological Record**, v. 85, n. 34, p. 334- 336, 2010.
- World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **The Weekly Epidemiological Record**, v. 90, p. e33- 43, 2015.
- Yamauchi-Takahara, K.; Ihara, Y.; Ogata, A. *et al.* Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. **Circulation**, v. 91, p. 1520- 1524, 1995.
- Yasukawa, K.; Patel, S. M.; Flash, C. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 1, p. 84- 85, 2014.
- Zafra, G.; Morillo, C.; Martín, Javier. González, A.; González, C. I. Polymorphism in the 3'UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1049- 1052, 2007.
- Zhang, L.; Tarleton. R. L. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 1, p. 102- 109, 1996.
- Zingales, B.; Stolf, B. S.; Souto, R. P.; Fernandes, O.; Briones, M. R.; Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, s. 1, 159- 164, 1999.
- Zingales, B.; Andrade, S. G.; Briones, M. R., *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051- 1054, 2009.
- Zingales, B. *Trypanosoma cruzi*: one parasite, two parasites or several parasites of Chagas disease? **Revista da Biologia**, v. 6, p. 44- 48, 2011.
- Zingales, B.; Miles, M. A.; Campbell, D. A. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240- 253, 2012.