

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

**Priscilla Almeida da Costa**

**Utilização de técnicas moleculares para o acompanhamento de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados, como ferramenta para a identificação precoce de reativação da infecção.**

Belo Horizonte, 2015

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

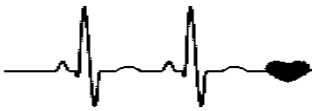
**Utilização de técnicas moleculares para o acompanhamento de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados, como ferramenta para a identificação precoce de reativação da infecção.**

**Priscilla Almeida da Costa**

Dissertação 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 Mestre em Bioquímica e Imunologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Andrea Mara Macedo**

Belo Horizonte, 2015



**Agradecimentos**

Agradeço...

a Deus por estar sempre ao meu lado e cuidar de mim e também pela oportunidade de obter mais esta conquista. "*Grandes coisas fez o Senhor por nós, por isso estamos alegres.*"

à Universidade Federal de Minas Gerais e ao departamento de Bioquímica e Imunologia pela infra-estrutura que permitiu a realização deste trabalho;

à Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais pela bolsa concedida;

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

a todos os pacientes, pois a contribuição de vocês foi fundamental para que este estudo fosse possível e para o avanço da investigação científica nesta área do conhecimento.

à Marcela Segato por ter iniciado esse projeto e a Danielle Durso por ter acreditado em sua continuação. Pelos resultados e saber compartilhados, além do auxílio nos experimentos e em todas as dúvidas que eu tive durante essa trajetória;

aos médicos do HC-UFMG colaboradores deste trabalho. Dr. Geraldo Brasileiro Filho, pela sua disponibilidade e colaboração e também pelo seu incentivo neste trabalho. Dra Maria da Consolação V. Moreira, Dr. Fábio Castilho e Dr. Silvio Amadeu, médicos responsáveis pela triagem e acompanhamento dos pacientes transplantados cardíacos, por toda contribuição nos resultados dos diagnósticos clínicos;

ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Laboratório de Anatomia Patológica da UFMG, 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 (LGB), Carlos Renato Machado, Gloria Franco e Sergio Pena, pelos valiosos ensinamentos e por toda ajuda concedida;

à Neuzinha por toda colaboração e assistência dada a mim e ao laboratório e à Poly por toda ajuda e também pelos momentos de conversa e muitas risadas;

aos amigos do LGB pela convivência. *“O nosso caminho é feito pelos nossos próprios passos, mas a beleza da caminhada depende dos que vão conosco”*. Obrigada por tornarem a rotina de trabalho mais prazerosa, pelos momentos de descontração e pela amizade. E ao Wagson, além de tudo isso, pela ajuda imprescindível 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, pela presença constante apesar da distância, por todo apoio, força, orações e pelos fortes abraços em cada reencontro;

ao meu irmão Esdras por todas as palavras de incentivo e por sempre acreditar em mim. À minha irmãzinha Vivi pelos momentos únicos, pelas brincadeiras e pelo seu jeito moleca de ser, que me ensina a não levar a vida tão a sério. Vocês fazem nossa casa ser um lugar mais feliz e divertido, por isso é o meu lugar preferido no mundo.

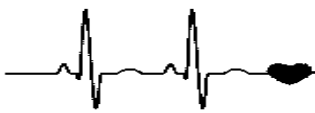
ao Ivan por todo amor e companheirismo, pelas palavras de incentivo e pela transmissão de confiança e força, em todos os momentos. *“Não sei se o mundo é bom, mas ele ficou melhor quando você chegou”*;

à minha família em BH, Héllida e Mayra pela companhia e por permitir que eu dividisse com vocês minhas tristezas, frustrações e também os meus entusiasmos e alegrias. Vocês tornaram minhas horas no ônibus e na academia bem mais divertidas, além de deixarem minha vida mais leve;

às queridas Talibãs, Tati e Bruninha, pela amizade, por estarem sempre dispostas a ajudar e por serem essas pessoas lindas em que a gente sabe que pode confiar;

aos meus amigos feitos em Pancas e Viçosa pela amizade ao longo de todos esses anos e por mostrar que não há distância para uma verdadeira amizade;

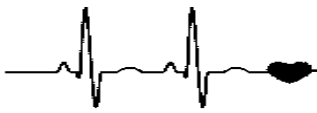
a todos os amigos do ICB, pelo convívio, aprendizado e apoio;



A doença de Chagas é considerada a 3ª infecção parasitária mais comum no mundo, vindo depois apenas da malária e da esquistossomose (WHO 2005). Estima-se que 7 a 8 milhões de pessoas estão infectadas, sendo responsável por 12 mil mortes por ano (WHO, 2014). Cerca de 20 à 30% das pessoas infectadas manifestam a forma grave da doença, desenvolvendo complicações cardíacas que podem conduzir a insuficiência cardíaca ou morte súbita (Britto *et al.*, 2009). Os fatores que determinam as diferentes manifestações clínicas e os que levam às formas leve ou grave da doença ainda não estão completamente esclarecidos, assim como é desconhecido o motivo pelo qual alguns pacientes cardiopatas chagásicos, submetidos ao transplante cardíaco, apresentam reativação da doença e outros não. Estima-se que haja uma contribuição relevante atribuída aos aspectos genéticos do parasito. O transplante de coração é uma opção terapêutica válida para o paciente portador de cardiopatia chagásica crônica em seu estágio mais avançado. No entanto, após o transplante, o diagnóstico diferencial de rejeição celular do implante ao da reativação da infecção chagásica, tem sido considerado difícil, impossibilitando o tratamento correto. No presente estudo, avaliamos a possibilidade de utilização de metodologias baseadas em PCRs direcionados para marcadores nucleares (rDNA 24S $\alpha$ ) e mitocondriais (kDNA) para diagnóstico precoce da presença de *Trypanosoma cruzi* no coração de pacientes chagásicos transplantados. Além de caracterizarmos as populações de *T. cruzi* de I a VI nas amostras positivas, utilizando testes sequenciais de PCR, baseado em 3 marcadores: o gene COII, o espaçador intergênico do gene miniéxon e gene rDNA 24S $\alpha$ , para avaliarmos se há ocorrência de linhagens de *T. cruzi* mais associadas a reativação. De 2008 a 2014, foram analisadas 497 biópsias endomiocárdicas, derivadas de 58 pacientes chagásicos cardíacos submetidos a transplante cardíaco do Hospital das Clínicas da UFMG. O DNA de *T. cruzi* foi detectado em 111 amostras e aproximadamente 62% dos pacientes apresentaram algum resultado positivo para um dos testes de diagnóstico molecular realizado. Com a tipagem dessas 111 amostras positivas para presença de *T. cruzi*, verificamos que a maioria dos pacientes tiveram reativação por *T. cruzi II*, apoiando a ideia de que esta é a principal linhagem associada a forma cardíaca e a reativação da doença da Chagas, pelo menos nesta região geográfica. O seguimento clínico dos pacientes, revelou que dos 36 pacientes positivos para pelo menos um dos testes moleculares, 29 apresentaram reativação clínica da doença de Chagas. Deste modo, existe uma boa intensidade de associação (80,55%) entre os resultados obtidos por PCR para kDNA e PCR em tempo real para rDNA 24S $\alpha$  e a reativação clínica da doença. Além disso, resultados positivos foram obtidos já nas primeiras biópsias endomiocárdicas realizadas, antecipando 1 a 32 meses a reativação

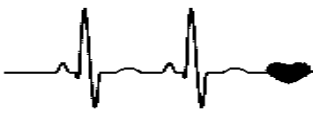
clínica, o que indica que a PCR pode contribuir para o diagnóstico precoce de reativação da doença Chagas, com potencial para auxiliar nas decisões de tratamento.





**Abstract**

Chagas disease is considered the third most common parasitic infection in the world, after malaria and schistosomiasis (WHO 2005). It is estimated that 7 to 8 million people are infected causing 12 thousand deaths each year (WHO, 2014). About 20-30% of infected people manifest the severe form of the disease developing cardiac complications that can lead to heart failure or sudden death (Britto et al., 2009). The factors determining the different clinical manifestations and leading to mild or severe forms of the disease are not yet fully understood. Moreover, it is unknown why some chagasic cardiac patients underwent to heart transplantation present disease reactivation while others do not. Significant contribution, however, has been attributed to genetic aspects of the parasite. Heart transplantation is a valid therapeutic option for patients with chronic Chagas disease in most advanced stage. However, after transplantation differential diagnosis of host-versus-graft disease and Chagas reactivation has been considered difficult impeding the correct treatment. In the present study, we evaluated the possibility of using methodologies based on PCRs targeted to nuclear (rDNA 24S $\alpha$ ) and mitochondrial (kDNA) markers for early diagnosis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in heart of transplanted patients with chagasic cardiomyopathy. In addition, we characterized the DTUs (*T. cruzi* I to VI) of the parasites present in positive samples using sequential PCR tests, based on three polymorphic markers: the COII gene, the intergenic spacer miniexon and rDNA 24S $\alpha$  gene to evaluate whether there was any DTU more associated with the reactivations. From 2008 to 2014, we analyzed 497 endomyocardial biopsies derived from 58 chagasic cardiac patients who underwent heart transplantation at the Hospital das Clínicas of UFMG. *T. cruzi* DNA was detected in 111 samples and 62% of patients have shown at least one positive result for the molecular diagnosis tests performed. Genotyping analyses using these 111 positive samples revealed that most of patients were infected by *T. cruzi* II supporting the idea that this is the main strain associated with the cardiac form and Chagas disease reactivation, at least in this geographical region. Clinical follow-up of 36 patients, positive for at least one our molecular tests, revealed that 29 of them presented clinical reactivation of Chagas disease in different time after the transplantation. Thus, there is a good association (80.55%) between the results generated by PCR analyses of both kDNA and rDNA 24S $\alpha$  markers and reactivation of clinical disease. In addition, positive results were also obtained in the first six performed endomyocardial biopsies anticipating 1-32 months clinical reactivation, indicating that PCR may contribute to the early diagnosis of reactivation of Chagas disease with potential to support in treatment decisions.



## **Lista de Abreviaturas**

COII: citocromo oxidase subunidade II

DTUs: *discrete typing or taxonomic units*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

HC: Hospital das Clínicas

HE: Hematoxilina eosina

HI: Hemaglutinação Indireta

IFI: imunofluorescência indireta

kDNA: DNA do cinetoplasto

LSSP-PCR: Low Stringency Single Specific Primer Polymerase Chain Reaction

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

rDNA: DNA ribossomal

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

Tc: *Trypanosoma cruzi*

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>3</b>
<b>Figura 2:</b> Esquema do ensaio triplo utilizado para discriminação das seis linhagens principais de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>20</b>
<b>Figura 3:</b> Distribuição epidemiológica das DTUs de <i>T. cruzi</i> nos ciclos doméstico e silvestre.....	<b>21</b>
<b>Figura 4:</b> Resultados representativos da amplificação do fragmento de 330 pb da região hipervariável do minicírculo de kDNA de <i>T. cruzi</i> diretamente das biópsias endomiocárdicas dos pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.....	<b>35</b>
<b>Figura 5:</b> Resultados representativos das curvas de dissociação obtidas por PCR em tempo real do gene rDNA 24S $\alpha$ diretamente dos tecidos dos pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.....	<b>36</b>
<b>Figura 6:</b> Comparação entre os métodos de diagnóstico. Análise do número de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados com reativação clínica da doença que apresentaram resultados positivos para os testes de diagnóstico utilizados.....	<b>38</b>
<b>Figura 7:</b> 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> .....	<b>44</b>
<b>Figura 8:</b> Amplificação do espaçador intergênico dos genes miniéxon de <i>T. cruzi</i> diretamente dos tecidos dos pacientes.....	<b>44</b>
<b>Figura 9:</b> Amplificação do gene rDNA24S $\alpha$ de <i>T. cruzi</i> diretamente dos tecidos dos pacientes.....	<b>45</b>

## Lista de tabelas

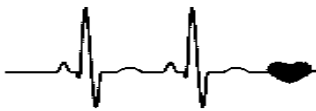
<b>Tabela 1:</b> Contraindicações absolutas e relativas para transplante cardíaco.....	<b>9</b>
<b>Tabela 2:</b> Protocolo da periodicidade das revisões ambulatoriais e biópsias.....	<b>11</b>
<b>Tabela 3:</b> Nomenclatura para as subdivisões de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>19</b>
<b>Tabela 4:</b> Resumo do ciclo de transmissão, distribuição geográfica e aspectos clínicos associados as linhagens de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>22</b>
<b>Tabela 5:</b> Sequências dos iniciadores utilizados neste trabalho.....	<b>29</b>
<b>Tabela 6:</b> Número total de amostras e pacientes e o número de amostras e pacientes que apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos PCRs utilizados para o diagnóstico.....	<b>36</b>
<b>Tabela 7:</b> Comparação de contingência dos resultados encontrados para os dois métodos de diagnóstico molecular utilizados.....	<b>37</b>
<b>Tabela 8:</b> Resultado das PCRs para diagnóstico de <i>T. cruzi</i> das 6 primeiras biópsias endomiocárdicas realizadas após transplante.....	<b>39</b>
<b>Tabela 9:</b> Comparação entre os resultados de reativação clínica e de diagnóstico molecular, obtidas por PCR diretamente das biópsias endomiocárdicas a fresco de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.....	<b>41</b>
<b>Tabela 10:</b> Identificação de DTUs de <i>T. cruzi</i> em biópsias endomiocárdicas de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.....	<b>45</b>

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	<b>vi</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ix</b>
<b>Listas</b> .....	<b>xi</b>
Lista de Abreviaturas .....	<b>xii</b>
Lista de figuras .....	<b>xiii</b>
Lista de tabelas .....	<b>xiv</b>
<b>1.Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas .....	<b>2</b>
1.2. Apresentação clínica da doença de Chagas .....	<b>4</b>
1.2.1. Fase aguda .....	<b>4</b>
1.2.2. Fase crônica .....	<b>5</b>
1.3. Tratamento .....	<b>6</b>
1.3.1. Tratamento na forma crônica cardíaca .....	<b>7</b>
1.4. Transplante cardíaco .....	<b>8</b>
1.4.1. Avaliação do receptor .....	<b>8</b>
1.4.2. Imunossupressão .....	<b>10</b>
1.4.3. Acompanhamento ambulatorial pós-transplante cardíaco .....	<b>10</b>
1.5. Métodos de diagnóstico .....	<b>11</b>
1.5.1. Principais métodos parasitológicos: .....	<b>12</b>
1.5.2. Principais métodos sorológicos: .....	<b>13</b>
1.5.3. Diagnóstico molecular: .....	<b>14</b>
1.6. Reativação da doença de Chagas .....	<b>15</b>
1.7. Diversidade intraespecífica do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>16</b>
1.8. Genotipagem dos seis DTUs de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>19</b>
1.9. Epidemiologia e implicações clínicas das linhagens de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>20</b>
<b>2. Justificativa</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>25</b>
3.1. Objetivo geral .....	<b>26</b>
3.2. Objetivos específicos .....	<b>26</b>
<b>4. Material e Métodos</b> .....	<b>27</b>
4.1. Pacientes e amostras .....	<b>28</b>
4.2. Preparação do DNA genômico do <i>T. cruzi</i> .....	<b>28</b>

4.3. Métodos utilizados para o diagnóstico molecular da presença de <i>T. cruzi</i> .....	29
4.3.1. PCR kDNA .....	29
4.3.2. PCR em tempo real do gene rDNA 24S $\alpha$ .....	30
4.4. Métodos utilizados para a caracterização das subpopulações de <i>T. cruzi</i> .....	30
4.4.1. PCR-RFLP do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II .....	30
4.4.2. Amplificação da região intergênica dos genes miniéxon .....	31
4.4.3. Amplificação da região 3' do gene rDNA 24 Sa .....	31
4.5. Métodos de análise dos produtos da PCR .....	31
4.5. Análises estatísticas .....	32
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	<b>33</b>
5.1. Pacientes .....	34
5.2. Diagnóstico molecular de <i>T. cruzi</i> .....	34
5.3. Caracterização das subpopulações de <i>T. cruzi</i> .....	43
<b>6. Conclusão</b> .....	<b>48</b>
<b>7. Referências bibliográficas</b> .....	<b>50</b>





## **1. Introdução**

---

## 1.1. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma 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).

Mesmo tendo sido descoberta há mais de 100 anos, ainda representa um sério problema de saúde pública. É considerada a terceira infecção parasitária mais comum no mundo, vindo depois apenas da malária e da esquistossomose (WHO, 2005).

