

PAULO HERNANE RABELO AZEVEDO

**VALIDAÇÃO DE ANTISSORO PARA USO EM
IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Belo Horizonte

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia
Mestrado – Área de Concentração em Patologia Médica

VALIDAÇÃO DE ANTISSORO PARA USO EM
IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE
TRYPANOSOMA CRUZI

PAULO HERNANE RABELO AZEVEDO

Belo Horizonte

2018

PAULO HERNANE RABELO AZEVEDO

**VALIDAÇÃO DE ANTISSORO PARA USO EM
IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para a obtenção
do Título de Mestre em Patologia.**

**Orientador: Prof. Geraldo Brasileiro
Filho**

Belo Horizonte

2018

A994v **Azevedo, Paulo Hernane Rabelo.**
Validação de antissoro para uso em imuno- histoquímica para detecção de Trypanosoma cruzi [manuscrito]. / Paulo Hernane Rabelo Azevedo. -- Belo Horizonte: 2018.
40f.: il.
Orientador: Geraldo Brasileiro Filho.
Área de concentração: Patologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Infecção. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Anticorpos. 4. Soros Imunes. 5. Imuno-Histoquímica. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Brasileiro Filho, Geraldo. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WC 705

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me ungido de graças.

Aos meus pais, por terem acreditado sempre e não medirem esforços para pavimentar o meu caminho de conforto e sabedoria.

A Paula, minha amada esposa, por ser meu porto seguro quando sempre preciso.

A Augusto e Marina, por terem mostrado o sentido de tudo.

Ao meu irmão, Luiz Henrique, por ter sido o melhor companheiro de todas as horas.

Ao meu orientador, Professor Geraldo Brasileiro Filho, por me manter sempre motivado e ser exemplo de dedicação à docência.

Aos professores, preceptores, colegas e funcionários do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, pelos ótimos momentos de aprendizado e convivência.

Aos Professores Marcelo Pascoal, Cláudia Carneiro e Glenda Nicioli, pelo conhecimento compartilhado e pelo grande apoio para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Introdução: O diagnóstico de infecção pelo *T. cruzi* é essencial em muitas situações, sobretudo nos casos de reinfecção, como acontece em indivíduos transplantados cardíacos. Seu diagnóstico pode ser confirmado pelo encontro de ninhos do *T. cruzi* em amostras diversas, como a biópsia endomiocárdica (BEM) para avaliar rejeição ao enxerto. Como são escassos, tais ninhos nem sempre são identificados rotineiramente. Para aumentar a sensibilidade desse diagnóstico, a imuno-histoquímica (IHQ) pode ser promissora.

Objetivo: Validar antissoro (anticorpo policlonal) para detectar, pela IHQ, infecção pelo *T. cruzi*.

Métodos: Foram empregados: 1) controles positivos (CP): 13 BEM, 12 biópsias de pele e 1 coração com ninhos de *T. cruzi* em cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE); 2) controles negativos (CN): a) 10 corações explantados e 10 BEM sem ninhos de amastigotas nem sinais clínicos ou laboratoriais de infecção chagásica; b) 5 biópsias de pele e 1 biópsia de intestino com leishmaniose; 3) Casos: 31 BEM de pacientes chagásicos sem ninhos do parasito à HE e sabidamente positivos por PCR para DNA do *T. cruzi*. Como anticorpo primário na IHQ, usou-se soro hiperimune de coelhos infectos pelo *T. cruzi*.

Resultados: Houve marcação IHQ em 21 dos 26 CP (80,8%) e em 1 caso de leishmaniose cutânea. Os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram, respectivamente, 80,8%, 96,2%, 95,5% e 83,3%. Em 4 das 31 amostras selecionadas como casos (12,9%) foram identificados ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* pela reação imuno-histoquímica, não reconhecidos ao exame histológico convencional.

Conclusões: Os resultados do estudo mostram que IHQ com o antissoro testado aumenta a sensibilidade do diagnóstico e recomendam seu emprego rotineiro na avaliação de BEM de transplantados cardíacos com doença de Chagas.

ABSTRACT

Introduction: The diagnosis of *T. cruzi* infection is essential in many situations, especially in cases of reinfection in individuals with cardiac transplants. Its diagnosis can be confirmed by finding *T. cruzi* nests in different samples, such as the endomyocardial biopsy (EMB) to evaluate graft rejection. Because they are scarce, such nests are not always identified routinely. To increase the sensitivity of this diagnosis, immunohistochemistry (IHC) may be promising.

Objective: To test an antiserum for detecting *T. cruzi* in histological sections by IHC.

Methods: We used: 1) positive controls (PC): 13 EMB, 12 skin biopsies and 1 heart with *T. cruzi* nests in sections stained with hematoxylin-eosin (HE); 2) negative controls: a) 10 explanted hearts and 10 EMB without amastigotes nests nor clinical or laboratory signs of chagasic infection; b) 5 skin biopsies and 1 intestinal biopsy with leishmaniasis; 3) Cases: 31 EMB of chagasic patients without parasite nests in HE sections and positive by PCR for *T. cruzi* DNA. As a primary antibody in IHC, hyperimmune serum from *T. cruzi*-infected rabbits was used.

Results: IHC was positive in 21 of the 26 PC (80,8%) and in 1 case of cutaneous leishmaniasis. Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were, respectively, 80.8%, 96.2%, 95.5% and 83.3%. In 4 of the 31 cases (12.9%), IHC revealed *T. cruzi* nests not recognized by conventional histological examination.

Conclusions: The results of the study show that IHC using the tested antiserum increases the sensitivity of the diagnosis and recommend its routine use in the evaluation of EMB of cardiac transplanted patients with Chagas' disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A: Biópsia endomiocárdica mostrando infiltrado inflamatório linfocitário com agressão aos miocardiócitos. Hematoxilina e eosina, 200x. **B:** Biópsia endomiocárdica com ninho de formas amastigotas de *T. cruzi* no citoplasma de miocardiócito. Hematoxilina e eosina. 1.000x. 14

Figura 2. A, B e C: Biópsias endomiocárdicas mostrando ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* no citoplasma de miocardiócitos. Hematoxilina e eosina, 1.000x. **D, E e F:** Formas amastigotas de *T. cruzi* marcadas pela reação imuno-histoquímica com anticorpo policlonal anti-*T. cruzi*. 1.000x 26

Figura 3. A: Biópsia de pele mostrando ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* no citoplasma de macrófagos (setas). Hematoxilina e eosina, 400x. No detalhe, ampliação do campo para evidenciar o parasito. Hematoxilina e eosina, 1.000x. **B:** Formas amastigotas de *T. cruzi* marcadas pela reação imuno-histoquímica com anticorpo policlonal anti-*T. cruzi*. 400x. 27

Figura 4. A: Biópsia de pele com diagnóstico clínico e imuno-histoquímico de leishmaniose cutânea mostrando formas amastigotas do parasito dispersas no interstício, marcadas pela reação imuno-histoquímica com anticorpo anti-*T. cruzi* (setas). 400x. No detalhe, ampliação do campo para evidenciar a marcação de formas amastigotas. 1000x. **B:** Mesma biópsia e topografia do caso mostrado em A, evidenciando formas amastigotas de leishmânia marcadas pela reação imuno-histoquímica com anticorpo anti-leishmânia. 29