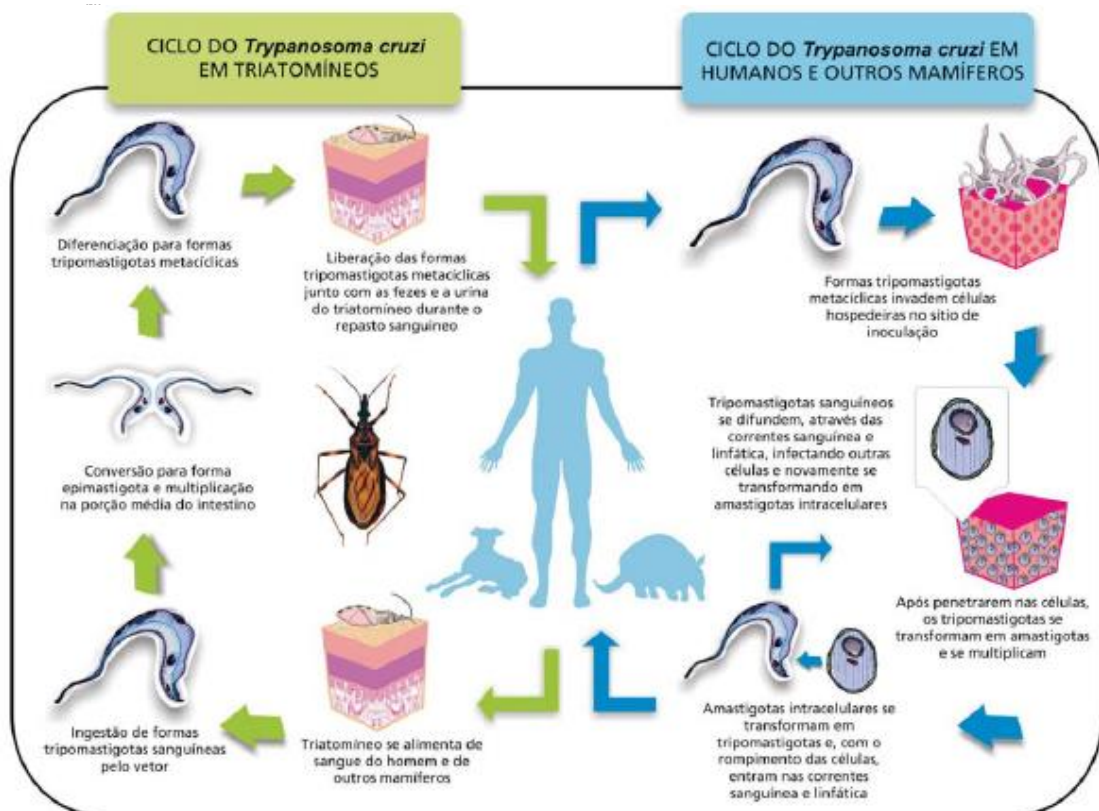
Estima-se que de 7 a 8 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, sendo a maioria da América Latina, onde a doença é endêmica. Além disso, cerca de 25 milhões de pessoas estão em situações de risco (WHO, 2010). Possui uma incidência de 28 mil novos casos por ano na região das Américas, sendo responsável por cerca de 12 mil mortes a cada ano (WHO, 2014; Rassi *et al.*, 2012). Apenas no Brasil, aproximadamente 3,5 milhões de pessoas estão infectadas e ocorrem cerca de 5 mil óbitos por ano (Dias *et al.*, 2000; Santo, 2009).

O *Trypanosoma 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, tripomastigota e promastigota. 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, transfusional, transplacentária e por via oral (Jackson *et al.*, 2010). Nos últimos anos, a maioria dos casos no Brasil foi devido a contaminação por via oral. No entanto, em alguns países da América do Sul os maiores números de contaminação ainda são devido a transmissão congênita e por via vetorial, que ocorre através do contato do hospedeiro suscetível com as fezes do triatomíneo hematófago infectado, também conhecido como barbeiro (Revisado por Andrade *et al.*, 2014).

O ciclo do parasito (Figura 1) inicia-se quando o barbeiro, ao se alimentar do sangue do hospedeiro vertebrado infectado, ingere formas tripomastigotas sanguíneas que

são conduzidas à porção anterior do estômago. Nesse novo ambiente, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas. Posteriormente, os epimastigotas se multiplicam por divisão binária e movem-se para o intestino posterior, onde iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicas que aderem à cutícula que reveste o epitélio do reto e do saco retal do inseto. A contaminação de um hospedeiro vertebrado ocorre quando o barbeiro infectado, ao picar o mamífero, elimina em suas fezes e urina a forma de tripomastigotas metacíclicas, que é a forma infectiva. A invasão do parasito ocorre quando o hospedeiro se coça, pois isso gera lesões da pele por onde o parasito pode penetrar, ou quando o parasito entra em contato com a mucosa. Os tripomastigotas metacíclicos acessam a circulação sanguínea, aderindo e invadindo diversas células nucleadas como, por exemplo, macrófagos, células musculares e epiteliais. No interior destas, o parasito ganha forma arredondada (amastigotas), multiplicando-se por divisão binária. Ocorre proliferação intracelular por sucessivas divisões binárias e liberação de novas formas tripomastigotas, assim como formas intermediárias e amastigotas, em menor proporção, que podem infectar novas células que estejam ali presentes (DaRocha, *et al.* 2002; Teixeira *et al.*, 2011).



**Figura 1:** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

**Fonte:** Argolo, A. M. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil, 2008; (p.19)

## **1.2. Apresentação clínica da doença de Chagas**

A análise de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes portadores da doença de Chagas permite classificar a infecção em fase aguda e fase crônica. A fase aguda pode ser devida à infecção primária ou reativação de fase crônica. Na fase crônica, a evolução do quadro clínico pode ocorrer de quatro diferentes formas: indeterminada, cardíaca, digestiva e mista (acometimento das formas cardíaca e digestiva) (Andrade *et al.*, 2011).

### **1.2.1. Fase aguda**

A fase aguda da doença de Chagas ocorre depois de um curto período de incubação, cerca de 7-10 dias, e persiste de 4-8 semanas (Rassi Jr *et al.*, 2010). É caracterizada pela elevada parasitemia circulante e o quadro clínico manifesta-se por mal-estar, febre, sudorese, dores musculares, irritação, anorexia, edema e às vezes vômitos e diarreia. Também podem ocorrer taquicardia desproporcional, esplenomegalia, hepatomegalia, erupções cutâneas e em alguns casos sinais de envolvimento do sistema nervoso central (meningoencefalite aguda) (Laranja *al.*, 1956; Andrade *et al.*, 2011).

Quando decorrente de transmissão por via vetorial, a infecção inicial pode ser acompanhada por sinais e sintomas locais, decorrentes 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).

A grande maioria dos pacientes na fase aguda não é diagnosticada devido a escassez ou ausência de manifestações clínicas. Além disso, os achados laboratoriais geralmente são inespecíficos. A contagem de células brancas, comumente, mostra que o paciente apresenta linfocitose e o comprometimento do coração é semelhante ao que ocorre com outros tipos de miocardite (Prata, 2001). Os testes sorológicos, como exame direto do sangue e xenodiagnóstico, só conseguem detectar a presença de *T. cruzi* no período de um a dois meses após a infecção, apresentando, então, resultados negativos durante as primeiras semanas.

Admite-se que entre 5 e 10% dos pacientes sintomáticos morram durante essa fase, devido a miocardite aguda, meningoencefalite e raramente devido à morte súbita (Rassi Jr *et al.*,2010; Andrade *et al.*,2011).

### **1.2.2. Fase crônica**

Na maioria dos indivíduos infectados, entre 2-4 meses após a fase aguda, as manifestações clínicas desaparecem e os parasitas são raramente detectados no sangue periférico (Prata, 2001). Cerca de 60-70% dos pacientes nunca desenvolvem uma forma clínica aparente da doença, apresentando, assim, a forma indeterminada da doença. Essa forma clínica é caracterizada por indivíduos que possuem positividade para sorologia e/ou exames parasitológicos para *T. cruzi*, mas não apresentam sintomas, sinais físicos ou evidências de lesões orgânicas ao eletrocardiograma e na radiografia do tórax, bem como nos exames radiológicos para o peito, esôfago e cólon (Andrade *et al.*,2011).

A fase crônica indeterminada pode persistir por 10-30 anos ou por toda a vida do paciente. Depois desse período, aproximadamente de 30-40% dos infectados apresentam manifestações relacionadas com o envolvimento do sistema nervoso e de certos órgãos tais como coração, esôfago, cólon, caracterizando as outras formas clínicas da doença. Nessa fase, se torna difícil a demonstração do parasito no sangue circulante mas é possível sua detecção nos tecidos (Rassi Jr *et al.*,2010).

Cerca de 7-10% dos pacientes apresentam manifestações digestivas, sendo que o megaesôfago e o megacólon são os principais distúrbios desta forma clínica. Essas alterações são devidas, principalmente, à destruição das células nervosas do sistema entérico. Indivíduos com comprometimento do esôfago apresentam incoordenação dos movimentos peristálticos, que posteriormente são seguidos de disfagia, odinofagia, refluxo, epigastria, dispepsia, hipertrofia das parótidas, discinesia esofágica e alterações morfológicas, como a dilatação. O principal sintoma do acometimento do cólon é a constipação prolongada. Também apresentam desordem motora do arco duodenal, alterações no trânsito intestinal e meteorismo (acúmulo de gases no abdômen) (Garcia *et al.*, 2003, Rassi Jr *et al.*,2010).

A existência de uma forma nervosa crônica, caracterizada por variados sintomas neurológicos, foi postulada por Chagas em 1911 com base na presença de encefalite nos casos agudos. De acordo com Chagas, a forma nervosa crônica era resultado de lesões observadas na forma aguda, sendo sequelas da encefalite. Posteriormente, Chagas então

sugeriu que, na maioria dos casos, a forma nervosa crônica era uma evolução das alterações histopatológicas (Pitella, 2009). Em nenhuma outra doença infecciosa o envolvimento do sistema nervoso autônomo é tão importante quanto na doença de Chagas, o que é demonstrado pela presença de lesões, denervação e desordens funcionais. Sendo que a denervação do sistema parassimpático está mais bem documentada e é mais intensa do que no sistema simpático (Prata, 2001). Uma pequena porcentagem de indivíduos infectados desenvolve encefalite na fase aguda da doença de Chagas, ocorrendo, principalmente, em lactentes e imunodeprimidos, sendo que, nestes últimos, o curso da doença pode ser fatal, em 10 a 20 dias após o diagnóstico (Madalosso *et al.*, 2004). A situação geralmente é grave, com morte praticamente em todos os casos, resultante do próprio comprometimento cerebral ou de miocardite chagásica aguda, sempre presente (Pitella, 1993).

A forma cardíaca crônica é a manifestação clínica mais significativa da doença de Chagas, devido a sua alta frequência e gravidade. Desenvolve-se em 20-30% dos indivíduos e o quadro clínico nesse estágio depende da expressão de 3 distúrbios que frequentemente são coexistentes: insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolismo. Frequentemente os pacientes apresentam insuficiência cardíaca biventricular com sintomas relacionados ao maior comprometimento do ventrículo direito, como estase jugular, hepatomegalia, ascite e edema de membros inferiores, associada a arritmias ventriculares, atriais e distúrbios de condução atrioventricular e intraventricular (Rassi Jr *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011).

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. Como já abordado, acidentes vasculares encefálicos são mais comuns em pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia chagásica do que em outras etiologias, caracterizando essa etiologia como fator de risco (Punukollu *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2011). A morte súbita é uma complicação ocasional e pode ocorrer até mesmo em pacientes que estavam previamente assintomáticos. Mas, geralmente está associada com taquicardia e fibrilação ventricular, ou, mais raramente, com bloqueio atrioventricular total ou disfunção no nó sinusal (Rassi Jr *et al.*, 2010).

### **1.3. Tratamento**

O objetivo do tratamento é a erradicação do *T. cruzi* e dos sintomas da doença. No entanto, o tratamento etiológico da doença de Chagas é controverso, devido à baixa eficácia, principalmente na fase crônica tardia, e elevada toxicidade dos agentes quimioterápicos indicados ao tratamento da doença (Raether *et al.*, 2003). Há recomendações para o uso dos antitripanossomatídeos em todos os casos de doença aguda, congênitas e infecção reativada, assim como para todas as crianças com infecção e para pacientes com doenças crônicas que tenham até 18 anos, pois já foi mostrado o uso benéfico dos medicamentos nessas populações. Em contraste, o tratamento é contraindicado durante a gravidez e em pacientes com insuficiência renal ou hepática grave (Rassi Jr *et al.*, 2010).

As drogas atualmente aceitas para o tratamento da doença de Chagas são nifurtimox e o benznidazol, lançados em 1967 e 1972, respectivamente (Jannin *et al.*, 2007). No Brasil, somente o benznidazol é utilizado, e em alguns casos, os efeitos colaterais requerem suspensão do tratamento. Os efeitos adversos mais importantes são: (i) hipersensibilidade, que pode causar erupção cutânea, febre, edema generalizado, linfadenopatia e dor nas articulações e músculos, (ii) depressão na medula óssea, e (iii) polineuropatia periférica. Os efeitos secundários são altamente dependentes da dose (Prata, 2001).

### **1.3.1. Tratamento na forma crônica cardíaca**

Além do controle da infecção parasitária, o tratamento dos pacientes cardiopatas chagásicos crônicos consiste no tratamento de diferentes manifestações clínicas da doença, envolvendo a disfunção ventricular e a insuficiência cardíaca, os fenômenos tromboembólicos e os distúrbios de ritmo. Para a insuficiência cardíaca são utilizados diuréticos, inibidores de angiotensina e betabloqueadores adrenérgicos. No entanto, a verdadeira eficácia e a tolerabilidade desses fármacos em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos ainda não foi cientificamente estabelecida. Seu uso é devido ao respaldo obtido pelo tratamento de insuficiência cardíaca de outras etiologias (Andrade *et al.*, 2011).

Outros métodos paliativos como aneurismectomia, cardiomioplastia e ventriculectomia parcial já foram realizados em alguns pacientes, mas ainda não foi comprovado a eficácia dessas intervenções na sobrevida do paciente (Bocchi *et al.*, 2001a). Além disso, pesquisas envolvendo o tratamento através do transplante de células

de medula óssea vêm sendo realizadas como busca por uma nova estratégia para reparar ou diminuir os danos causados ao miocárdio destes pacientes (Vilas-Boas *et al.*,2006).

O transplante cardíaco é reconhecido como a única opção de tratamento para a insuficiência cardíaca refratária, mesmo na ausência de estudos randomizado-controlados. Quando uma criteriosa seleção é utilizada para a escolha do doador e do receptor há um significativo aumento na sobrevida, na capacidade de exercício, no retorno ao trabalho e na qualidade de vida (Bacal *et al.*,2009).

Este procedimento cirúrgico, quando realizado em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos, necessita de seguimento diferenciado, devido ao maior número de comorbidades, incluindo neoplasia e reativação da infecção. No entanto, têm mostrado benefícios iguais, e até mesmo superiores, comparado as outras cardiopatias (Montera *et al.*,2013). Estudos já relataram taxas de sobrevivência para os pacientes chagásicos transplantados de 83% em um ano pós-transplante, 76% a dois anos e 46% em dez anos (Revisado por Machado *et al.*,2012). Assim, na Europa Central e na América do Sul, a presença da doença de Chagas no destinatário não representa contraindicação para o transplante de órgãos (Prata, 2001).

#### **1.4. Transplante cardíaco**

O Brasil tem ocupado cada vez mais destaque no campo dos transplantes, principalmente na América Latina. Além de ser referência no transplante cardíaco na doença de Chagas, guiando condutas que são incorporadas no mundo todo (Bacal *et al.*,2009). A doença de Chagas é a causa de cerca de 18% dos casos de insuficiência cardíaca refratária em grandes centros do país (Bocchi *et al.*, 1996). Além de ser a terceira principal indicação para o transplante cardíaco no Brasil (Bocchi *et al.*, 2001b).

De 1997 a 2014 ocorreram 3289 transplantes de coração no país. Atualmente, Minas Gerais é o segundo maior centro transplantador do país (ABTO, 2014). O Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG) foi credenciado em 2006 para este tipo de transplante e é o hospital referência em transplantes cardíacos deste estado.

##### **1.4.1. Avaliação do receptor**

Pacientes com indicação para transplante cardíaco, de acordo com a II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco:

- ✓ portadores de insuficiência cardíaca avançada;



- ✓ com limitação importante na atividade física; atividades menores que as cotidianas produzem sintomas. Confortáveis somente em repouso;
- ✓ com severas limitações. Sintomas presentes mesmo em repouso;
- ✓ portadores de sintomas graves sem alternativa de tratamento clínico;
- ✓ com pior prognóstico.

Alguns critérios de indicações e contraindicações têm mudado nos últimos anos, principalmente com relação à idade, teste cardiopulmonar, resistência vascular pulmonar, resistência vascular pulmonar, obesidade, câncer, diabetes melito, insuficiência renal, doença vascular periférica, abuso de drogas e doença de Chagas (Bacal *et al.*, 2009). Sendo que a última deixou de ser uma controvérsia devido aos seus bons resultados e sobrevida superior às outras etiologias (Bocchi *et al.*, 2001). As contraindicações estão resumidas na tabela 1.

**Tabela 1. Contraindicações absolutas e relativas para transplante cardíaco.**

	Resistência vascular pulmonar fixa > 5 Wood, mesmo após provas farmacológicas;
	Doenças cerebrovascular e/ou vascular periférica graves;
<b><i>Absolutas</i></b>	Insuficiência hepática irreversível, doença pulmonar grave;
	Incompatibilidade ABO na prova cruzada prospectiva entre receptor e doador;
	Doença psiquiátrica grave, dependência química e não aderência às recomendações da equipe;
	Idade maior do que 70 anos;
	Síndrome de imunodeficiência adquirida;
	Comorbidades com baixa expectativa de vida;
	Obesidade mórbida;
	Infecção sistêmica ativa;
	Úlcera péptica em atividade;
	Embolia pulmonar com menos de três semanas;
	Neoplasia com liberação do oncologista;
<b><i>Relativas</i></b>	Diabetes melito de difícil controle;
	Painel linfocitário > 10%.
	Amloidose/sarcoidose/hemocromatose;
	Hepatite B ou C;
	Diabetes insulino dependente com lesões graves de órgãos-alvo;
	Insuficiência renal com clearance abaixo de 30 ml/min/1,73 m <sup>2</sup> ;

**Fonte:** Bacal *et al.*, 2009

### **1.4.2. Imunossupressão**

A utilização de imunossupressores é um dos fatores responsáveis pelo sucesso dos transplantes. O esquema tríplice incluindo corticosteroide, inibidor de calcineurina e antiproliferativo são os mais utilizados na rotina da maioria dos centros (Taylor *et al.*, 2008). No HC-UFMG, os pacientes recebem tratamento com ciclosporina A, mofetil micofenolato e prednisona. Além disso, nenhuma terapia profilática anti-*T. cruzi*, pré ou pós transplante, é administrada aos pacientes chagásicos.

O fator preocupante do uso dos imunossupressores, a longo prazo, por pacientes chagásicos cardíacos transplantados é o risco da reativação da infecção. Sendo que, no tratamento da reativação chagásica, as doses de imunossupressores devem ser lentamente reduzidas e a possibilidade de rejeição monitorada (Bestetti *et al.*, 2009).

### **1.4.3. Acompanhamento ambulatorial pós-transplante cardíaco**

Após o transplante cardíaco, é necessário a monitoração dos pacientes em decorrência das potenciais comorbidades do transplante, que são: rejeição, infecção, doença coronariana, neoplasia e das complicações relacionadas à imunossupressão. Assim, os pacientes devem ser avaliados conforme critério médico, visitas ambulatoriais, ecocardiograma, eletrocardiograma, radiografia de tórax, dosagem de inibidor de calcineurina, dosagem de eletrólitos, enzimas hepáticas e hemograma. Realiza-se também a monitoração da sorologia para toxoplasmose, citomegalovírus, sorologia para Epstein-barr, clearance de creatinina, ultrassonografia de abdômen, holter, ecocardiograma com dobutamina, cateterismo cardíaco e biópsia endomiocárdica (Bacal *et al.*, 2009). No caso dos pacientes chagásicos, também é recomendado a realização de exame direto do sangue, xenodiagnóstico e hemocultura. A periodicidade das avaliações ambulatoriais e biópsias endomiocárdicas estão relacionadas na tabela 2, de acordo com o protocolo seguido pelo HC -UFMG.

**Tabela 2. Protocolo da periodicidade das revisões ambulatoriais e biópsias**

<b>Período</b>	<b>Revisão Ambulatorial</b>	<b>Biópsias</b>
<i>0–4 semanas</i>	Semanal com revisão completa*.	Semanal
<i>4–12 semanas</i>	Semanal com laboratório Quinzenal com revisão completa*.	Quinzenal
<i>3–6 meses</i>	Quinzenal/Mensal com revisão completa.	Mensal
<i>6–12 meses</i>	Mensal com revisão completa*.	Trimestral.
<i>&gt; 12 meses</i>	Trimestral com revisão completa*.	Anual.

\*Revisão completa: ECG, ecocardiograma, hemograma, leucograma, eletrólitos, níveis séricos de imunossupressor.

**Fonte:** Modificado de Bacal *et al.*, 2009

### **1.5. Métodos de diagnóstico**

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 os parasitos podem ser encontrados em quase todos os órgãos e em vários tipos celulares. Também é observado a presença de anticorpos inespecíficos e o início de formação de alguns anticorpos específicos nessa fase (Lana *et al.*, 1998). Assim, recomenda-se a pesquisa direta de tripomastigotas sanguíneos e a busca pela detecção da presença do parasito em tecidos, além do emprego de métodos parasitológicos indiretos, como xenodiagnóstico, hemocultura e PCR (Avila *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 2009). Vale ressaltar que nos pacientes chagásicos imunossuprimidos, quando há reativação da infecção, o parasitismo tecidual geralmente torna-se acentuado, semelhante ao visto nessa fase da enfermidade.

A fase crônica, caracteriza-se por baixo nível de parasitemia e alto nível de anticorpos (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003). Nessa fase, embora tenha crescido a indicação dos métodos de diagnóstico baseados em PCR, os testes sorológicos ainda são predominantemente indicados. Esses, baseiam-se na detecção de imunoglobulinas específicas contra o parasito, tais como os testes de fixação de complemento, hemaglutinação e imunofluorescência (Almeida *et al.*, 2012). O Ministério da Saúde preconiza a realização de dois testes sorológicos de princípios metodológicos ou preparações antigênicas diferentes para estabelecimento do diagnóstico (MS, 2013).

### **1.5.1. Principais métodos parasitológicos:**

#### **1.5.1.1. Métodos parasitológicos diretos:**

a) *Histopatologia*: A detecção das formas amastigotas do *T. cruzi* em preparados histológicos permanentes (lâminas) ainda é uma das técnicas mais utilizadas no diagnóstico anatomopatológico da infecção chagásica. Os cortes histológicos são obtidos a partir de fragmentos de órgãos devidamente processados. A pesquisa dos parasitos pode ser feita em lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE) ou por outras técnicas que permitem melhor observação da morfologia do parasito, como por exemplo, as derivadas do Romanovsky como Giemsa e Leishman. A imunohistoquímica, que é um conjunto de procedimentos em que se utiliza anticorpos como reagentes específicos para a detecção de antígenos presentes em células ou tecidos, trouxe valiosa contribuição para este tipo de diagnóstico (Duarte *et al.*, 1999).

b) *Exame de sangue a fresco*: Uma gota de sangue é coletada e examinada em um microscópio óptico com aumento de 400X, sendo necessário examinar 200 campos microscópicos, no mínimo, para concluir pela negatividade (Gomes, 1996).

c) *Esfregação sanguíneo*: Consiste na realização de um estirado de uma gota de sangue corada através de corantes de Romanovsky. Oferece poucas vantagens, devido a sua baixa sensibilidade. É indicado para o estudo morfológico dos tripanossomas encontrados ao exame de sangue fresco e/ou gota espessa para identificação da espécie (Rassi, 1992).

d) *Gota espessa*: Duas ou três gotas de sangue são depositadas em uma área de 1cm<sup>3</sup> da lâmina, as hemácias são lisadas e a lâmina é corada pelo método de Giemsa. A observação é realizada com auxílio da objetiva de imersão, procurando os parasitos por todos os campos da lâmina. Apresenta maior sensibilidade quando comparado ao exame a fresco e esfregação sanguíneo (Luquetti & Rassi, 2000).

e) *Método de Strout*: O método é realizado através da coleta de 5 a 10mL de sangue. Após a retração do coágulo o soro coletado é centrifugado. Em seguida, o sobrenadante também é centrifugado em alta rotação. Uma gota desse sedimento é analisada no microscópio para a observação de tripomastigotas. Dentre os métodos de concentração do parasito, o de Strout é o que apresenta os melhores resultados (Luquetti & Rassi, 2000).

#### **1.5.1.2. Métodos parasitológicos indiretos:**

a) *Xenodiagnóstico*: Este método consiste em investigar a presença de parasitas nas fezes e/ou conteúdo intestinal dos insetos vetores. Estes insetos são mantidos em laboratórios e são alimentados com sangue dos indivíduos que serão diagnosticados. O exame fecal ou do conteúdo intestinal é feito após 30-60 dias para pacientes em fase crônica e 10-30 dias para pacientes em fase aguda (Britto *et al.*, 2001). A sensibilidade do método é cerca de 50% na fase crônica e de 85-100% na fase aguda (Ferreira & Ávila, 2001).

b) *Hemocultura*: Esta técnica foi aprimorada por Chiari e colaboradores em 1989. Foi recomendado a coleta de 30 mL de sangue na presença de heparina. A amostra deve ser centrifugada e o sedimento lavado em meio LIT (Liver Infusion Tryptose), através de nova centrifugação. Os tubos são incubados a 28°C, o que favorece a involução de formas tripomastigotas em epimastigotas. Após 15, 30, 45 e 50 dias as amostras são analisadas por microscopia. Neste protocolo a sensibilidade pode chegar a 55,08% (Minter-Goedbloed *et al.*, 1978, Luz *et al.*, 1994).

### **1.5.2. Principais métodos sorológicos:**

Os exames sorológicos são de alta importância na fase crônica da doença de Chagas. Deve ser realizado um teste de elevada sensibilidade (ELISA com antígeno total ou imunofluorescência indireta) em conjunto com outro de alta especificidade. Visto que, embora os testes imunológicos exibam alta sensibilidade, é comum a observação de problemas de especificidade devido às reações cruzadas com antígenos de outros parasitas, principalmente com os do gênero *Leishmania* e com *T. rangeli* (Almeida *et al.*, 2012).

a) *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)*: É um teste imunoenzimático que se baseia na interação antígeno-anticorpo revelada por um cromógeno ativado pela reação específica entre enzima e substrato. Este método oferece alta sensibilidade, utilização de baixas quantidades de soro e é possível processamento simultâneo de várias amostras. No entanto, um dos principais problemas neste teste é a presença de reações falso-positivas, em que o valor da densidade óptica lida no espectrofotômetro fica muito próximo a linha de corte entre a amostra positiva e negativa (Gadelha *et al.*, 2003).

b) *Imunofluorescência indireta (IFI)*: Este teste é baseado na interação das formas epimastigotas de *T. cruzi* com anticorpos específicos anti-*T. cruzi*. Formas epimastigotas do parasito são fixadas numa lâmina de vidro. Em seguida, é adicionada a amostra do soro do paciente sobre a lâmina. A amostra pode conter ou não anticorpos específicos. 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. As vantagens deste método são: facilidade para se obter reações padronizadas, alta sensibilidade, regularidade dos resultados e a possibilidade de processamento de um grande número de amostras. Todavia, sua principal desvantagem é que a leitura é subjetiva nos casos de baixos níveis de anticorpos, havendo um pequeno percentual de reações cruzadas (Ferreira & Ávila, 2001).

c) *Hemaglutinação Indireta (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 parasita. Na presença de anticorpos anti-antígenos de *T. cruzi*, os mesmos formam ligações entre as hemácias, interagindo com os antígenos na sua superfície. Visualmente pode se observar um manto nas placas de microtitulação. As vantagens deste método são a sua facilidade de execução, rapidez de leitura, além de não necessitar de equipamentos adicionais. As desvantagens da técnica são a baixa sensibilidade quando comparado ao ELISA e ao IFI, e a utilização do 2-mercaptol-etanol, devido à sua toxicidade. Este reagente é utilizado para eliminar anticorpos inespecíficos de classe IgM que podem induzir resultados falso-positivos (Almeida *et al.*, 2012).

### **1.5.3. Diagnóstico molecular:**

Testes parasitológicos que visam a detecção direta dos parasitas no sangue, como o xenodiagnóstico e hemocultura são altamente específicos, mas têm mostrado baixa sensibilidade. Ao contrário, os testes sorológicos se mostram muito sensíveis, mas sua especificidade é insatisfatória. Assim, ensaios moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm se mostrado como uma boa ferramenta alternativa para a detecção de *T. cruzi* (Marcon *et al.*, 2002). O genoma de *T. cruzi* é caracterizada pela abundância de sequências repetidas de DNA, que podem ser amplificadas por PCR e utilizadas como alvo para a detecção e identificação do parasito (Carriazo *et al.*, 1998). Assim, PCRs baseados em diferentes abordagens, que visam ampliar o DNA do cinetoplasto (kDNA), o DNA nuclear ou DNA satélite têm sido utilizados com êxito para diagnosticar a infecção por *T. cruzi* (WHO, 2002). Além disso, esta técnica tem mostrado alta sensibilidade (Luquetti & Rassi, 2000).

Diversos trabalhos demonstraram que a amplificação da região variável do minicírculo do kDNA é específica para *T. cruzi* (Ávila *et al.*, 1990; Sturm *et al.*, 1989).