Figura 5. A, B e C: Biópsias endomiocárdicas sem evidência de ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* ao exame histopatológico em HE. 200x. **D, E e F:** Mesmas biópsias e topografias das figuras 5A, 5B e 5C, respectivamente, com formas amastigotas de *T. cruzi* marcadas pela reação imuno-histoquímica com anticorpo policlonal anti-*T. cruzi* (setas). 200x. No detalhe, ampliação do campo evidenciando a marcação de formas amastigotas. 1.000x. 30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Sequência dos iniciadores na PCR para identificação de kDNA do *T. cruzi*. 23
- Tabela 2:** Resultados de detecção do *T. cruzi* por reação de cadeia de polimerase (PCR), histologia convencional em hematoxilina e eosina (HE) e reação imuno-histoquímica (IHQ) dos controles positivos, controles negativos e casos. 25
- Tabela 3:** Controles positivos. Resultados de detecção do *T. cruzi* por reação de cadeia de polimerase (PCR), histologia convencional em hematoxilina e eosina (HE) e reação imuno-histoquímica (IHQ). 27
- Tabela 4:** Controles negativos. Resultados de detecção do *T. cruzi* por reação de cadeia de polimerase (PCR), histologia convencional em hematoxilina e eosina (HE) e reação imuno-histoquímica (IHQ). 28
- Tabela 5:** Casos. Resultados de detecção do *T. cruzi* por reação de cadeia de polimerase (PCR), histologia convencional em hematoxilina e eosina (HE) e reação imuno-histoquímica (IHQ). 29
- Tabela 6:** Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) para o teste imuno-histoquímico com anticorpo anti-*T. cruzi*. 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BEM = Biópsias endomiocárdicas

CN = Controle negativo

COBEA = Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COEP = Comitê de Ética em Pesquisa

CP = Controle positivo

HC-UFMG = Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

HE = Hematoxilina e eosina

IHQ = Imuno-histoquímica

NYHA = New York Heart Association

PCR = Reação em cadeia de polimerase

SIV = Septo interventricular

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

UFOP = Universidade Federal de Ouro Preto

VE = Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVAS	16
3 OBJETIVO	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Critérios de seleção, inclusão e exclusão de amostras	18
4.1.1 Controles positivos	18
4.1.2 Controles negativos	19
4.1.3 Casos	19
4.2 Biópsias endomiocárdicas (BEM)	20
4.3 Estudo histopatológico	20
4.4 Estudo imuno-histoquímico	20
4.4.1 Reação com anticorpo anti-T. cruzi	20
4.4.1.1 Preparação do anticorpo	20
4.4.1.2 Reação imuno-histoquímica	21
4.4.2 Reação com anticorpo anti-leishmânia	22
4.5 Reação em cadeia de polimerase	22
4.5.1 PCR kDNA	22
4.5.2 PCR em tempo real do gene rDNA 24S α	23
4.6 Determinação da sensibilidade, da especificidade e dos valores preditivos positivo e negativo do teste	23
4.7 Considerações éticas	24
5 RESULTADOS	25
5.1 Controles positivos	26
5.2 Controles negativos	28
5.3 Casos	29
5.4 Análise estatística	30
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÕES	35
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXO A	40

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma infecção parasitária sistêmica crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, descoberto por Carlos Justiniano Ribeiro Chagas em 1909 (1). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), trata-se de uma das mais importantes doenças negligenciadas no mundo (2). Estima-se cerca de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas no mundo, sobretudo na América Latina (3).

No Brasil, apesar dos bem-sucedidos programas de controle da transmissão do agente etiológico pelas vias vetorial e transfusional nas últimas décadas (4), parcela considerável da população brasileira (cerca de 3 a 4 milhões de indivíduos) está infectada pelo parasito e sob risco de desenvolver as lesões graves da doença.

Além da transmissão do parasito nos locais onde as pessoas vivem, um condicionante social para a transmissão do *T. cruzi* aos humanos são as migrações não controladas, que desafiam o controle de novos casos em países não endêmicos (5-7) e em áreas urbanas de países endêmicos (8).

Cerca de 60 a 70% dos indivíduos infectados não desenvolvem doença clinicamente aparente (forma indeterminada). Os restantes 30 a 40% apresentam uma forma anatomoclínica de doença crônica, isto é, cardíaca, digestiva (megaesôfago e/ou megacólon) ou cardiodigestiva, em geral 10 a 30 anos após a infecção inicial.

A cardiopatia chagásica crônica é a manifestação mais grave e mais frequente da doença de Chagas crônica. Acomete 20 a 30% dos indivíduos infectados e constitui causa importante de morbidade e mortalidade, pois muitos indivíduos tornam-se incapacitados para as suas atividades habituais e falecem por causa de insuficiência cardíaca progressiva e suas complicações (9).

Cerca de 10% dos pacientes com insuficiência cardíaca secundária à doença de Chagas progride para a classe funcional IV da New York Heart Association (NYHA) (10). Nesse estágio, o transplante cardíaco é uma das modalidades terapêuticas há cerca de duas décadas, sendo o único capaz de modificar a progressão natural da doença (11). Em Belo Horizonte, tal procedimento vem sendo realizado desde a década passada; no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), é feito desde 2006. Em pouco mais de

uma década, aproximadamente 250 transplantes cardíacos foram realizados no HC-UFGM, dos quais cerca de 40% em pacientes com doença de Chagas.

Além das complicações próprias dos transplantes de órgãos sólidos, na doença de Chagas existe outro potencial agravante, que é a reativação da infecção chagásica em razão do tratamento imunossupressor que os pacientes recebem para evitar rejeição do enxerto (12). Reativação da doença de Chagas em pacientes com imunidade celular deprimida foi descrita já na década de 1960 (13).

Em certo número de casos, a suspeita clínica de reativação da infecção pelo *T. cruzi* em indivíduos transplantados surge pelo aparecimento de lesões cutâneas (paniculite) bastante sugestivas. Outras manifestações de reativação são miocardite com sinais de insuficiência cardíaca, febre, fadiga, anorexia, diarreia, meningite, encefalite e acidente vascular cerebral (14-17).

A presença do *T. cruzi* circulante é definida como critério parasitológico para o diagnóstico de infecção aguda e de reativação da doença de Chagas pelo II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, podendo ser demonstrada por vários métodos (18). De forma mais eficaz, seu DNA pode ser detectado por meio de técnicas de biologia molecular, sobretudo a reação em cadeia de polimerase (PCR) a partir do sangue ou de amostras de biópsias endomiocárdicas (BEM) (19). A PCR torna-se positiva poucos dias ou semanas antes dos testes parasitológicos tradicionais e antes dos sinais clínicos de reativação (20,21). No entanto e devido a sua alta sensibilidade, o resultado a partir de PCR em amostras de sangue deve ser interpretado com precaução em indivíduos com doença de Chagas crônica, pois o teste pode ser positivo em pessoas imunocompetentes ou imunocomprometidas sem sinais clínicos de reativação (22).

As BEM, feitas rotineiramente após o transplante, têm por objetivo avaliar a existência de rejeição imunitária ao enxerto e determinar a sua intensidade. O patologista deve identificar e graduar a rejeição aguda em ausente, discreta, moderada e acentuada, respectivamente 0, 1R, 2R e 3R. Essa graduação é feita com base nos aspectos histopatológicos observados nas BEM como número de focos e padrão do infiltrado inflamatório, lesão de miocardiócitos, edema, hemorragia e vasculite (23). Nesses mesmos fragmentos, a avaliação histopatológica convencional pode identificar não só os sinais de rejeição como também ninhos de amastigotas do *T. cruzi*, confirmando a reativação da infecção no órgão implantado (24, 25)

(Figura 1). Contudo, como tais ninhos são pequenos e muito escassos, nem sempre são identificados nos exames rotineiros. Para aumentar a sensibilidade do método morfológico, a imuno-histoquímica pode ser promissora, uma vez que permite a identificação mais precisa de ninhos esparsos e muito pequenos.

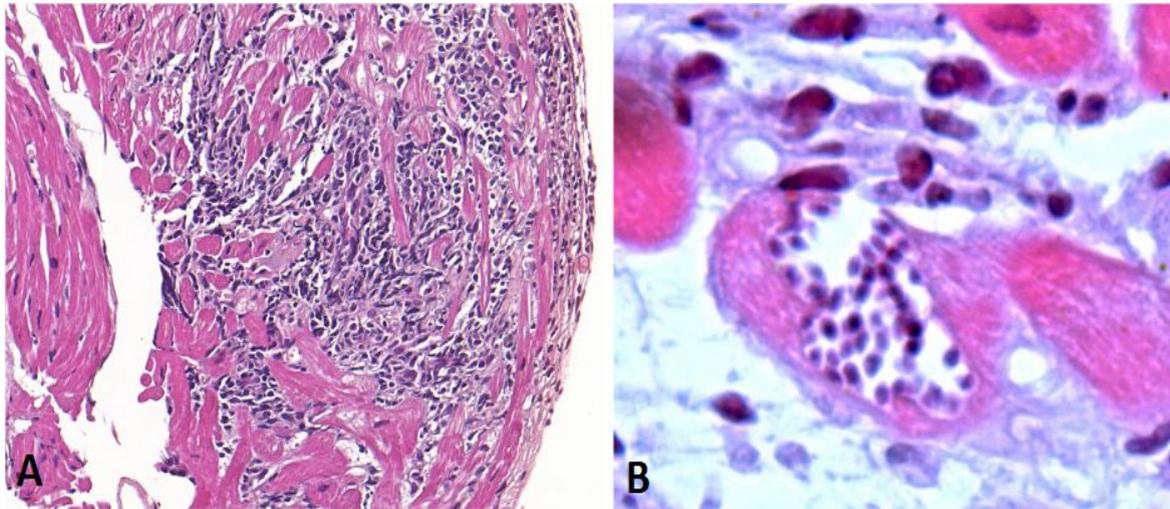


Figura 1. A: Biópsia endomiocárdica mostrando infiltrado inflamatório linfocitário com agressão aos miocardiócitos. Hematoxilina e eosina, 200x. **B:** Biópsia endomiocárdica com ninho de formas amastigotas de *T. cruzi* no citoplasma de miocardiócito. Hematoxilina e eosina, 1.000x.

A avaliação morfológica rotineira de BEM após-transplante cardíaco faz parte do protocolo de atendimento a esses pacientes e tem enorme importância prática, tanto para orientar o tratamento imunossupressor, nos casos de rejeição aguda, como para detectar possível reativação da infecção chagásica e consequente indicação do tratamento antiparasitário específico. Nesses dois cenários com condutas clínicas tão distintas, o patologista pode contribuir para o diagnóstico de reativação. Entretanto, há evidente dificuldade em se fazer o diagnóstico diferencial entre rejeição aguda moderada/acentuada e reativação da infecção chagásica, haja vista o infiltrado inflamatório em ambas condições ser morfológicamente indistinguível.

O método imuno-histoquímico vem sendo utilizado para detecção de antígenos do *T. cruzi* (26) e facilita a identificação dos parasitos, sobretudo de ninhos pequenos, quando comparado ao exame anatomopatológico convencional (27).

Estudos anteriores demonstraram que antissoro policlonal anti-*T. cruzi* evidencia o parasito tanto em tecidos humanos quanto de outros animais. As maiores taxas de detecção foram observadas na fase aguda da doença e nos casos de fase crônica com inflamação em atividade (28, 29, 30). A taxa de detecção em amostras de coração é maior do que em amostras de cérebro (31). Maior detecção do parasito foi encontrada nos casos em que havia processo inflamatório moderado ou acentuado (32).

Considerando a perspectiva do uso da imuno-histoquímica para o diagnóstico da doença de Chagas, particularmente da reativação pós-transplante cardíaco, um antissoro foi desenvolvido pelo grupo de Pesquisas em Doenças de Chagas do instituto de Ciências Exatas e Biológicas da UFOP. Tal antissoro ainda não foi testado em amostras humanas e, portanto, necessita ser validado para uso clínico.

2 JUSTIFICATIVAS

Apesar do potencial da imuno-histoquímica na detecção da reativação da infecção chagásica, não há no mercado anticorpos disponíveis para essa finalidade. Essa situação decorre, provavelmente, do pouco interesse das empresas de tecnologia em disponibilizar tal anticorpo, uma vez que ele tem importância apenas nos países onde a doença de Chagas é mais prevalente e demanda mais insumos. O reconhecimento de reativação da infecção chagásica, o mais precocemente possível, é algo muito importante na conduta com os pacientes, pois o tratamento com medicamentos específicos pode melhorar a evolução dos casos. Por essas razões, a obtenção de anticorpo para emprego na imuno-histoquímica tem grande interesse científico e na prática assistencial. Testar antissoros (anticorpo policlonal) para avaliar a sua eficácia para tal finalidade constitui o presente estudo.

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é validar anticorpo policlonal anti-*T. cruzi* produzido em instituição de pesquisa científica para o diagnóstico imuno-histoquímico da infecção pelo *T. cruzi* e determinar a sensibilidade e a especificidade do método.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Critérios de seleção, inclusão e exclusão de amostras

O Serviço de Transplantes Cardíacos do HC-UFMG presta assistência aos pacientes com insuficiência cardíaca terminal há 12 anos. De 2006 a 2018, 81 pacientes com cardiopatia chagásica foram submetidos ao transplante cardíaco. Neste estudo, foram inicialmente revisados todos os laudos anatomopatológicos realizados no Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFMG (no período de 2007 a 2014), que compreendem 81 peças cirúrgicas de explante cardíaco, 823 BEM, 18 biópsias de pele/subcutâneo com suspeita de chagoma de reativação, 15 biópsias não relacionadas diretamente ao transplante (biópsias de medula óssea, pleura, pericárdio, esofagite por cândida, duodenite citomegálica, linfoma cutâneo e encéfalo) e 1 necrópsia de paciente chagásico falecido após o transplante. Como controles negativos, foram selecionadas amostras (coração, pele e outros) de pacientes sem sinais clínicos nem laboratoriais de infecção pelo *T. cruzi*.

Amostras de BEM com material insuficiente para aquisição de novos cortes histológicos e/ou para extração de DNA para PCR foram excluídas do estudo.

Todos os casos selecionados foram revistos pelo autor e seu orientador para confirmação ou não da presença de ninhos de amastigotas do parasito. Durante a revisão das lâminas, houve discordância em 5 casos quanto à presença do parasito ao exame histopatológico em HE. A presença do parasito foi descartada em 2 casos em que o primeiro diagnóstico foi de reativação. Nos outros 3 casos, reconheceu-se o parasito na lâmina original (em pelo menos um dos cortes histológicos), o qual não havia sido identificado no primeiro exame; estes 3 casos foram selecionados como controles positivos.

4.1.1 Controles positivos

Como controles positivos, foram selecionados 26 casos de exames anatomopatológicos corados pela hematoxilina e eosina (HE) contendo ninhos de amastigotas de *T. cruzi*. São eles:

- 13 BEM;

- 12 biópsias de pele;
- 1 coração (necrópsia), contendo cortes do ventrículo esquerdo (VE) e do septo interventricular (SIV).

4.1.2 Controles negativos

Como controles negativos, foram incluídos 2 grupos de amostras: 1) amostras sem evidências de infecção pelo *T. cruzi*; 2) amostras com parasito morfológicamente semelhante ao *T. cruzi* e potencialmente capaz de fornecer reação cruzada.

No primeiro grupo, foram selecionados 20 casos de exames anatomopatológicos sem ninhos de amastigotas de *T. cruzi* e cujos pacientes não apresentavam manifestações clínicas nem exames laboratoriais indicativos de infecção chagásica.