Um estudo realizado por Schijman e colaboradores (2011) para avaliar o desempenho de vários métodos de extração, marcadores e protocolos de amplificação para detectar *T. cruzi*, em amostras de sangue de pacientes chagásicos, mostrou que o protocolo da PCR kDNA foi um dos métodos considerados com melhor desempenho, apresentando sensibilidade de 75%, especificidade 100% e acurácia 87,5%. No entanto, a especificidade deste protocolo já foi contestada por outros pesquisadores, que relataram que os ensaios que tem como alvo esta região podem amplificar DNA não *T. cruzi* (Castro et al., 2002; Virreira et al., 2003). Assim, alguns ensaios que amplificam outros genes já foram relatados apresentando melhor especificidade, mas, geralmente, apresentam menor sensibilidade (Diez et al., 2007; Freitas et al., 2005; Herwaldt et al., 2000; Virreira et al., 2003).

Dessa forma, visando aumentar a sensibilidade diagnóstica sem perder especificidade, recentes estudos têm procurado realizar a associação de duas PCRs para o diagnóstico de *T. cruzi*. Benvenuti e colaboradores (2011) utilizaram como alvos o DNA nuclear (nDNA) e o DNA do cinetoplasto (kDNA) para a detecção de *T. cruzi* em biópsias endomiocárdicas derivadas de pacientes chagásicos transplantados. Foi verificado no grupo controle, que das 18 biópsias endomiocárdicas, derivadas de 6 pacientes que não haviam apresentado manifestação clínica de reativação um ano após o transplante, 3 biópsias apresentaram resultado positivo para o kDNA enquanto nenhuma foi positiva para o nDNA. Concluíram, então, que a amplificação do kDNA em amostras de biópsias endomiocárdicas não era específica para o diagnóstico da reativação da doença de Chagas.

Devido a essas controvérsias, estudos vêm sendo realizados a fim de encontrar melhores marcadores e protocolos de amplificação para a realização do diagnóstico molecular. Atualmente, os testes moleculares ainda não foram disponibilizados comercialmente e são utilizados apenas no ambiente de pesquisa, necessitando de estrutura apropriada e realização por pessoal treinado. Assim, é necessário a padronização da técnica, com o intuito de estabelecer um protocolo padrão que possa ser exercido por todos os grupos que desejam realizar esse teste na sua rotina clínica.

## **1.6. Reativação da doença de Chagas**

A reativação da infecção pelo *T. cruzi* afeta pacientes imunocomprometidos devido neoplasia ou infecção pelo HIV. Além dos pacientes cardiopatas chagásicos

transplantados submetidos ao tratamento imunossupressor (Bestetti *et al.*, 2009). Sabe-se que o transplante cardíaco é uma opção terapêutica válida para a insuficiência cardíaca, de etiologia chagásica, em fase terminal (Bocchi *et al.*, 2001b). No entanto, a persistência parasitária em alguns órgãos do receptor, associada com a imunossupressão, pode levar à reativação dessa doença (Benvenuti *et al.*, 2005). A incidência de reativação clínica varia entre 27% a 90% e o número médio de episódios de reativação da doença por paciente é cerca de 2,5 (Revisado por Machado *et al.*, 2012), podendo manifestar-se por paniculite e/ou miocardite e, mais raramente, por complicações cerebrais (Fiorelli *et al.*, 2005).

A monitoração da infecção por *T. cruzi* deve ser realizada através de pesquisa rotineira na biópsia endomiocárdica de receptores com doença de Chagas. A distinção entre rejeição celular e miocardite chagásica é crucial porque os tratamentos aplicados são diferentes. No entanto, essa discriminação geralmente é difícil, pois, nesta última condição, o parasito pode não estar representado na biópsia, mesmo utilizando-se imunohistoquímica. Assim, recentemente, a técnica de PCR tem sido proposta como ferramenta para identificar a presença do parasito. Além disso, na suspeita de reativação, devem-se buscar a detecção do parasito em tecidos, como também utilização de esfregaço, xenodiagnóstico ou hemocultura (Bacal *et al.*, 2009).

Quando os pacientes são rapidamente tratados, a mortalidade diretamente relacionada à reativação chagásica pós-transplante é reduzida, com adequada sobrevida em longo prazo. Quando possível, a redução da imunodepressão deve ser preconizada diante do diagnóstico ou da suspeita de reativação. A profilaxia específica com utilização de medicações com ação anti-*T. cruzi*, tem sido motivo de debate. A maior parte dos centros não utiliza profilaticamente, dentro do princípio de que esses pacientes já se encontram bastante debilitados e não há evidências científicas da eficácia do tratamento para esses pacientes (Bacal *et al.*, 2009).

### **1.7. Diversidade intraespecífica do *Trypanosoma cruzi***

A doença de Chagas possui um curso clínico variável, sendo que alguns indivíduos infectados desenvolvem cardiopatia, enquanto outros apresentam megaesôfago e/ou megacólon e alguns permanecem assintomáticos durante toda a vida. Assim como alguns pacientes submetidos ao transplante cardíaco e tratamento com imunossupressor, apresentam reativação da doença e outros não. Os fatores que influenciam essa variabilidade clínica ainda não foram elucidados, mas é provável que a



variação genética, tanto do hospedeiro quanto do parasito seja importante (Macedo & Pena, 1998).

O *T. cruzi* exibe alto grau de polimorfismo intraespecífico. Inicialmente essa variabilidade foi demonstrada através de caracterizações morfológicas. Diversos autores encontraram características variáveis das populações de *T. cruzi* em relação à morfologia dos tripomastigotas sanguíneos, ao tropismo tecidual, às variações na virulência e patogenicidade, diferentes taxas de crescimento e mortalidade e à suscetibilidade aos quimioterápicos (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 molecular, o *T. cruzi* possui grande diversidade genética. As primeiras pesquisas nesta área foram baseadas na análise de variantes eletroforéticas de isoenzimas (MLEE). Esta técnica envolve a eletroforese de extratos 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 3 grupos principais denominados zimodemas, Z1, Z2 e Z3. Em que Z1 e Z3 estão relacionados ao ciclo de transmissão silvestre e Z2 como o ciclo doméstico (Miles *et al.*, 1978).

Novas técnicas foram desenvolvidas com o avanço tecnológico da biologia molecular, permitindo o estudo da diversidade de *T. cruzi* em nível de DNA. A partir da avaliação de padrões eletroforéticos de bandas representativas de fragmentos do DNA do cinetoplasto (kDNA), após digestão com enzimas de restrição, foi possível determinar agrupamentos denominados de esquizodemas (Morel *et al.*, 1980). A associação desta técnica com a PCR ficou conhecida como PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) do kDNA. O gene do miniéxon é constituído por três regiões, uma altamente conservada, correspondente ao éxon, outra com 98% de identidade, correspondente aos íntrons, e uma região intergênica muito divergente. A amplificação dessa região intergênica do miniéxon em diferentes cepas de *T. cruzi* demonstrou um dimorfismo com produtos amplificados de 300pb e 350pb (Murthy *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 1996).

Posteriormente, análises comparativas de sequências do gene codificador do RNA ribossomal (rRNA) 24Sa de *T. cruzi* mostraram dimorfismo semelhante ao proposto com o gene de miniéxon (Souto & Zingales, 1993). O polimorfismo em uma região de 100 pb na extremidade 3' deste gene mostrou ser um importante marcador genético de

populações de *T. cruzi*. Pois, utilizando iniciadores desenhados para esta região, dois grupos foram definidos de acordo com o produto de amplificação. Um grupo apresentou fragmento de 125 pb enquanto o outro apresentou fragmento de 110 pb (Souto & Zingales, 1993). Mais tarde variações do tamanho destes fragmentos foram identificados.

Outra técnica baseada em PCR também foi desenvolvida: a análise de polimorfismos do DNA amplificado aleatoriamente (RAPD –*Random Amplified Polymorphic DNA*). 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 verificado a existência de correlação entre o perfil de RAPD e o de isoenzimas (MLEE) (Revollo *et al.*, 1998).

Além disso, com a finalidade de detectar múltiplas mutações em fragmentos de DNA foi desenvolvida a PCR de baixa estringência, utilizando um único iniciador, o LSSP-PCR- *Low Stringency Single Specific Primer Polymerase Chain Reaction* (Pena *et al.*, 1994). Inicialmente, amplifica-se o segmento gênico que se deseja avaliar o polimorfismo. Em seguida, após a amplificação e purificação, este fragmento é submetido a nova PCR usando um dos iniciadores que o gerou, em condições de baixa estringência. Os produtos dessa segunda amplificação geram um perfil de bandas típico para este fragmento, também denominado assinatura gênica. Este perfil é tão complexo e individual que modificações em um único par de bases pode ser detectado. Esta técnica tem sido aplicada com sucesso para o fragmento de 330 pb de *T. cruzi*, correspondente a região variável do minicírculo de kDNA (Macedo & Pena, 1998).

Assim, ao longo dos anos, várias abordagens têm sido utilizadas para caracterizar a estrutura da população de *T. cruzi*, definindo diversos subgrupos. Esses subgrupos 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) e, mais recentemente, *discrete typing or taxonomic units* (DTUs) (Tibayrenc 1998) e haplótipos (Freitas *et al.*, 2006, Herrera *et al.*, 2007).

Em 2009, durante o simpósio comemorativo do centenário da descoberta da doença de Chagas, foi oficializada a subdivisão da espécie *T. cruzi* em seis linhagens principais ou unidades discretas de tipagem (DTUs), de TcI a TcVI (Tabela 3). Estes

DTUs apresentam distribuição diferencial em vetores, hospedeiros definitivos e ciclos de transmissão (Zingales *et al.*, 2012).

**Tabela 3. Nomenclatura para as subdivisões de *Trypanosoma cruzi***

DTU	Abreviação	Equivalência ao antigo esquema de classificação
<i>T. cruzi I</i>	TcI	T. cruzi I <sup>a, b</sup> e DTU I <sup>c</sup>
<i>T. cruzi II</i>	TcII	T. cruzi II <sup>a</sup> e DTU II <sup>b c</sup>
<i>T. cruzi III</i>	TcIII	Z3/Z1 ASAT <sup>d</sup> , Z3-A <sup>e</sup> , DTU II <sup>c e</sup> e T. cruzi III <sup>f</sup>
<i>T. cruzi IV</i>	TcIV	Z3 <sup>d</sup> , Z3-B <sup>e</sup> e DTU II <sup>a c</sup>
<i>T. cruzi V</i>	TcV	Z2 Boliviano <sup>d</sup> , rDNA ½ <sup>g</sup> , clonet 39 <sup>h</sup> e DTU II <sup>d c</sup>
<i>T. cruzi VI</i>	TcVI	Z2 Paraguaio <sup>i</sup> , Zimodema B <sup>j</sup> e DTU II <sup>e c</sup>

**Legenda:** DTU: discrete typing units; <sup>a</sup>: Anonymous 1999; <sup>b</sup>: Falla *et al.*, 2009; <sup>c</sup>: Brisse *et al.*, 2000; <sup>d</sup>: Miles *et al.*, 1981; <sup>e</sup>: Mendonça *et al.*, 2002; <sup>f</sup>: Freitas *et al.*, 2006; <sup>g</sup>: Souto *et al.*, 1996; <sup>h</sup>: Tibayrenc & Ayala 1991; <sup>i</sup>: Chapman *et al.*, 1984; <sup>j</sup>: Carneiro *et al.*, 1990.

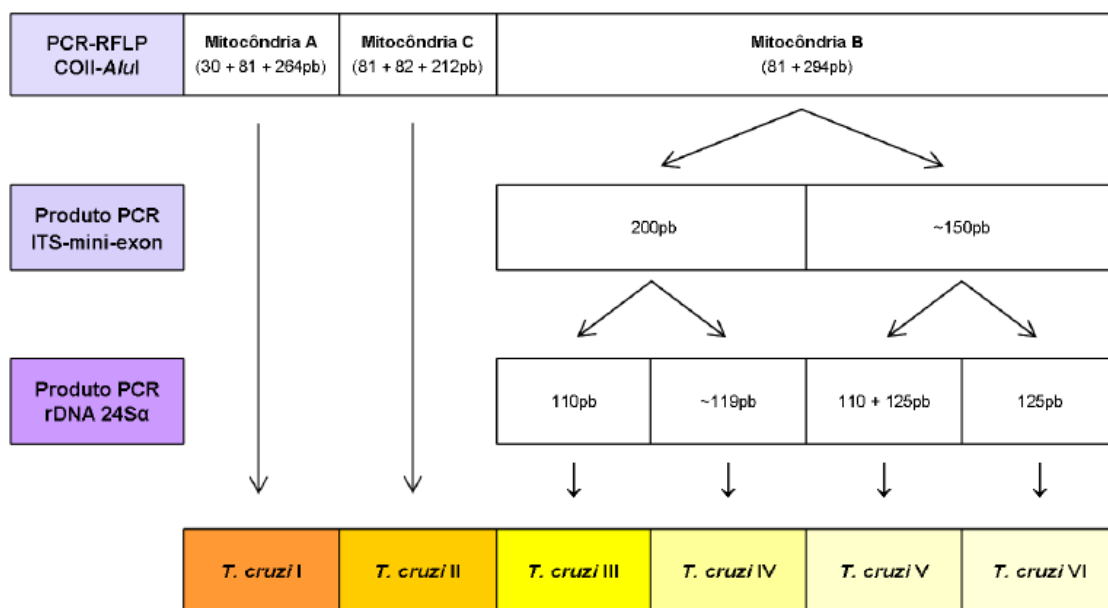
**Fonte:** Adaptado de Zingales *et al.*, 2009.

### 1.8. Genotipagem dos seis 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 $\alpha$  e rDNA 18S (Souto *et al.*, 1996; Brisse *et al.*, 2001). No entanto, essas técnicas são consideradas limitadas, pois alguns resultados baseiam-se na ausência de bandas ao invés da presença (Zingales *et al.*, 2012). Além disso, as técnicas baseadas na análise do polimorfismo genético utilizando multilocus PCR-RFLP também têm sido utilizadas. Entretanto, por necessitar da combinação de vários ensaios, é considerada uma técnica complexa, o que limita sua utilização (Rozas *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2009).

Em 2009, Lewis e colaboradores proporam uma estratégia de tipagem sequencial, utilizando três marcadores, capaz de discriminar os seis DTUs. Consiste na amplificação por PCR do rDNA 24S $\alpha$ , 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 também descreveram um ensaio baseado em três passos. Primeiramente, ocorre a PCR-RFLP do gene COII seguido por digestão com *AluI*, o que permite a discriminação de TcI e TcII das outras linhagens. Em seguida, é realizado a PCR da região intergênica do miniéxon, que permite a separação das cepas, que ainda não foram classificadas, em dois

grupos: o grupo formado por TcIII e TcIV e outro grupo por TcV e TcVI. Finalmente, é realizado uma PCR do gene rDNA 24S $\alpha$ , permitindo a completa discriminação do DTU (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema do ensaio triplo utilizado para discriminação das seis linhagens principais de *Trypanosoma cruzi*. **Fonte:** (Macedo & Segatto, 2010).

Outros esquemas de tipagem baseados em técnicas moleculares diferentes estão sendo propostos para caracterizar as principais linhagens de *T. cruzi*. Ainda não foi estabelecido uma padronização sobre quantos e quais marcadores devem ser utilizados para se ter uma classificação homogênea das estirpes analisadas.