No segundo grupo, como *T. cruzi* e leishmânias têm algumas semelhanças morfológicas e moleculares, escolheram-se 6 casos com diagnóstico anatomopatológico de leishmaniose (cutânea ou intestinal). A confirmação da presença de leishmânias foi feita no Laboratório de Patologia das Leishmanioses do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por reação imuno-histoquímica com soro hiperimune de cão infectado pela *Leishmania chagasi* (33).

Os controles negativos são representados por:

- 10 fragmentos de corações explantados;
- 10 BEM;
- 5 biópsias de pele com diagnóstico anatomopatológico de leishmaniose;
- 1 biópsia de cólon com diagnóstico anatomopatológico de leishmaniose.

4.1.3 Casos

De acordo com o protocolo de pesquisa sobre doença de Chagas realizada no HC-UFMG, durante a realização de algumas BEM, foram colhidos fragmentos destinados à pesquisa de DNA do *T. cruzi* por PCR, além dos já habituais para exame histopatológico. Assim, foram selecionados do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFMG 31 BEM sem

ninhos do parasito ao exame convencional em HE nos fragmentos concomitantes sabidamente positivos à PCR.

4.2 Biópsias endomiocárdicas (BEM)

As biópsias são feitas em momentos pré-estabelecidos e segundo os procedimentos padronizados no HC-UFG, de acordo com as recomendações da II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco (34). De cada paciente, são obtidos 3 a 5 fragmentos do endomiocárdio, que são fixados em formalina a 10%, processados para inclusão em parafina e cortados com 5 µm de espessura. De cada caso, são obtidos pelo menos 15 cortes escalonados, que são corados pela HE. Todo o processamento técnico do material foi feito no Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFG.

4.3 Estudo histopatológico

Todas as lâminas examinadas rotineiramente para avaliação de rejeição ao enxerto foram revistas pelo pesquisador principal e por seu orientador, para confirmação dos achados histopatológicos, sobretudo para confirmação ou exclusão de ninhos de *T. cruzi*.

4.4 Estudo imuno-histoquímico

4.4.1 Reação com anticorpo anti-*T. cruzi*

4.4.1.1 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 Universidade Federal de Ouro Preto (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 (COBEA).

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 1 h para formação de coágulo, sendo a seguir centrifugado a 3.500 RPM/10 min. O *pool* de soros obtido foi homogeneizado, aliquoteado, identificado e armazenado a -80°C até o momento dos testes.

O soro hiperimune foi diluído serialmente em PBS estéril, pH=7,2 (entre 1:10 e 1:10.000), e a reatividade foi avaliada em ensaios de imuno-histoquímica em cortes parafinados de coração, baço e intestino de camundongos e cães não infectados e infectados por diferentes cepas do *T. cruzi*.

A produção do anticorpo foi realizada no Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da UFOP.

4.4.1.2 Reação imuno-histoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinados em estufa a 56° C *overnight*, re-hidratados com banhos em xilol (3 vezes por 5 minutos), álcool etílico 100% e 80% (3 vezes por 5 minutos) e água corrente por 5 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 2 banhos em solução de PBS a 10%, 5 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% (6 g de leite desnatado em 100 ml de PBS), por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (anticorpo descrito em 4.1.4.1), diluído 1:400.000 em PBS/albumina bovina 1% (1870, Inlab, Diadema, Brasil), em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 1 hora, seguindo-se 2 banhos em solução de PBS a 10%, 5 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 2 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-hidrocloroeto em 200 ml de PBS e 400µl de peróxido de hidrogênio 30%), durante 5 minutos. Para interromper a revelação, os cortes foram lavados em PBS por 5 minutos e, posteriormente, contracorados com hematoxilina de Harris diluída por 3 segundos. Depois, foram lavados em água corrente por 5 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 em HE.

4.4.2 Reação com anticorpo anti-leishmânia

A reação imuno-histoquímica para leishmânias foi feita no Laboratório de Leishmanioses do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, conforme descrito por Marques 2016 (33).

4.5 Reação em cadeia de polimerase

Para confirmação da infecção chagásica nos casos estudados, fragmentos de coração, de BEM e de outras biópsias foram testadas pela técnica de PCR para DNA do *T. cruzi*, conforme descrito adiante.

4.5.1 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 e S36 (Tabela 1), conforme empregado por Wincker 1994 (35). Os produtos da amplificação foram visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados pela prata. Para avaliar o desempenho do ensaio, incluíram-se controles positivos, constituídos de DNA de cepas JG de *T. cruzi*, e controles negativos, compostos de reações de PCR sem adição de DNA.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores na PCR para identificação de kDNA do *T. cruzi*.

Técnica	Iniciador	Sequência	Referência
PCR kDNA	S35-F	5'-AAATAATGTACGGGKAGATGCATGA-3'	Wincker et al., 1994
	S36-R	5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'	
PCR rDNA 24S α	D71-F	5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3'	Souto et al., 1993
	D72-R	5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'	
	D75-F	5'-CAGATCTTGGTTGGCGTAG-3'	

4.5.2 PCR em tempo real do gene rDNA 24S α

Foi realizado uma heminested PCR do gene do rRNA 24 S α para reconhecimento molecular do *T. cruzi*. Os produtos foram identificados a partir de curvas de dissociação por PCR em tempo real (36). A primeira etapa de amplificação foi realizada usando os iniciadores D75 direto e D72 reverso (Tabela 1) e 5 μ L do produto da extração obtido a partir das amostras de tecido; a segunda etapa foi realizada com os iniciadores D71 direto e D72 reverso (Tabela 1), tendo como molde 2 μ L do produto da primeira PCR. 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). Os controles positivos utilizados foram DNA de cepas ou clones que representam as DTUsTcI e TcII, constituídos pelo clone Col 1.7G2 (T M ~ 81 o C) e cepa JG (T M ~ 76 o C), respectivamente. Os controles negativos foram representados pelos componentes da reação de PCR, sem o DNA.

4.6 Determinação da sensibilidade, da especificidade e dos valores preditivos positivo e negativo do teste

Com base no número de amostras positivas e negativas (controles positivos e controles negativos, definidos a partir de dados clínicos e do encontro de ninhos de *T. cruzi* nos cortes histológicos), foram determinados a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos

positivo e negativo da reação imuno-histoquímica com o anticorpo sob avaliação para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*. O padrão-ouro dos casos positivos são ninhos de *T. cruzi* em cortes histológicos corados pela HE.

Para os cálculos, foram seguidas as recomendações de Pagano e Gauvreau 2004 (37).

4.7 Considerações éticas

O projeto seguiu todas as normas de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na Resolução nº 196 do Conselho Nacional de Saúde, para salvaguardar os direitos e o bem-estar das pessoas estudadas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, em 19/8/2015 (CAAE 49097715.3.0000.5149).

5 RESULTADOS

Os resultados do exame histológico convencional (HE), das reações de amplificação (PCR) e de imuno-histoquímica de todos os casos examinados neste estudo estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados de detecção do *T. cruzi* por reação de cadeia de polimerase (PCR), histologia convencional em hematoxilina e eosina (HE) e reação imuno-histoquímica (IHQ) dos controles positivos, controles negativos e casos.

Controles positivos					Controles negativos					Casos				
Nº caso	HE	PCR	IHQ	Amostra	Nº caso	HE	PCR	IHQ	Amostra	Nº caso	HE	PCR	IHQ	Amostra
1	+	-	+	Biópsias de pele	27	-	-	-	Corações, pacientes não chagásicos	53	-	+	+	BEM de pacientes chagásico
2	+	+	+		28	-	-	-		54	-	+	+	
3	+	-	+		29	-	-	-		55	-	+	+	
4	+	-	+		30	-	-	-		56	-	+	+	
5	+	+	+		31	-	-	-		57	-	+	-	
6	+	+	+		32	-	-	-		58	-	+	-	
7	+	-	+		33	-	-	-		59	-	+	-	
8	+	-	+		34	-	-	-		60	-	+	-	
9	+	-	+		35	-	-	-		61	-	+	-	
10	+	+	+		36	-	-	-		62	-	+	-	
11	+	+	+		37	-	-	-		63	-	+	-	
12	+	+	+		38	-	-	-		64	-	+	-	
13	+	-	+		39	-	-	-		65	-	+	-	
14	+	-	-	40	-	-	-	66	-	+	-			
15	+	+	+	41	-	-	-	67	-	+	-			
16	+	+	-	42	-	-	-	68	-	+	-			
17	+	-	-	43	-	-	-	69	-	+	-			
18	+	-	-	44	-	-	-	70	-	+	-			
19	+	-	+	45	-	-	-	71	-	+	-			
20	+	-	+	46	-	-	-	72	-	+	-			
21	+	-	+	47	-	-	-	73	-	+	-			
22	+	-	+	48	-	-	-	74	-	+	-			
23	+	-	+	49	-	-	-	75	-	+	-			
24	+	-	-	50	-	-	+	76	-	+	-			
25	+	+	+	51	-	-	-	77	-	+	-			
26	+	+	+	52	-	-	-	78	-	+	-			
								79	-	+	-			
								80	-	+	-			
								81	-	+	-			
								82	-	+	-			
								83	-	+	-			
								84	-	+	-			

5.1 Controles positivos

Nas 26 amostras utilizadas como controles positivos (13 BEM, 12 biópsias de pele e 1 necrópsia de paciente chagásico falecido após o transplante), a imuno-histoquímica revelou ninhos de amastigotas em 8 BEM (Figura 2), nas 12 biópsias de pele (Figura 3) e no coração de necrópsia, totalizando 21 casos (80,8%) (Tabela 2).

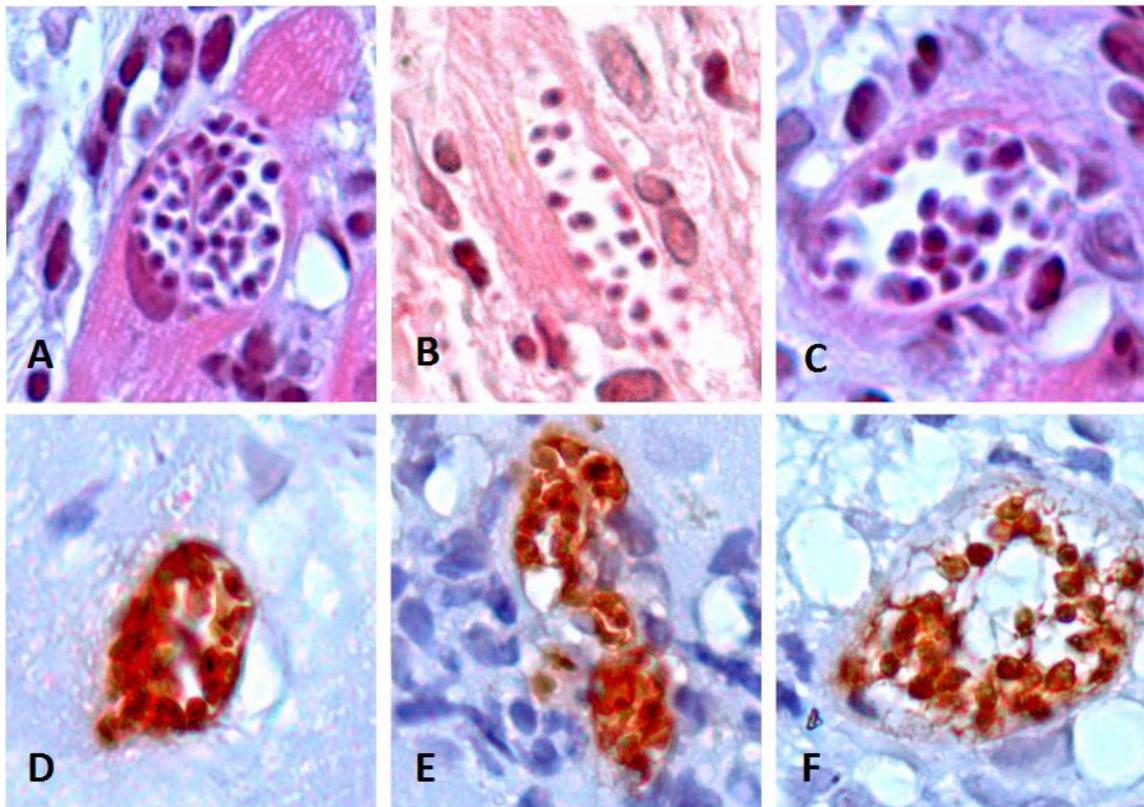


Figura 2. A, B e C: Biópsias endomiocárdicas mostrando ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* no citoplasma de miocardiócitos. Hematoxilina e eosina, 1.000X. D, E e F: Formas amastigotas de *T. cruzi* marcadas pela reação imuno-histoquímica com anticorpo policlonal anti-*T. cruzi*. 1.000X.

Em 5 BEM (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 (Tabela 2).

Em 16 dos 26 controles positivos (61,5%), o DNA do parasito não foi identificado pelo método de PCR (Tabela 3).

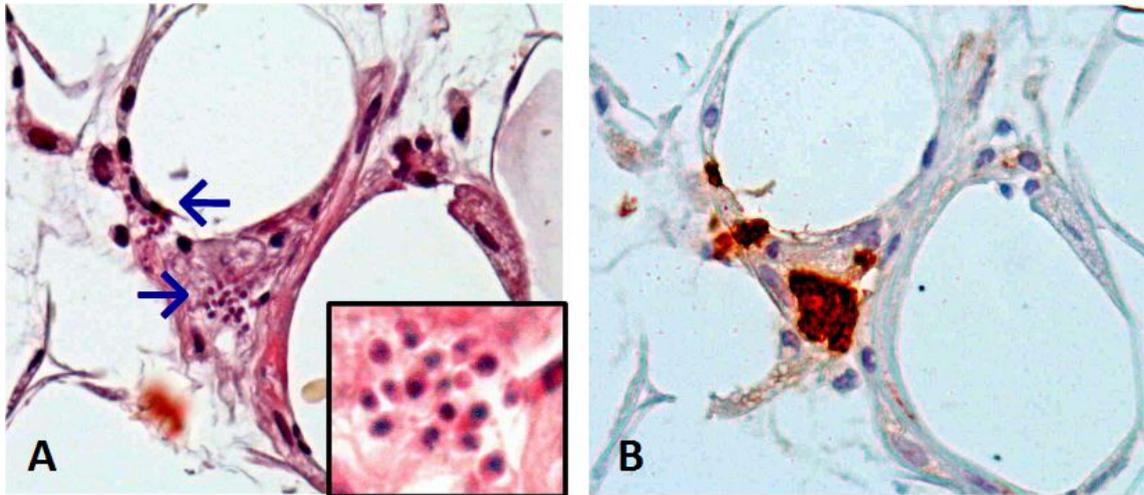


Figura 3. **A:** Biópsia de pele mostrando ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* no citoplasma de macrófagos (setas). Hematoxilina e eosina, 400X. No detalhe, ampliação do campo para evidenciar o parasito. Hematoxilina e eosina, 1.000x. **B:** Formas amastigotas de *T. cruzi* marcadas pela reação imuno-histoquímica com anticorpo policlonal anti-*T. cruzi*. 400X.

Tabela 3: Controles positivos. Resultados de detecção do *T. cruzi* por reação de cadeia de polimerase (PCR), histologia convencional em hematoxilina e eosina (HE) e reação imuno-histoquímica (IHQ).