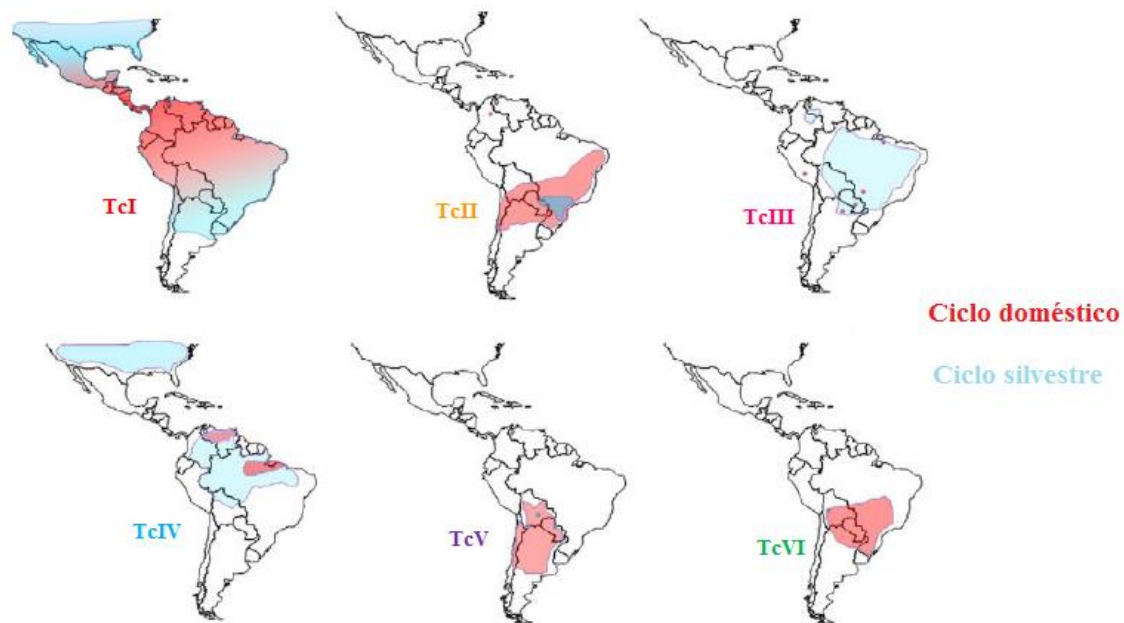
### 1.9. Epidemiologia e implicações clínicas das linhagens de *Trypanosoma cruzi*.

Como já abordado, a doença de Chagas apresenta diferentes manifestações clínicas. A prevalência do tipo de manifestação apresentada e a suscetibilidade ao tratamento variam geograficamente. Ainda não se sabe se isto é resultado da variabilidade genética do parasito, da imunogenética do hospedeiro humano, de fatores ambientais ou da ação combinada destes elementos (revisado por Zingales, 2011). Após a revisão da nomenclatura das DTUs de *T. cruzi*, diferentes grupos têm buscado levantar os aspectos epidemiológicos dessas linhagens.

TcI tem sido amplamente encontrado em ciclos silvestres. No entanto, também é um dos principais agentes da infecção humana na parte norte da América Latina e na

região amazônica (Miles *et al.*, 2009). Pacientes infectados com TcI apresentam, geralmente, as formas indeterminadas e cardíacas da doença de Chagas. A reativação chagásica em indivíduos imunossuprimidos devido ao tratamento recebido pós-transplante cardíaco ou por causa da infecção pelo vírus HIV, parece estar associada a essa linhagem. Além disso, nestes casos, esta estirpe frequentemente está associada com complicações do sistema nervoso central e meningoencefalite (Anez *et al.*, 2004; Burgos *et al.*, 2008).

Analisando outras regiões da América do Sul, é possível notar que predomina a estirpe de TcV na Bolívia, no Chile e no Paraguai. Na Argentina já foram identificados TcV e TcVI, e no Brasil, exceto na região amazônica, é mais frequente a linhagem de TcII (Figura 3).



**Figura 3:** Distribuição epidemiológica das DTUs de *T. cruzi* nos ciclos doméstico e silvestre. **Fonte:** Modificado de Zingales, 2012.

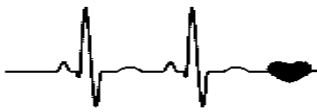
Embora todos DTUs possam causar doenças no homem, TcII, TcV e TcVI estão associados, principalmente, aos ciclos de transmissão domésticos na região do Cone Sul da América do Sul e a forma mais grave da doença, enquanto que TcIII e TcIV são encontrados predominantemente em ciclos silvestres (Miles *et al.*, 2009; Yeo *et al.*, 2005). Ademais, estudos epidemiológicos demonstram que a linhagem TcI não favorece a forma digestiva e aparentemente as DTUs II e V seriam as mais patogênicas, promovendo manifestações cardíacas e digestivas. Um resumo com as principais

características do ciclo de transmissão, distribuição geográfica e aspectos clínicos relacionados com cada DTU está apresentado na tabela 4.

**Tabela 4. Resumo do ciclo de transmissão, distribuição geográfica e aspectos clínicos associados às linhagens de *Trypanosoma cruzi*.**

<b>Linhagem</b>	<b>Ciclo de transmissão</b>	<b>Distribuição geográfica</b>	<b>Aspectos clínicos</b>
<b>TcI</b>	Predominante no ciclo silvestre	Região Amazônica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Associada às formas mais leves da doença de Chagas crônica no Brasil;</li> <li>- Possivelmente associada à doença de Chagas grave na Argentina, Colômbia e Venezuela;</li> <li>- Associada à transmissão oral e casos agudos severos no Brasil;</li> <li>- Possivelmente associada à neuroencefalite em pacientes imunocomprometidos.</li> </ul>
<b>TcII</b>	Predominante no ciclo doméstico	Principal agente na região Cone Sul da América do Sul	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Causa principal de doença de Chagas grave aguda e crônica no Cone Sul;</li> <li>- Megaesôfago e megacólon no Brasil</li> </ul>
<b>TcIII</b>	Predominante no ciclo silvestre	Norte da América do Sul	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Raramente causa infecção humana</li> </ul>
<b>TcIV</b>	Predominante no ciclo silvestre	Sul dos Estados Unidos a norte da América do Sul	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Linhagem mal compreendida;</li> <li>- Poucas cepas foram isoladas de casos humanos;</li> <li>- Possivelmente associada à transmissão oral e casos agudos graves no Brasil;</li> </ul>
<b>TcV</b>	Predominante no ciclo doméstico	Bolívia, Chile, Argentina e sul do Brasil	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Casos graves de doença de Chagas aguda e crônica;</li> <li>- Megaesôfago e megacólon na Bolívia;</li> <li>- Associada à transmissão congênita na Bolívia, Argentina e região sul do Brasil</li> </ul>
<b>TcVI</b>	Predominante no ciclo doméstico	Bolívia, Paraguai e sul do Brasil	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Casos graves de doença de Chagas aguda e crônica.</li> </ul>

**Fonte:** Modificado de Macedo & Segatto, 2010



## **2. Justificativa**

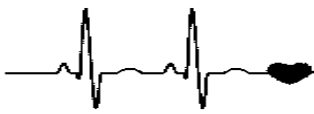
O transplante de coração é uma opção terapêutica válida para o paciente portador de cardiopatia chagásica crônica e as taxas de sobrevida têm sido consideradas aceitáveis (Bocchi *et al.*, 2001a). Todavia, o tratamento imunossupressor pós-transplante leva ao comprometimento das defesas imunológicas do organismo, podendo aumentar a probabilidade de infecções, incluindo a reativação da doença de Chagas (Couto *et al.*, 2001; Schijman, *et al.*, 2000).

O início do tratamento para a reativação da infecção tem sido utilizado apenas após as primeiras evidências clínicas ou histopatológicas. No entanto, o diagnóstico diferencial de rejeição celular do implante e o da reativação da infecção chagásica, tem sido considerado difícil. Visto que, o infiltrado inflamatório que pode ser encontrado na biópsia endomiocárdica devido a reagudização da doença de Chagas é semelhante ao observado na rejeição celular do implante (Andrade *et al.*, 2011) e as formas intracelulares do parasito raramente são encontradas no exame direto da biópsia endomiocárdica de pacientes chagásicos crônicos (Benvenuti *et al.*, 2005). Além do mais, os métodos parasitológicos convencionais são de baixa sensibilidade devido a parasitemia subpatente na fase crônica (Meira *et al.*, 2002; Marcon, *et al.*, 2002).

Dessa forma, visto que a obtenção de um diagnóstico molecular diferencial é necessária para se avaliar a existência ou não de reativação, temos como hipótese desse trabalho que a utilização de uma técnica mais sensível como a PCR poderia trazer importantes contribuições para o diagnóstico.

Além disso, os fatores que determinam as diferentes manifestações clínicas e os que levam às formas leve ou grave da doença ainda não estão completamente esclarecidos. Assim, como também é desconhecido o motivo pelo qual alguns pacientes chagásicos cardiopatas submetidos ao transplante cardíaco apresentam reativação da doença e outros não. Assim, investigar se há padrões genéticos recorrentes entre os parasitos associados a processos de reativação da doença, poderia permitir o estabelecimento de prognóstico e identificação precoce de pacientes sob risco de reativação da doença.





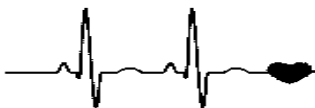
### **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo geral**

- ✓ Avaliar a possibilidade de utilização de ferramentas moleculares para a detecção e genotipagem do *Trypanosoma cruzi* em amostras biológicas.

### **3.2. Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar se a técnica de PCR é adequada para ser utilizada como ferramenta de diagnóstico da presença do *T.cruzi* em biópsias endomiocárdicas, oriundas de pacientes cardiopatas chagásicos submetidos a transplantes cardíacos.
- ✓ Avaliar, através de estudos retrospectivos, a possibilidade de se utilizar o diagnóstico molecular para a identificação precoce de reativação da infecção chagásica.
- ✓ Observar, através da genotipagem das amostras positivas, se há ocorrência de linhagens de *T. cruzi* mais associadas à reativação da doença de Chagas.



## **4. Material e Métodos**

#### **4.1. Pacientes e amostras**

Foram realizados estudos retrospectivos e/ou estudos prospectivos com 497 biópsias endomiocárdicas derivadas do monitoramento de 58 pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica, que foram submetidos a transplante cardíaco no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC- UFMG), no período entre 2008 e 2014. Os pacientes participantes deste 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).

A biópsia endomiocárdica é amplamente utilizada para a vigilância da rejeição do enxerto cardíaco e diagnóstico de disfunção ventricular sem explicação, além disso, está sendo implementado o seu uso para diagnóstico de algumas doenças do miocárdio. Assim, após o transplante, esses pacientes foram submetidos a biópsias periodicamente, 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 é realizado sempre que há suspeita clínica de rejeição ou reativação da doença de Chagas (Bacal *et al.*, 2009).

O diagnóstico da reativação é considerado na presença de sinais clínicos como febre, nódulos subcutâneos, manifestação neurológica, pancitopenia, lesões cutâneas, comprometimento agudo de função ventricular, arritmias e confirmado pela detecção da presença do protozoário através de imunohistoquímica e práticas de histologia (Bacal *et al.*, 2010).

Como parte do protocolo para prevenção de rejeição do enxerto todos os pacientes receberam tratamento com ciclosporina A, mofetil micofenolato e prednisona. Além disso, nenhuma terapia profilática anti-*T. cruzi*, pré ou pós transplante, foi administrada aos pacientes.

#### **4.2. Preparação do DNA genômico do *T. cruzi***

Para o estudo retrospectivo, foram realizadas de 5 a 12 secções de 10 µm de espessura nos blocos de parafina contendo biópsias endomiocárdicas. Os fragmentos foram processados com o Kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Valencia, CA) para a extração do DNA, segundo as orientações do fabricante. Já para o estudo prospectivo,

os tecidos cardíacos frescos conservados em etanol, foram processados utilizando o kit QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen, Valencia, CA)

Para o controle do procedimento de extração de ambos estudos e também verificação da integridade do DNA extraído, foi realizada a amplificação de uma região polimórfica do DNA humano, utilizando os iniciadores MID-768-F e MID-768-R (Tabela 5). O controle positivo utilizado foi o DNA de pool humano e o controle negativo foi constituído pelos reagentes da PCR, sem adição de DNA.

**Tabela 5. Sequências dos iniciadores utilizados neste trabalho.**

<b>Técnica</b>	<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>	<b>Referência</b>
<i>Controle de extração de DNA</i>	MID-768-F	5'-CATTACCAGTAGAGTGGGGA-3'	Weber <i>et al.</i> , 2002
	MID-768-R	5'-CTATGCCCTACTGGATCTAGG-3'	
<i>PCR kDNA</i>	S35-F	5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3'	Wincker <i>et al.</i> , 1994
	S36-R	5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'	
<i>PCR-RFLP 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 rDNA 24Sa</i>	D71-F	5'-AAGGTGCGTTCGACAGTGTGG-3'	Souto <i>et al.</i> , 1993
	D72-R	5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'	
	D75-F	5'-CAGATCTTGGTTGGCGTAG-3'	
<i>PCR ITS-miniéxon</i>	TCac- F	5'-CTCCCCAGTGTGGCCTGGG-3'	Burgos <i>et al.</i> , 2007
	UTCC-R	5'-CGTACCAATATAGTACAGAACTG-3'	

### 4.3. Métodos utilizados para o diagnóstico molecular da presença de *T. cruzi*

#### 4.3.1. 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 (Wincker *et al.*, 1994) (Tabela 5).

Os produtos da amplificação foram visualizados através da eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corado pela prata (item 4.3.2). Para avaliar o desempenho do ensaio,

incluiu-se controles positivos, constituídos de DNA de cepas JG de *T. cruzi* e também controles negativos, compostos de reações de PCR sem adição de DNA.

#### **4.3.2. PCR em tempo real do gene rDNA 24S $\alpha$**

Foi realizado uma *hemi nested* PCR do gene do rRNA 24 S $\alpha$  para a realização do diagnóstico molecular do *T. cruzi*. Os produtos foram identificados a partir de curvas de dissociação por PCR em tempo real (Freitas *et al.*, 2005).

A primeira etapa de amplificação foi realizada usando os iniciadores D75 direto e D72 reverso (Tabela 5) e 5 $\mu$ L do produto da extração obtido a partir das amostras de tecido. Enquanto a segunda etapa foi realizada com os iniciadores D71 direto e D72 reverso (Tabela 5) e como molde foi utilizado 2 $\mu$ L do produto da primeira PCR. As reações da segunda etapa foram realizadas em aparelho de PCR em tempo real.

Os controles positivos utilizados foram DNA de cepas ou clones que representam as DTUs TcI e TcII, constituídos pelo clone Col 1.7G2 ( $T_M \sim 81^\circ\text{C}$ ) e cepa JG ( $T_M \sim 76^\circ\text{C}$ ), respectivamente. Já os controles negativos foram formados pelos componentes da reação de PCR, sem o DNA.

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

Para caracterização das linhagens de *T. cruzi* presentes nas amostras biológicas em que houve resultado positivo para a reação de amplificação do kDNA e/ou rDNA 24S $\alpha$  foi realizado um ensaio sequencial inicialmente proposto por D'Ávila *et al.* (2009). Esta metodologia é baseada em 3 marcadores: o gene COII (de Freitas *et al.*, 2006), o espaçador intergênico dos genes de miniéxon (Burgos *et al.*, 2007) e o gene rDNA 24S $\alpha$  (Souto *et al.*, 1996) (Figura 2).