Amostra	HE	PCR	IHQ	Total (%)
Biópsias de pele	Positivo	Positivo	Positivo	6 (23,08)
			Negativo	-
		Negativo	Positivo	6 (23,08)
			Negativo	-
BEM* de pacientes chagásicos	Positivo	Positivo	Positivo	2 (7,70)
			Negativo	1 (3,84)
		Negativo	Positivo	6 (23,08)
			Negativo	4 (15,38)
Necrópsia	Positivo	Positivo	Positivo	1 (3,84)

(*) Biópsia endomiocárdica

5.2 Controles negativos

Foram examinados 26 controles negativos (10 fragmentos de corações explantados de pacientes não chagásicos, 10 BEM de pacientes não chagásicos, 5 biópsias de pele com diagnóstico anatomopatológico de leishmaniose e 1 biópsia de cólon com diagnóstico anatomopatológico de leishmaniose).

A reação imuno-histoquímica com o antissoro anti-*T. cruzi* foi negativa em 25 casos (96,2%). Em 1 caso de leishmaniose cutânea (3,8%), houve marcação pela reação imuno-histoquímica com anticorpo anti-*T. cruzi* em parasitos dispersos no interstício (Tabela 4) (Figura 4).

Em nenhum dos 26 controles negativos houve detecção do DNA do *T. cruzi* pelo método de PCR.

Tabela 4: Controles negativos. Resultados de detecção do *T. cruzi* por reação de cadeia de polimerase (PCR), histologia convencional em hematoxilina e eosina (HE) e reação imuno-histoquímica (IHQ).

Amostra	HE	PCR	IHQ	Total (%)
Corações de pacientes não chagásicos	Positivo	Negativo	Positivo	-
			Negativo	-
	Negativo		Positivo	-
			Negativo	10 (38,5)
BEM de pacientes não chagásicos	Positivo		Positivo	-
			Negativo	-
	Negativo		Positivo	-
			Negativo	10 (38,5)
Leishmaniose cutânea	Positivo	Positivo	-	
		Negativo	-	
	Negativo	Positivo	1 (3,85)	
		Negativo	4 (15,3)	
L. intestinal	Negativo	Negativo	1 (3,85)	

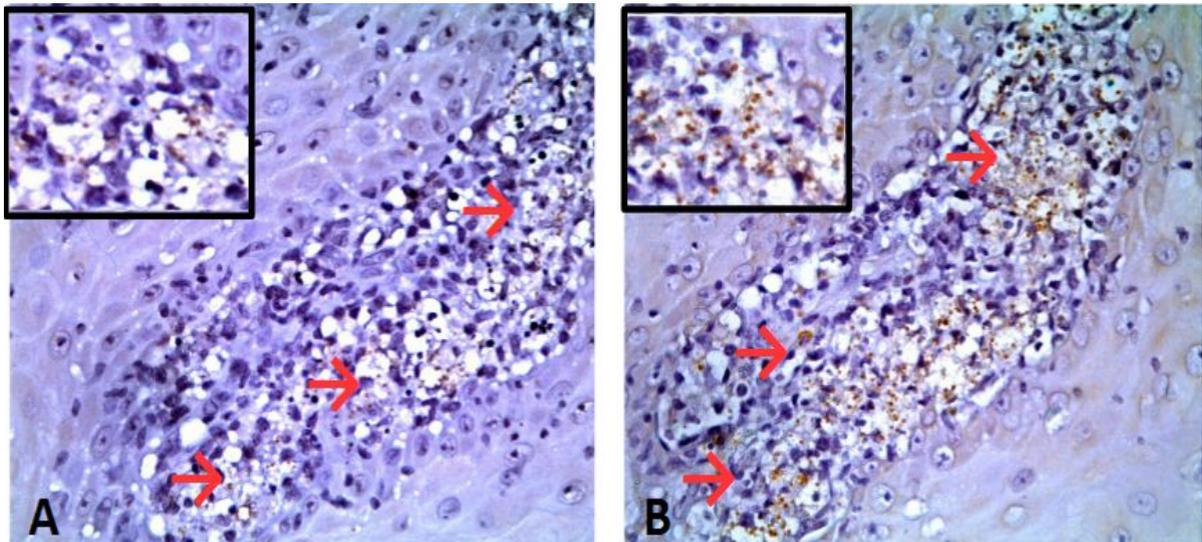


Figura 4. A: Biópsia de pele com diagnóstico clínico e imuno-histoquímico de leishmaniose cutânea mostrando formas amastigotas do parasito dispersas no interstício, marcadas pela reação imuno-histoquímica com anticorpo anti-*T. cruzi* (setas). 400X. No detalhe, ampliação do campo para evidenciar a marcação de formas amastigotas. 1.000X. **B:** Mesma biópsia e topografia do caso mostrado em A, evidenciando formas amastigotas de leishmânia marcadas pela reação imuno-histoquímica com anticorpo anti-leishmânia.

5.3 Casos

Em 4 das 31 amostras de BEM selecionadas como casos (12,9%) foram identificados ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* pela reação imuno-histoquímica, não reconhecidos ao exame histológico convencional (Tabela 5) (Figura 5).

Tabela 5: Casos. Resultados de detecção do *T. cruzi* por reação de cadeia de polimerase (PCR), histologia convencional em hematoxilina e eosina (HE) e reação imuno-histoquímica (IHQ).

Amostra	HE	PCR	IHQ	Total (%)
Casos	Negativo	Positivo	Positivo	4 (12,9)
			Negativo	27 (87,1)

Em todas as BEM incluídas como casos foram coletados concomitantemente a fragmentos de BEM com DNA do *T. cruzi* detectado por meio de PCR.

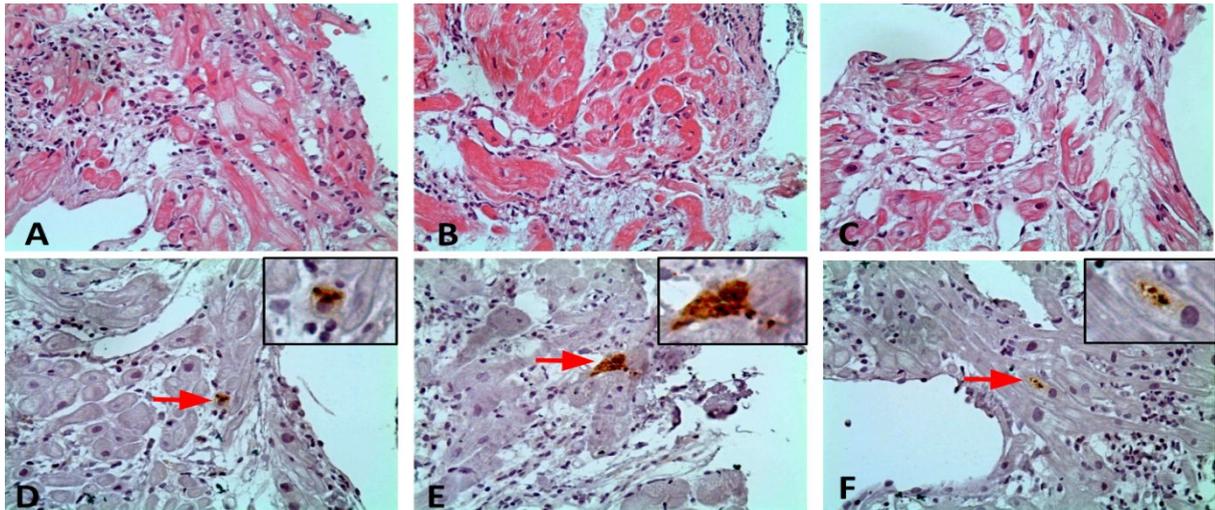


Figura 5. **A, B e C:** Biópsias endomiocárdicas sem evidência de ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* ao exame histopatológico em HE, 200X. **D, E e F:** Mesmas biópsias e topografias das figuras 5A, 5B e 5C, respectivamente, com formas amastigotas de *T. cruzi* marcadas pela reação imuno-histoquímica com anticorpo policlonal anti-*T. cruzi* (setas). 200X. No detalhe, ampliação do campo para evidenciar a marcação de formas amastigotas. 1.000X.