##### **4.4.1. PCR-RFLP do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II**

Para amplificação do gene mitocondrial COII diretamente dos tecidos dos pacientes foi realizado o *full nested* PCR (Freitas *et al.*, 2006; Valadares *et al.*, 2008). Na primeira etapa foram utilizados os iniciadores DsMit- F e DsMit- R (Tabela 5). Já na segunda amplificação, os iniciadores Tcmit-10 e Tcmit-21 (Tabela 5). Após as reações de amplificação, foi então realizada a digestão dos produtos 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 linhagens TcI, Tc II e Tc III- VI. São eles, respectivamente: o clone Col.17G2, que apresenta fragmentos com 30, 81, 264 pb e é caracterizado como haplótipo A; a cepa JG que apresenta fragmentos com 81 e 212 pb e é caracterizado como haplótipo C; e o clone CL Brener que mostra fragmentos com 81 e 294 pb e é caracterizado como haplótipo B (Freitas *et al.*, 2006). Assim, esta etapa permite a discriminação de TcI e TcII, mas não diferencia as demais linhagens (TcIII, IV, V e VI).

#### **4.4.2. Amplificação da região intergênica dos genes miniéxon**

A amplificação da região intergênica dos genes miniéxon foi realizada utilizando o iniciador TCac e UTCC (Tabela 5). Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e então o gel foi corado pela prata.

A partir 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 apresentam um amplicon de ~200pb e os últimos de ~ 150-157 pb (Burgos *et al.*, 2007).

#### **4.4.3. Amplificação da região 3' do gene rDNA 24 Sa**

Este tipo de PCR é uma alternativa ao PCR em tempo real, assim, nesse método foi utilizado a PCR convencional. Para a diferenciação das DTUs TcIII, IV, V e VI foi realizado a amplificação da região 3' do gene rDNA 24 Sa através do *hemi nested* PCR, adaptado de Souto *et al.* (1996). Foi utilizado na primeira etapa os iniciadores D75 e D72 e na segunda amplificação os iniciadores D71 e D72 (Tabela 5). Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e então o gel foi corado pela prata.

Os controles positivos usados foram clones que representam os DTUs TcI (clone Col1.7G2, fragmento de 110 pb), TcII (cepa JG, fragmento de 125 pb) e o TcV (clone SO3 C15, fragmentos de 110 e 125 pb).

#### **4.5. Métodos de análise dos produtos da PCR**

Os produtos da amplificação obtidos por meio das PCRs foram analisados em géis de poliacrilamida a 6% e corados pela prata (Santos *et al.*, 1993). Uma alíquota de 5µL do produto amplificado, diluído com igual volume do tampão da amostra 2× foi aplicado no gel. Após a eletroforese, os géis foram transferidos primeiramente para a solução fixadora (etanol absoluto 10%, ácido acético 0,5%). Em seguida, foram deslocados para solução reveladora composta por 0,2% de nitrato de prata. Em cada uma destas etapas os géis foram mantidos sob agitação lenta durante 15 minutos. Posteriormente, foi feita a lavagem com água mili-Q rapidamente, seguido da redução dos sais de prata com 3% (p/v) de hidróxido de sódio (NaOH) e 0,3% de formaldeído a 37% até a visualização das bandas. Os géis foram então novamente transferidos para solução fixadora e fotografados para documentação.

#### **4.5. Análises estatísticas**

O Coeficiente Kappa pode ser definido como uma medida de associação usada para descrever e testar o grau de concordância entre os eventos, além daquele que seria esperado somente pelo acaso. Valor de Kappa > 0,75 é classificado como excelente concordância, variando de 0,75 a 0,40 como bom a razoável e < 0,40 como ruim (Fleiss, 1981).

Dessa forma, o índice kappa foi calculado para avaliar a concordância entre as diferentes PCRs que foram utilizadas para o diagnóstico molecular. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste exato de Fisher.





## **5. Resultados e Discussão**

---

## 5.1. Pacientes

O Hospital das Clínicas da UFMG (HC- UFMG) é atualmente o segundo maior centro de transplantes de coração do país. Sendo que o número de transplantes chega a 25 por ano, com ótimos resultados pós- transplante (Moreira, 2011).

Entre os pacientes cardiopatas chagásicos crônicos que se submeteram ao transplante cardíaco no HC- UFMG entre 2008 e 20014, foram avaliados 58 pacientes. Sendo 40 pacientes do sexo masculino e 18 do sexo feminino. A média da idade entre os pacientes na data do transplante foi de 44 anos (intervalo 20-59 anos) e a faixa etária prevalente foi de 50 a 59 anos. Esses dados corroboram com os relatos que mostram como fatores de pior prognóstico para a cardiopatia chagásica crônica o gênero masculino e idade entre 30 -59 anos (Coura *et al.*, 1985).

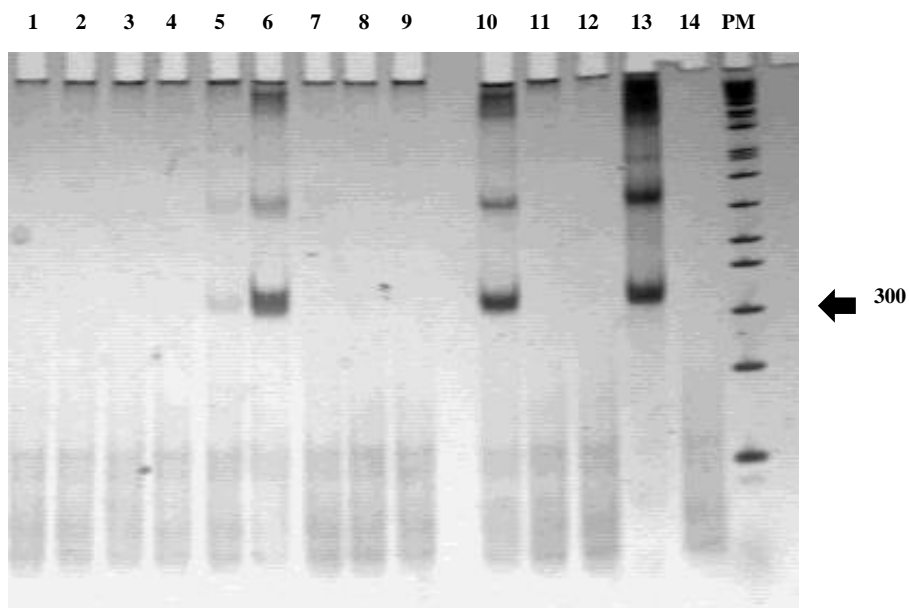
Durante o período de estudo, 6 pacientes transplantados faleceram. Alguns devido a falência aguda do enxerto, outros devido a infecções diversas, como infecção pulmonar, varicela ou infecção por citomegalovírus. Apenas um paciente teve o seu óbito relacionado a reativação ou complicações associadas à doença de Chagas, tendo como causa do falecimento a suspeita de reativação neurológica de Chagas. Atualmente, a mortalidade associada com reativação da infecção por *T. cruzi* é baixa, cerca de 0,7% (Bocchi *et al.*, 2001a).

## 5.2. Diagnóstico molecular de *T. cruzi*

Foram realizados estudos retrospectivos com 144 biópsias e estudos prospectivos com 353, totalizando em 497 biópsias endomiocárdicas derivadas do acompanhamento pós-transplante de 58 pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica.

Para detectar a presença de *T. cruzi* nas amostras biológicas coletadas, realizamos duas estratégias de diagnóstico molecular: (i) PCR convencional, tendo como alvo o DNA mitocondrial e (ii) PCR em tempo real, em que o alvo foi o DNA nuclear.

Para a PCR convencional foram consideradas positivas as amostras que apresentaram banda de ~330 pb para a amplificação específica da região variável do minicírculo do kDNA (Figura 4).

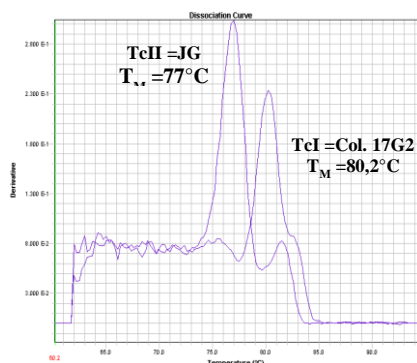


**Figura 4:** Resultados representativos da amplificação do fragmento de 330 pb da região hipervariável do minicírculo de kDNA de *T. cruzi* diretamente das biópsias endomiocárdicas dos pacientes cardiopatas chagásicos transplantados. Amplificação positiva para kDNA nas amostras dos pacientes **5, 6 e 10; 13**) amostra da cepa JG (controle positivo) **14**) Branco: mix da reação sem DNA; **PM**) Padrão de peso molecular (1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®).

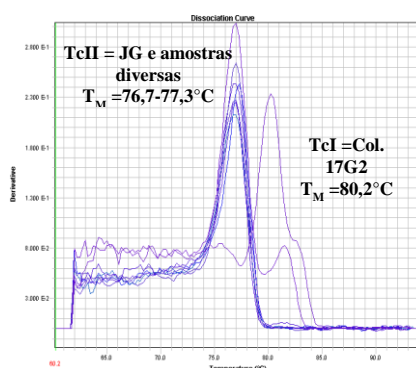
Já para a técnica da PCR em tempo real, foi realizado uma *hemi nested* PCR do gene do rRNA 24 S $\alpha$  e os produtos foram identificados a partir das curvas de dissociação geradas pelo programa. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram T<sub>M</sub> entre 76- 81°C na curva de dissociação e foram consideradas negativas àquelas em que a curva de amplificação estava abaixo do *cut off* obtido de referência com os controles negativos. Os pequenos picos encontrados nas amostras negativas são resultado da natureza da técnica que utiliza a estratégia *hemi nested* para aumentar a chance de detecção do DNA de *T. cruzi* (Figura 5).

Esta técnica além de ser um método útil para o diagnóstico, permite também a identificação das DTUs TcI versus TcII- TcVI diretamente das biópsias endomiocárdicas dos pacientes cardiopatas chagásicos transplantados. O T<sub>M</sub> característico do DTU TcI é cerca de 81°C, já para as outras DTUs (TcII- TcVI), T<sub>M</sub> ~ 76°C.

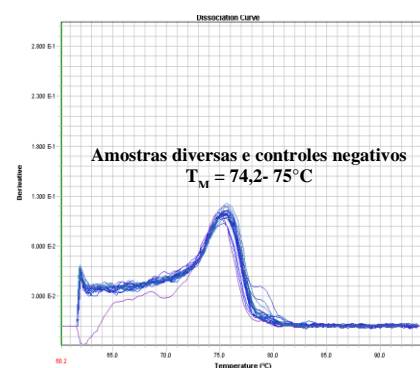
### Controles positivos



### Amostras e controles positivos



### Amostras e controles negativos



**Figura 5:** Resultados representativos das curvas de dissociação obtidas por PCR em tempo real do gene rDNA 24S $\alpha$  diretamente dos tecidos dos pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.

Aproximadamente 62% dos pacientes analisados apresentaram algum resultado positivo para pelo menos um dos testes de diagnóstico molecular realizado (Tabela 6).

**Tabela 6. Número total de amostras e pacientes e o número de amostras e pacientes que apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos PCRs utilizados para o diagnóstico.**

Amostras	Amostras positivas
497	111
Pacientes	Pacientes positivos
58	36

**Amostras:** número de biópsias endomiocárdicas analisadas, derivadas de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.

**Pacientes:** número de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados analisados.

Com a realização destas duas metodologias de diagnóstico molecular verificamos que das 111 amostras positivas, 63 deram positivo para ambos os métodos e 38 amostras foram positivas apenas para a PCR convencional para kDNA e que 9 amostras foram exclusivamente positivas para o real time PCR do rDNA 24S $\alpha$ . Além disso, 387 amostras deram resultado negativo para ambas as técnicas (Tabela 7).

Há uma boa correlação entre os resultados gerados por PCR para kDNA e para o real time PCR do rDNA 24S $\alpha$ , como demonstrado pelo índice de correlação de Kappa = 0,676 e P <0,001. Visto que valores kappa variando de 0,75 a 0,40 são considerados como bom a razoável (Fleiss, 1981).

**Tabela 7. Comparação de contingência dos resultados encontrados para os dois métodos de diagnóstico molecular utilizados.**

		<b>rDNA real time</b>	
		Positivo	Negativo
<i>Amostras</i>	<b>kDNA PCR</b>	Positivo	63
		Negativo	38
		<b>rDNA real time</b>	
		Positivo	Negativo
<i>Pacientes</i>	<b>kDNA PCR</b>	Positivo	27
		Negativo	7

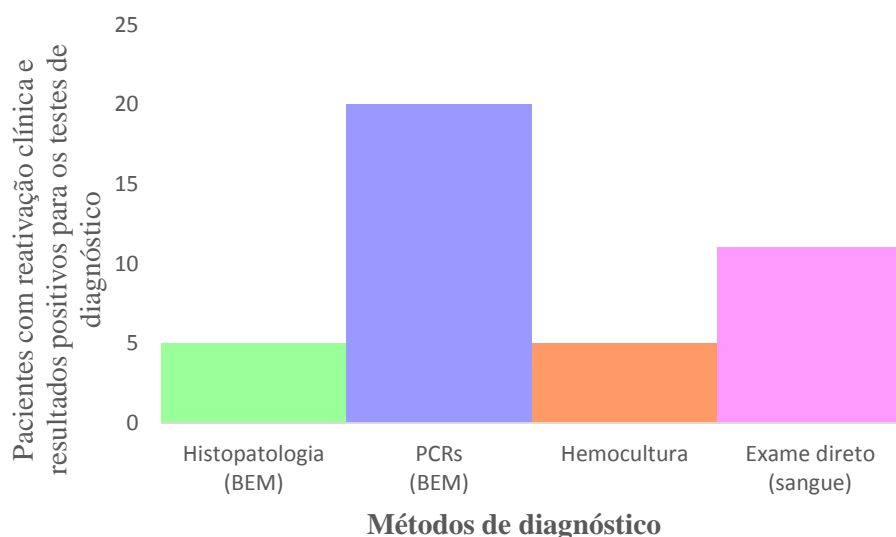
**Amostras:** número de biópsias endomiocárdicas de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados apresentando resultados positivos ou negativos para os métodos de PCR testados;

**Pacientes:** número de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados apresentando resultados positivos ou negativos para os métodos de PCR testados;

\*  $P < 0,001$  (teste do qui-quadrado);  $Kappa_{amostras} = 0,676$ ;  $Kappa_{pacientes} = 0,690$

O seguimento clínico dos pacientes portadores de cardiopatia chagásica submetidos a transplante, revelou que dos 36 pacientes positivos para pelo menos um dos testes moleculares, 29 apresentaram reativação clínica da doença de Chagas (Tabela 8 e Tabela 9). Deste modo, existe uma boa intensidade de associação (80,55%) entre os resultados gerados em conjunto, por PCR para kDNA e PCR em tempo real do rDNA 24Sα, com a reativação da doença clínica. Quando analisados em separado, observamos 72,22% de associação da manifestação clínica com o método de kDNA e 66,66% para o rDNA.

Dos 29 pacientes que apresentaram reativação clínica, apenas 5 pacientes haviam sido diagnosticados com reativação da doença de Chagas pelo teste direto da análise histológica da biópsia endomiocárdica (BEM). Enquanto que o diagnóstico por PCR diretamente das biópsias apresentaram resultados positivos para 20 destes pacientes (Figura 6). Além disso, analisando os métodos parasitológicos utilizados no HC- UFMG, quando há suspeita de reativação, temos que apenas 11 dos pacientes com sintomas clínicos da reativação chagásica foram diagnosticados como positivos para a presença de *T. cruzi* através do exame direto do sangue e 5 através da hemocultura (Figura 6).



**Figura 6:** Comparação entre os métodos de diagnóstico. Análise do número de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados com reativação clínica da doença que apresentaram resultados positivos para os testes de diagnóstico utilizados.

Para avaliar se as metodologias de PCR utilizadas poderiam antecipar o diagnóstico da reativação clínica da doença de Chagas, foi realizado um estudo retrospectivo através da análise de biópsias endomiocárdicas que estavam embebidas em parafina formando blocos. Para este estudo, apenas as 6 primeiras biópsias endomiocárdicas obtidas após o transplante de 24 pacientes foram comparadas com os dados clínicos referentes a reativação da doença (Tabela 8).

Dos 24 pacientes analisados retrospectivamente, 15 apresentaram reativação clínica da doença de Chagas, sendo que 13 apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos testes de diagnóstico molecular. Os principais sintomas clínicos foram lesões na pele, característico de paniculite, e miocardite. Além disso, houve um caso de reativação neurológica.

Verificamos que a presença do DNA do parasito nos corações transplantados foi geralmente detectada antes do aparecimento das manifestações clínicas sugestivas de reativação doença de Chagas. Além disso, foi visto uma certa relação temporal entre o diagnóstico molecular e as manifestações de reativação da doença. Assim, quanto mais cedo as amostras de biópsias mostraram resultados positivos para os PCRs, mais cedo a reativação clínica da doença ocorreu. A exceção foi observada apenas para um paciente que reativou 46 meses após o transplante e suas 6 primeiras biópsias endomiocárdicas apresentaram resultados negativos para os dois métodos de diagnóstico utilizados (Tabela 8).

**Tabela 8: Resultado das PCRs para diagnóstico de *T. cruzi* das 6 primeiras biópsias endomiocárdicas realizadas após transplante.**

Paciente	Data da reativação clínica	Resultados para PCR kDNA e rDNA / Dias após o transplante					
		7	14	21	28	45	60
F1	Diversos episódios de reativação	●	●	●	●	●	●
M7	3 meses	●	●	●	●	●	●
A1	3 meses	●	●	●	●	●	●
J1	3 meses	●	●	●	●	●	●
D3	4 meses	●	●	●	●	●	●
S3	4 meses	●	●	●	●	●	●
M4	6 meses	●	●	●	●	●	●
J6	7 meses	●	●	●	●	●	●
J8	10 meses	●	●	●	●	●	●
J12	16 meses	●	●	●	●	●	●
M2	17 meses	●	●	●	●	●	●
A2	18 meses	●	●	●	●	●	●
S2	20 meses	●	●	●	●	●	●
T4	32 meses	●	●	●	●	●	●
J2	Faleceu devido infecção pulmonar e varicela	●	●	●	●	●	●
J5	Falecimento de causa indeterminada	●	●	●	●	●	●
I1	Não apresentou reativação clínica	●	●	●	●	●	●
V2	Não apresentou reativação clínica	●	●	●	●	●	●
M14	46 meses	●	●	●	●	●	●
L1	Não apresentou reativação clínica	●	●	●	●	●	●
J14	Não apresentou reativação clínica	●	●	●	●	●	●
J13	Não apresentou reativação clínica	●	●	●	●	●	●
M10	Não apresentou reativação clínica	●	●	●	●	●	●
S1	Não apresentou reativação clínica	●	●	●	●	●	●

**Legenda:** (●) Resultados negativos para ambos os métodos de diagnóstico utilizados; (●) Resultados positivos para PCR kDNA e PCR em tempo real do rDNA 24S $\alpha$ ; (●) Resultado positivo apenas para a PCR kDNA; (●) Resultado positivo apenas para PCR em tempo real do rDNA 24S $\alpha$ ;

<sup>a</sup> Sigla representativa do nome dos pacientes transplantados; <sup>b</sup> Data de reativação clínica; <sup>d</sup> Biópsias realizadas 7,14,21,28,45 e 60 dias pós-transplante.

Os resultados dos PCRs mostraram antecipação de 1-32 meses dos primeiros sinais clínicos da reativação chagásica, sugerindo que as técnicas de diagnóstico molecular aqui propostas podem antecipar o diagnóstico da reativação da doença de Chagas em pacientes transplantados cardíacos (Tabela 8).

Analisando os resultados, observamos também que em 2 casos ocorreu a detecção da presença de DNA de *T. cruzi* nas biópsias endomiocárdicas, mas os pacientes, até o momento, não apresentaram manifestações clínicas, sendo que pode haver manifestações

clínicas no futuro. Além disso, foi possível perceber que alguns pacientes apresentaram resultados positivos intermitentes. Isso provavelmente ocorre pois o fragmento coletado pode ser retirado de uma região cardíaca diferente da região da coleta anterior.

Comparando os métodos de diagnóstico utilizados, percebemos que existe uma diminuição na correlação entre os dois métodos quando analisamos apenas o estudo retrospectivo (Kappa= 0,379). Isso pode ser devido ao uso de amostras em blocos de parafina neste estudo. Pois, 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, já tem sido demonstrado que a fixação do tecido, dependendo do tempo e do fixador utilizado pode resultar no *crosslinking* do DNA, prejudicando a sua amplificação por PCR (Fernandes *et al.*, 2004). Assim, como os minicírculos do kDNA, estão presentes em múltiplas cópias, de 5.000 a 20.000, em cada célula do parasito (Simpson, 1987), e o rDNA 24 Sa faz parte do DNA nuclear, a técnica de PCR pode ser mais sensível para o método do kDNA PCR, quando comparada à amplificação do rDNA.

Estudos prospectivos vêm sendo realizados no laboratório desde 2008. Biópsias endomiocárdicas para pesquisa de *T. cruzi* foram feitas, periodicamente, durante o acompanhamento pós-cirúrgico de todos os pacientes, conforme as bases de protocolo de vigilância de rejeição (Tabela 2). Durante esse período, foram analisadas 353 biópsias endomiocárdicas (material a fresco, conservado em etanol absoluto) derivadas do monitoramento de 43 pacientes cardiopatas chagásicos. Até o momento, 20 pacientes do estudo prospectivo apresentaram resultados positivos tanto para o diagnóstico molecular quanto para a presença de manifestações clínicas sugestivas de reativação da doença de Chagas e 10 pacientes apresentaram resultados duplamente negativos para essas variáveis (Tabela 9). O que mostra uma boa correlação entre o diagnóstico molecular e o clínico.



**Tabela 9: Comparação entre os resultados de reativação clínica e de diagnóstico molecular, obtidas por PCR diretamente das biópsias endomiocárdicas a fresco de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.**

		Reativação da doença de Chagas	
		<i>Presente</i>	<i>Ausente</i>
Teste	<i>Positivo</i>	a 20	b 5
	<i>Negativo</i>	c 8	d 10

**Legenda:** 1) <sup>a</sup> verdadeiro positivo; <sup>b</sup> falso positivo; <sup>c</sup> falso negativo; <sup>d</sup> verdadeiro negativo.

2) Sensibilidade=  $a/(a+c) = 0.71$  3) Especificidade=  $d/(b+d) = 0.66$  4) N=43\*

\* 9 pacientes participaram de ambos os estudos (retrospectivo e prospectivo).

Esses achados, tomados em conjunto, sugerem que as técnicas de PCR utilizadas podem ser uma boa ferramenta para realização do diagnóstico da reativação parasitária, descartando a possibilidade de rejeição do enxerto. Além disso, foi possível notar que essa técnica pode antecipar o diagnóstico de reativação clínica em vários meses.

Atualmente, métodos baseados em PCR têm sido cada vez mais usados para o diagnóstico da doença de Chagas por serem considerados mais sensíveis do que a microscopia. Os alvos dos ensaios de PCR mais utilizados são o kDNA ou DNA satélite (Diaz *et al.*, 1992; Diez *et al.*, 2007; Brasil *et al.*, 2010; Schijman *et al.*, 2011), pois ambos estão presentes em múltiplas cópias no genoma do parasito, o que aumenta a sensibilidade de detecção (Gonzalez *et al.*, 1984; Sturm *et al.*, 1989).

Diversos trabalhos já demonstraram que a amplificação da região variável do minicírculo do kDNA é específica para *T. cruzi* (Avila *et al.*, 1990; Sturm *et al.*, 1989). Entretanto, já foi relatado controvérsias. Conforme já abordado, estudos utilizando biópsias endomiocárdicas de pacientes transplantados relataram que a técnica da PCR para a região do kDNA não possui boa especificidade. Benvenuti e colaboradores (2011) verificaram resultados positivos para presença de *T. cruzi* em 3 biópsias endomiocárdicas

do grupo controle, constituído por 18 biópsias endomiocárdicas derivadas de 6 pacientes que não haviam apresentado manifestação clínica de reativação um ano após o transplante. No entanto, nossos resultados sugerem que o diagnóstico por PCR pode adiantar em até 32 meses o diagnóstico clínico de reativação, logo esses pacientes poderiam apresentar as manifestações clínicas da reativação da doença futuramente.

Para superar essas limitações e obter uma resposta definitiva sobre a possibilidade do uso dessa metodologia de diagnóstico molecular para identificar a presença de *T. cruzi* em biópsias endomiocárdicas de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados, optamos por utilizar uma combinação de PCR kDNA e PCR em tempo real do rDNA 24S $\alpha$  e um número maior de amostras. Sendo que nós analisamos 497 biópsias endomiocárdicas e os demais grupos analisaram um máximo de 61 biópsias.

Nossos estudos indicaram que o protocolo aqui proposto possui boa sensibilidade diagnóstica sem perder especificidade, já que verificamos considerável intensidade de associação entre o diagnóstico molecular e o diagnóstico clínico característico da reativação chagásica. Estes estudos foram realizados com um grande espaço amostral, comparados aos já relatados, o que aumenta o poder estatístico do trabalho e sugere a validade deste teste diagnóstico.

Esse resultado é muito relevante, pois o diagnóstico diferencial da inflamação devido à rejeição do enxerto ou daquele resultante da reativação da doença de Chagas é muito difícil de ser estabelecido. Pois, os métodos parasitológicos convencionais são de baixa sensibilidade, devido a baixa parasitemia na fase crônica da doença (Meira *et al.*, 2002; Marcon, *et al.*, 2002) e os testes sorológicos podem apresentar resultados inconclusivos (Andersson *et al.*, 2004).

A partir das análises dos blocos de parafina referentes às seis primeiras biópsias de 24 pacientes, observamos que o protocolo utilizado neste estudo conseguiu realizar a antecipação do diagnóstico clínico. Visto que a reativação da infecção é um evento muito frequente entre os pacientes chagásicos transplantados, esses resultados indicam que essa técnica seria de muita importância para a rotina clínica. Os médicos poderiam introduzir a quimioterapia anti-*T. cruzi* assim que o diagnóstico molecular mostrasse presença de DNA do parasito nas biópsias, o que poderia melhorar o tratamento destes pacientes e gerar impactos na melhoria da sobrevivência.

Em relação as amostras que estão sendo analisadas a fresco desde 2008, dois grupos de pacientes devem ser destacados: os que apresentaram biópsias positivas para a presença do parasito e também já apresentaram sinais da reativação da doença de Chagas

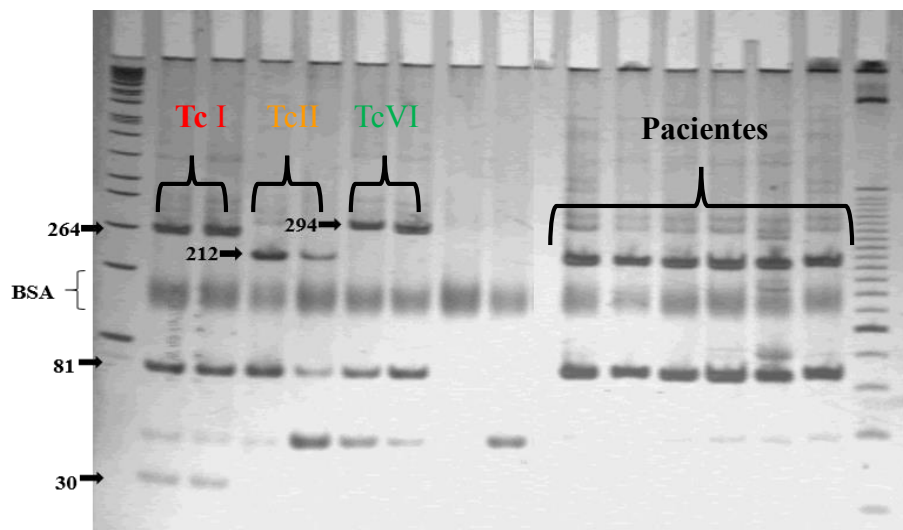
e aqueles em que apesar do diagnóstico molecular ser positivo ainda não apresentaram a reativação clínica. Os primeiros reforçam a ideia de que essa metodologia é adequada para a clínica. Já o segundo grupo, sugere que existam falsos positivos. Entretanto, por ser uma técnica que antecipa o diagnóstico clínico, esses pacientes podem ser, na verdade, pacientes que apresentarão manifestações clínicas da reativação chagásica no futuro. Assim, é necessário a continuação do monitoramento destes.

### **5.3. Caracterização das subpopulações de *T. cruzi***

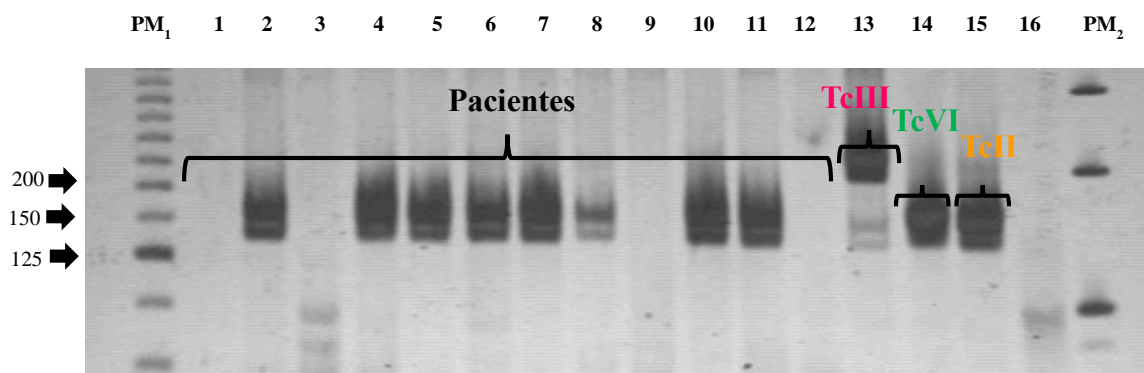
As 111 amostras biológicas positivas para presença de *T. cruzi* foram submetidas ao protocolo de tipagem das linhagens de *T. cruzi* usando o triplo ensaio. Constituído de marcadores para o gene COII, para o espaçador intergênico dos genes de miniéxon e para o gene rDNA 24S $\alpha$  (Figura 3).

Os perfis de RFLP obtidos dos fragmentos amplificados para o gene COII nos permitiram verificar que a maioria das amostras apresentaram fragmentos com 81 e 212 pb, que é característico do haplótipo mitocondrial C – correspondendo ao DTU TcII (Figura 7).