5.4 Análise estatística

No total, foram analisadas 83 amostras, sendo que 26 (31,3%) tiveram histopatologia positiva (ninhos de amastigotas de *T. cruzi*). Os demais 57 casos (68,7%) tiveram HE negativa (ausência de ninhos de *T. cruzi*).

Em 21 das 26 amostras (80,8%) selecionadas como controles positivos houve marcação imuno-histoquímica para antígenos do *T. cruzi*. Dos 26 controles negativos, 25 (96,2%) não tiveram marcação imuno-histoquímica para antígenos do *T. cruzi*.

Com base nesses resultados, os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo são, respectivamente, 80,8%, 96,2%, 95,5% e 83,3% (tabela 6).

Tabela 6: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) para o teste imuno-histoquímico com anticorpo anti-*T. cruzi*.

	Valor	IC* 95%
Sensibilidade	80,8%	[62,1 - 91,5]
Especificidade	96,2%	[81,1 - 99,3]
VPP	95,5%	[78,2 - 99,2]
VPN	83,333%	[64,4 - 92,7]

(*) Intervalo de confiança

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a reação imuno-histoquímica com o antissoro sob teste mostrou sensibilidade de 80,8% para detecção de *T. cruzi*, quando se considerou como padrão-ouro o encontro de ninhos de *T. cruzi* na coloração convencional de HE. Em 5 BEM (19,2% do total de controles positivos), a reação imuno-histoquímica não demonstrou antígenos do parasito. A explicação mais provável para tal resultado é a escassez de ninhos do parasito na fase crônica da doença, nos diferentes órgãos afetados, e a sua pequena dimensão, o que pode explicar a ausência deles em muitos cortes histológicos. No presente estudo, os cortes histológicos originais das BEM continham ninhos ao exame convencional (HE), os quais podem não ter sido incluídos nos cortes obtidos em uma segunda microtomia; o próprio ajuste do bloco no micrótomo para obter novos cortes para a imuno-histoquímica pode ter aprofundado muito a amostra e contribuído para que os ninhos, poucos e pequenos, ficassem fora dos cortes que foram empregados na reação imuno-histoquímica. Tendo-se essa possibilidade como plausível, recomenda-se que, nos casos de BEM após transplante de pacientes chagásicos, sejam coletados, ao mesmo tempo, cortes de tecido em lâminas para histopatologia convencional e para imuno-histoquímica, procurando incluir os eventuais ninhos de amastigotas nos vários cortes histológicos realizados. Tal técnica já é realizada em outros contextos em que o alvo de análise é escasso e pode se perder na aquisição de novos cortes, por exemplo, em biópsias de linfonodo sentinela axilar na avaliação de pacientes com câncer de mama (38).

A sensibilidade do teste diagnóstico encontrada no presente estudo (80,8%) é bastante expressiva e mostra-se adequada para seu emprego rotineiro nos laboratórios que examinam BEM de pacientes chagásicos.

Houve marcação de parasitos pela reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-*T. cruzi* em 1 caso de leishmaniose cutânea; com isso, a especificidade do método foi de 96,2%. Isso mostra que o anticorpo policlonal anti-*T. cruzi* utilizado pode apresentar reação cruzada com outros parasitos e deve, então, ser utilizado com estreita correlação com os dados clínicos e laboratoriais do paciente, além de evidente correspondência morfológica ao exame histopatológico em HE. A reação cruzada pelo método imuno-histoquímico entre antígenos de leishmânias também já foi documentada por Barbosa et al (39), usando outro anticorpo anti-*T. cruzi*. Desse modo, recomenda-se a aplicação do método sob análise em número maior de

casos de leishmaniose cutânea para melhor entendimento dos resultados e de possível reação cruzada. Também se faz necessária a análise de biópsias com diagnóstico anatomopatológico de outras doenças infecciosas causadas por parasitos que apresentam morfologia semelhante às formas amastigotas de *T. cruzi* (p.ex., toxoplasmose), na tentativa de se reconhecer outras prováveis reações cruzadas do anticorpo em estudo.

O presente estudo deixa evidente que a complementação com estudo imuno-histoquímico com o antissoro anti-*T. cruzi* aumenta a detecção do parasito em BEM. Em quatro BEM com resultado positivo pela PCR, houve detecção de ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* pela reação imuno-histoquímica não identificados à histologia convencional. Esse aumento da sensibilidade no diagnóstico de reativação da infecção chagásica justifica a indicação do método como avaliação complementar às BEM de pacientes chagásicos transplantados.

O diagnóstico diferencial entre rejeição e reativação da infecção chagásica tem enorme importância na assistência dos pacientes transplantados porque a conduta clínica é muito diferente nas duas situações. Assim, é essencial que, além do exame histopatológico convencional (HE) minucioso na procura de ninhos de amastigotas do parasito em todas as BEM de transplantados cardíacos com doença de Chagas, a avaliação morfológica seja complementada com o estudo imuno-histoquímico. Em nossa opinião, esse procedimento deve fazer parte da rotina laboratorial em tais casos.

Devido ao pequeno tamanho dos ninhos e a sua ocasional supressão nos cortes histológicos seriados, entendemos que a reação imuno-histoquímica deve ser realizada em pelo menos 3 cortes sequenciais na tentativa de se aumentar a chance de reconhecimento do parasito.

Assim, recomendamos que os grupos de assistência a pacientes chagásicos devem institucionalizar, após transplante cardíaco, a reação imuno-histoquímica como complementação na avaliação histopatológica de todas as BEM nos protocolos assistenciais, na tentativa de se diagnosticar o mais precocemente possível a reativação da infecção pelo *T. cruzi*.

A negatividade de DNA do *T. cruzi* pelo método de PCR em 16 dos 26 controles positivos (61,5%) pode ter algumas explicações. A mais provável é a degradação do DNA nas amostras teciduais fixadas em formol. Na maioria das BEM examinadas, não houve controle estrito do processo de fixação das amostras, nem quanto ao tempo de exposição ao fixador e nem,

sobretudo, quanto ao seu pH. Como se trata de exames de rotina, emprega-se a solução convencional de formalina a 10%. Recomenda-se, por isso, que tais amostras sejam fixadas em formol tamponado, pH= 7,4, para aumentar a preservação do DNA do parasito e a chance de sua detecção. As soluções de formol convencional (não tamponado) apresentam larga faixa de pH, o que pode explicar danos nas moléculas de DNA, prejudicando sua identificação por PCR (40).

Como se trata de estudo ainda inicial, não houve possibilidade de caracterizar adequadamente o anticorpo ora estudado. Na verdade, o que se usou no presente estudo foi antissoro, com grande número e variedade de anticorpos. O isolamento e a caracterização do anticorpo poderão trazer mais informações sobre as suas propriedades, inclusive a explicação para possível reação cruzada com antígenos de leishmânias. Esta será uma etapa subsequente deste estudo.

7 CONCLUSÕES

O anticorpo policlonal (antissoro) anti-*T. cruzi* utilizado neste estudo mostrou-se adequado para o fim de aumentar a sensibilidade do diagnóstico morfológico de reativação da infecção chagásica. Com sensibilidade de 80,8% e especificidade de 96,2%, justifica-se o seu emprego rotineiro na avaliação histopatológica de BEM de pacientes chagásicos após transplante cardíaco. Como esse procedimento ainda não foi testado em grande número de amostras para avaliar sua eficácia na prática clínica, novos estudos são necessários.

Como houve marcação imuno-histoquímica com anti-*T. cruzi* em um caso de leishmaniose cutânea, o patologista deve considerar este diagnóstico diferencial, fazendo estreita correlação com os quadros clínico e laboratorial do paciente.

Apesar de a imuno-histoquímica aumentar a sensibilidade do diagnóstico, reafirma-se, neste estudo, a importância da avaliação histopatológica convencional (HE) das BEM de pacientes chagásicos em busca do parasito; tal exame deve ser realizado de forma diligente, com avaliação cuidadosa de todos os cortes histológicos realizados.

O aumento na detecção do parasito constatado neste estudo recomenda a utilização da imuno-histoquímica com o antissoro anti-*T. cruzi* aqui testado como método complementar importante no diagnóstico precoce da reativação da infecção pelo *T. cruzi* em pacientes chagásicos submetidos a transplante do coração.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

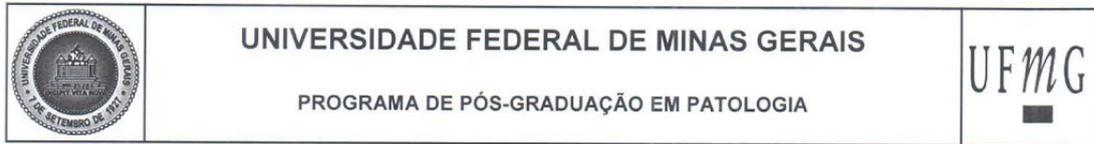
- 1) CHAGAS, Carlos. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909
- 2) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report in neglected tropical diseases. Geneva: **World Health Organization**; 2013.
- 3) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis) Geneva: **World Health Organization**; 2015 [citado 2016 Dez 29]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
- 4) COURA, José Rodrigues; DIAS, João Carlos Pinto. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.
- 5) COURA, José Rodrigues. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - a comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.
- 6) PINTO DIAS, João Carlos. Human Chagas disease and migration in the context of globalization: some particular aspects. **Journal of tropical medicine**, v. 2013, 2013.
- 7) MANNE-GOEHLER, Jennifer et al. Estimating the burden of Chagas disease in the United States. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005033, 2016.
- 8) LUNA, Expedito J.A. et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among Bolivian immigrants in the city of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. AHEAD, p. 0-0, 2016.
- 9) RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.
- 10) NEW YORK HEART ASSOCIATION. CRITERIA COMMITTEE. **Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels**. 9th ed. Boston, MA, Lippincott Williams and Wilkins, 1994.
- 11) FIORELLI, A. I. et al. Heart transplantation in 107 cases of Chagas' disease. In: **Transplantation proceedings**. Elsevier, 2011. p. 220-224.
- 12) GODOY, Henrique L. et al. Infections in heart transplant recipients in Brazil: the challenge of Chagas' disease. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 29, n. 3, p. 286-290, 2010.

- 13) FERREIRA, M. S. et al. Doença de Chagas e imunossupressão. **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas, 1ª edição, Fundação Oswaldo Cruz**, p. 365-379, 1997.
- 14) CAMPOS, Sílvia V. et al. Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 27, n. 6, p. 597-602, 2008.
- 15) BOCCHI, E. A. et al. Long-term follow-up after heart transplantation in Chagas' disease. In: **Transplantation proceedings**. 1993. p. 1329-1330.
- 16) STOLF, N. A. et al. Heart transplantation in patients with Chagas' disease cardiomyopathy. **The Journal of heart transplantation**, v. 6, n. 5, p. 307-312, 1987.
- 17) D'AVILA, Solange Corrêa Garcia Pires et al. Eritema nodoso como forma de reativação da doença de Chagas em transplantado cardíaco. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 38, n. 1, p. 61-63, 2005.
- 18) PINTO, João Carlos et al. 2nd Brazilian Consensus On Chagas Disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n.1, p.3-60, 2016.
- 19) VIRREIRA, Myrna 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.
- 20) BENVENUTI, Luiz Alberto 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. **Cardiovascular Pathology**, v. 14, n. 5, p. 265-268, 2005.
- 21) MALDONADO, Cecilia et al. Using polymerase chain reaction in early diagnosis of re-activated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation. **The Journal of heart and lung transplantation**, v. 23, n. 12, p. 1345-1348, 2004.
- 22) SCHIJMAN, Alejandro Gabriel et al. Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. **The Journal of heart and lung transplantation**, v. 19, n. 11, p. 1114-1117, 2000.
- 23) NAIR, Vidhya; BUTANY, Jagdish. Heart transplant biopsies: interpretation and significance. **Journal of clinical pathology**, v. 63, n. 1, p. 12-20, 2010.
- 24) PINAZO, María-Jesúset al. Recommendations for management of Chagas disease in organ and hematopoietic tissue transplantation programs in non endemic areas. **Transplantation Reviews**, v. 25, n. 3, p. 91-101, 2011.
- 25) DE SOUZA, Márcia Marcelino et al. Comparative histopathology of endomyocardial biopsies in chagasic and non-chagasic heart transplant recipients. **The Journal of heart and lung transplantation**, v. 20, n. 5, p. 534-543, 2001.

- 26) BARBOSA, Alfredo José Afonso. Immunocytochemical method of identification of *Trypanosoma cruzi* amastigotes in routinely prepared histological sections. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, n. 6, p. 293-297, 1985.
- 27) BARBOSA, Alfredo José Afonso 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, 1986.
- 28) FUENMAYOR, Carmen 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.
- 29) PITTELLA, José Eymard Homem et al. 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.
- 30) CALIARI, Marcelo V. et al. Immunohistochemical studies in acute and chronic canine chagasic cardiomyopathy. **Virchows Archiv**, v. 441, n. 1, p. 69-76, 2002.
- 31) PITTELLA, José Eymard Homem; MENEGUETTE, Cicero; BARBOSA, Alfredo J. Afonso. Histopathological and immunohistochemical study of the brain and heart in the chronic cardiac form of Chagas' disease. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 51, n. 1, p. 8-15, 1993.
- 32) HIGUCHI, Maria de Lourdes et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovascular Pathology**, v. 2, n. 2, p. 101-106, 1993.
- 33) MARQUES, Fernanda A. et al. Effectiveness of an immunohistochemical protocol for *Leishmania* detection in different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. **Parasitology international**, v. 66, n. 1, p. 884-888, 2016.
- 34) BACAL, Fernando et al. II Diretriz brasileira de transplante cardíaco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 1, p. e16-e76, 2010.
- 35) WINCKER, Patrick et al. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 6, p. 771-777, 1994.
- 36) FREITAS, J. M. et al. 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.

- 37) PAGANO, Marcelo; GAUVREAU, Kimberlee. **Princípios de Bioestatística**. São Paulo: Thomson, 2004.
- 38) SILVERBERG, Steven G. Sentinel node processing: recommendations for pathologists. 2002. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 26, n. 3, p. 383-385, 2002.
- 39) BARBOSA, Alfredo José Afonso et al. Immunocytochemical identification of leishmania and Trypanosoma cruzi amastigotes in situ with homologous and heterologous polyclonal antibodies. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, n. 1, p. 5-11, 1991.
- 40) FERNANDES, José Veríssimo et al. Comparison of three DNA extraction protocols from formaldehyde-fixed and paraffin-embedded tissues. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 3, p. 141-146, 2004.

ANEXO A

FOLHA DE APROVAÇÃO

VALIDAÇÃO DE ANTISORO PARA USO EM IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA
DETECÇÃO DE TRYPANOSOMA CRUZI

PAULO HERNANE RABELO AZEVEDO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 26 de janeiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Geraldo Brasileiro Filho - Orientador
UFMG


Prof(a). Alfredo José Afonso Barbosa
UFMG


Prof(a). Maria da Consolação Vieira Moreira
UFMG

Belo Horizonte, 26 de janeiro de 2018.