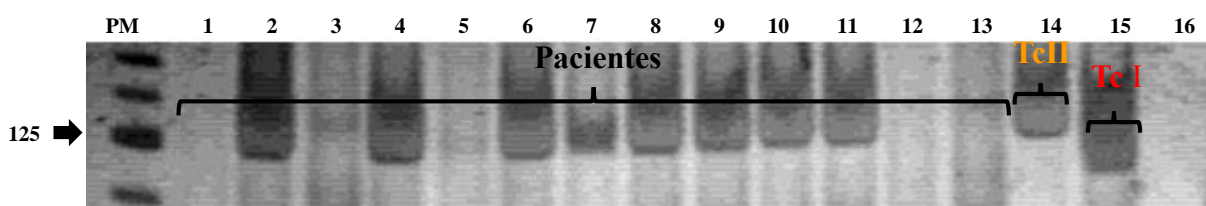
Mesmo após a reação de PCR-RFLP do gene COII ter permitido a identificação das 53 amostras como TcII, estas também foram submetidas às subseqüentes reações do esquema de tipagem. As amplificações resultaram em fragmentos de 150 e 125 pb para miniéxon (Figura 8) e rDNA 24 S $\alpha$  (Figura 9), respectivamente, confirmando os padrões esperados para a linhagem TcII. Além disso, surpreendentemente, em um dos casos analisados foi confirmada a presença de TcVI (Tabela 10).



**Figura 7:** Padrões típicos de RFLP gerados a partir de produtos amplificados do gene mitocondrial COII diretamente dos tecidos dos pacientes depois da digestão com *AluI*. **1-6)** Controles de amplificação usando DNA representativos dos 3 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 *AluI*; **8)** Branco da reação de PCR. **9- 14)** Amostras de biópsias endomiocárdicas dos pacientes de 1 a 6; **PM<sub>1</sub>)** Padrão de peso molecular (1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®); **PM<sub>2</sub>)** padrão de peso molecular – 25 pb DNA Ladder (Invitrogen®)



**Figura 8:** Amplificação do espaçador intergênico dos genes miniéxon de *T. cruzi* diretamente dos tecidos dos pacientes. **PM<sub>1</sub>)** 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 das linhagens de TcIII, TcVI e TcII, respectivamente. **13)** Cepa 231 (Tc III ~200pb); **14)** clone CL Brener (Tc VI ~150-157 pb); **15)** cepa JG (Tc II ~150-157 pb) **16)** Branco da reação de PCR **PM<sub>2</sub>)** Padrão de peso molecular (1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®);



**Figura 9:** Amplificação do gene rDNA24Sa de *T. cruzi* diretamente dos tecidos dos pacientes; **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 das linhagens de Tc II e Tc I, respectivamente; **14)** cepa JG (Tc II ~125 pb) **15)** clone Col.17G2 (Tc I ~110 pb) **16)** Branco da reação de PCR

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 puderam ter as DTUs de *T. cruzi* identificadas integralmente. Assim, em 23 amostras foi feita a identificação parcial de TcII ou TcVI. Nesses casos houve falha na amplificação das primeiras etapas da genotipagem e a tipagem do rDNA por PCR em tempo real foi bem sucedida, mas como TcII e TcVI apresentam o mesmo perfil para este gene o resultado não foi conclusivo. Na biópsia endomiocárdica de um paciente detectamos a presença de TcI, II, V ou VI, visto que nem o perfil do gene COII nem o da reação de rDNA foi determinado (Tabela 10).

**Tabela 10. Identificação de DTUs de *T. cruzi* em biópsias endomiocárdicas de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.**

DTUs	Número de amostras
Tc II	53
Tc VI	1
Tc II ou VI	23
TcI, II, V ou VI	1
Não determinado*	33
<b>Total</b>	<b>111</b>

\*Os DTUs não puderam ser completamente identificados por não terem amplificado os três marcadores utilizados.

Como já abordado, a heterogeneidade do *T. cruzi* vem sendo descrita desde a sua descoberta por Chagas em 1909, onde descreveu a diversidade morfológica do parasito. Além disso, variações nas formas clínicas e na resposta ao tratamento da doença de Chagas têm sido avaliadas, principalmente quando se tratam 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 está cada vez mais evidente a participação relevante de aspectos genéticos do parasito (Macedo & Pena, 1998).

Sabe-se que o *T. cruzi* é composto por uma população heterogênea de clones com ampla variabilidade biológica e genética circulando em ciclos domésticos e selvagens. Existe um modelo de evolução clonal que prevê uma correlação entre a divergência filogenética de *T. cruzi* e suas propriedades biológicas, incluindo a sensibilidade a drogas, dessa forma, determinada estirpe pode ser considerada susceptível ou resistente a determinado medicamento (Toledo *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2010).

Estudos indicam que as infecções humanas ocorrendo nos países do Cone Sul da América Latina são quase que exclusivamente devido a cepa de *T. cruzi* II e são responsáveis, principalmente, pela causa mais grave da doença, apresentando a forma cardíaca, megaesôfago e megacólon (Zingales, *et al.*, 2011). Neste trabalho, também podemos notar que a grande maioria dos pacientes reativados apresentaram essa cepa de *T. cruzi*, corroborando com a ideia de que esta é a principal linhagem associada com a forma cardíaca da doença de Chagas e à reativação, pelo menos nesta região geográfica.

A presença de um isolado pertencente à linhagem *T. cruzi* VI em nosso estudo confirma a associação dessa linhagem como uma das causadoras da doença de Chagas em humanos. Há algum tempo as linhagens 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), levando alguns autores sugerirem que essa cepa também seja uma das principais linhagens associadas às formas graves da doença de Chagas no sul da América do Sul (Miles *et al.*, 2009).

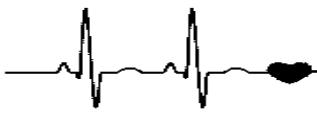
A caracterização molecular das cepas de *T. cruzi* podem se constituir de importantes elementos para constituir uma correlação entre as manifestações clínicas em diferentes áreas geográficas. Além disso, deve ser ressaltado que a identificação da DTU de *T. cruzi* pode ser um fator a ser considerados na hora escolha do fármaco e na decisão dos médicos sobre o tratamento individual, visto que recentes pesquisas mostram a

influência genética do parasito nos resultados da quimioterapia (Toledo *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2010).

Resumindo nossos achados, podemos perceber que é necessário continuar a busca por marcadores e técnicas alternativas mais sensíveis para a caracterização molecular em amostras com presença de baixa quantidade de DNA, visto que poderia contribuir ainda mais para a compreensão da epidemiologia molecular das linhagens de *T. cruzi* associados aos casos clínicos e a reativação da doença de Chagas.

Além disso, nossos estudos mostraram que as técnicas de PCR utilizadas podem ser empregues como ferramentas para o diagnóstico diferencial entre a reativação chagásica e a rejeição do enxerto, além de poder ajudar a prever o diagnóstico clínico de reativação em vários meses. Logo, pode ser útil para auxiliar na monitoração da eficácia do tratamento, além de permitir a rápida introdução do medicamento específico anti-*T. cruzi*, e assim melhorar a sobrevida e o bem estar dos pacientes. Aspectos importantes do protocolo de diagnóstico molecular proposto aqui, são a considerável sensibilidade e especificidade do método e a rapidez da técnica, visto que o tempo necessário para se atingir um diagnóstico por PCR é menor do que o necessário para diversos métodos de diagnóstico convencionais.

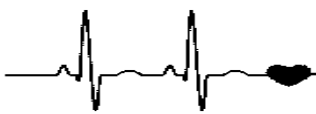
Futuros estudos comparando o desfecho dos pacientes tratados com base nos resultados obtidos precocemente através das PCRs, com aqueles pacientes tratados somente quando as manifestações clínicas de reativação são detectadas, poderão confirmar o valor clínico dessa estratégia de gerenciamento dos pacientes transplantados que sofrem de doença Chagas.



## 6. Conclusão



- ✓ A metodologia de PCR proposta neste trabalho se mostrou adequada para o diagnóstico da presença do *T. cruzi* em biópsias endomiocárdicas, oriundas de pacientes cardiopatas chagásicos submetidos a transplantes cardíacos. Mostrando uma boa correlação entre o diagnóstico molecular e o diagnóstico clínico,
- ✓ O protocolo de diagnóstico molecular proposto foi 4x mais eficaz na detecção de *T. cruzi* quando comparado aos métodos de análises histoquímicas das biópsias endomiocárdicas,
- ✓ Através de estudos retrospectivos, foi possível observar que o método molecular utilizado propicia a detecção precoce de reativação da infecção chagásica,
- ✓ Através da genotipagem das amostras positivas, foi notado a ocorrência preferencial da subpopulação de *T. cruzi* II nos pacientes com reativação. Reiterando a ideia de que esta é a principal linhagem associada com a forma cardíaca da doença de Chagas e à reativação, pelo menos nesta região geográfica.
- ✓ Foi verificado a presença de um isolado pertencente à linhagem *T. cruzi* VI em pelo menos uma amostra, confirmando a associação dessa linhagem com a cardiopatia chagásica grave, pelo menos no Cone Sul.



## **7. Referências bibliográficas**

---

- ABTO - Dados numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: Janeiro / Setembro – 2014- **Associação Brasileira de Transplante de Órgãos**, ano XX, n. 3, p 1-20, 2014
- Almeida, B. R.; Santiliano, F. C. Assessment of the diagnostic methods for Chagas' disease. **Enciclopédia biosfera**, v.8, n.14; p. 1586- 1603, 2012.
- Andersson, J. *et al.* Molecular diagnosis of experimental Chagas disease, *Parasitology*, **Trends in Parasitology**, v.20, n.2, 2004.
- 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. Morphological and behavior characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.18, p.39-46, 1985.
- Andrade, L. O.; Galvao, L. M.; Meirelles, N.; Chiari, E.; Pena, S. D. *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.; Vilas-Boas, F.; Oliveira, G. M. M.; Bacal, F.; Bocchi, E. A; Almeida, D. R.; Fragata Filho, A. A.; Moreira M. C.V.; Xavier S. S.; Oliveira Junior, W. A.; Dias, J. C. P. I Diretriz Latino Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 97, p.1-48, 2011.
- Andrade, D. V.; Gollob, K. J.; Dutra, W.O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.7, e3010, 2014.
- Anez, N.; Crisante, G.; da Silva, F. M.; Rojas, A.; Carrasco, H. *et al.* Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. **Tropical Medicine & International Health**, v. 9, n.12, p. 1319-1326, 2004.
- Avila, H.; Golcalves, A. M.; Nehme, N. S; Morel, C. M.; Simpson, L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR amplified minicircle variable region sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 42, n.2, p.175-187, 1990.
- Avila, H; Borges-Pereira, J.; Thiemann, O.; de Paiva, E.; Degrave, W.; Morel, C. M.; Simpson, L. 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.
- Aziz, T.; Burgess, M.; Khafagy, R.; Wynn Hann, A.; Campbell, C.; Rahman, A.; *et al.* Bicaaval and standard techniques in orthotopic heart transplantation: medium-term experience in cardiac performance and survival. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.118, n.1, p. 115-22, 1999.
- Bacal, F.; Souza-Neto, J. D.; Fiorelli, A. I.; Mejia, J.; Marcondes-Braga, F.G.; Mangini, S.; II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, p. E16-73, 2009.
- Bacal, F.; Silva, C. P.; Pires, P. V.; Mangini, S.; Fiorelli, A. I.; Stolf, N. G.; Bocchi, E.A. 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.
- Benvenuti, L. A.; Roggério, A.; Sambiasse, 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. (2011). Usefulness of qualitative polymerase chain reaction for *Trypanosoma cruzi* DNA in endomyocardial biopsy specimens of chagasic heart transplant patients. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 30, n.7, p. 799-804, 2011.
- 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.
- Bocchi, E. A.; Bellotti, G.; Mocelin, A. O.; Uip, D.; Bacal, F. *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 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, 2001a.

- 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, 2001b.
- Brasil, P. E.; Castro L.; Hasslocher-Moreno, A. M.; Sangenis, L. H.; Braga, J. U. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v.10: 337, 2010.
- 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. *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.
- Brisse, S.; Barnabe, C.; Tibayrenc, M; Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n.1, p. 35-44, 2000.
- 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.; Silveira, C.; Cardoso, M. A.; Marques, P.; Luquetti, A.; Macedo, V.; Fernandes, O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 823-826, 2001.
- Britto, C.C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 122-135, 2009
- Burgos, J. M.; Altcheh, J.; Bisio, M.; Duffy, T.; Valadares, H. 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, J. M.; Begher, S.; Silva, H. M.; Bisio, M.; Duffy, T. *et al.* Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 2, p.294-297, 2008.
- Cardinal, M. V.; Lauricella, M. A.; Ceballos, L. A.; Lanati, L.; Marcet, P. L. *et al.* Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. **International Journal for Parasitology**, 2008.
- Carneiro, M.; Chiari, E.; Goncalves, A. M.; da Silva, A. A. P., Morel, C. M. *et al.* Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. **Acta Tropica**, v. 47, n.1, p. 35-45, 1990.
- Carriazo, C.S.; Sembaj, A.; Aguerri, A. M.; Requena, J. M.; Alonso, C.; Búa, J.; Ruiz, A.; Segura, E.; Barral, J.M. 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.
- 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 tripanozomiase 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.
- Chapman, M. D.; Baggaley, R. C.; Godfrey-Fausset, P. F.; Malpas, T. J.; White, G. *et al.* *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. **Journal of Protozoology**, v. 31, n.3, p. 482-486, 1984.
- 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
- Couto, W. J.; Branco, J. N. R.; Almeida, D.; Carvalho, A. C.; Vick, R.; Teles, C. A.; Aguiar, L. F.; Buffolo, E. Transplante cardíaco e infecção. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.16, n.2, p.141-151, 2001.
- DaRocha, W. D.; Bartholomeu, D. C.; Macedo, C. D.S.; Fátima H. M.; Edécio, C.N.; John, E. D.; Santuza, M. R. T. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Parasitology Research**, v. 88, p. 292-300, 2002.

- D'Avila, D. A.; Macedo, A. M.; Valadares, H. M.; Gontijo E. D.; Castro A. 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.
- de Freitas, J. M.; Pinto, A. L.; Pimenta, J. R.; Rodrigues, B. L.; Golcalves, V. F. *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v.2, n. 3, p. e24, 2006.
- Dias, J. C.P.; Machado, E. M. M.; Fernandes, A. L.; Vinhaes, M. C. General situation and perspectives of Chagas disease in Northeastern Region, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v.16, n. 2, p.13-34, 2000
- Diaz, C.; Nussenzweig, V.; Gonzalez, A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.46, n.5, p.616-623, 1992.
- Diez, M.; Favalaro, L.; Bertolotti, A.; Burgos, J. M.; Vigliano, C. *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.
- Diosque, P.; Barnabe, C.; Padilla, A. M.; Marco, J. D.; R. M. Cardozo, *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.
- Duarte, M. I. S.; Pagliari, C. Moléstias Infecciosas. In: Alves, V. A. F.; Bacchi, C. E.; Vassallo, J. Manual de imuno-histoquímica. **Sociedade Brasileira de Patologia**, p.196-207, 1999.
- Falla, A., C. Herrera, A. Fajardo, M. Montilla, G. A. Vallejo, *et al.* Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. **Acta Tropica**, v. 110, n.1, p. 15-21, 2009.
- Fernandes, J. V.; Meissner, R. V.; Fernandes, T. A. A. M.; da Rocha, L. R. M.; Cabral, M. C.; Villa, L. L. Comparison of three DNA extraction protocols from formaldehyde and paraffin- embedded tissues. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n.3, p. 141-6, 2004.
- Ferreira, A. W.; Ávila, S. L. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Editora Guanabara Koogan, 2ª edição, 2001.

- 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 Hygiene**, v. 81, n.5, p. 755-759, 1987.
- Fiorelli, A. I.; Stolf, N. A.; Honorato, R.; Bocchi, E.; Bacal, F. *et al.* Later evolution after cardiac transplantation in Chagas' disease. **Transplantation Proceedings**, v. 37, n.6, p. 2793-2798, 2005.
- Fleiss, J. L. Statistical methods for rates and proportions, 1981.
- Forni, A.; Faggian, G.; Chiominto, B.; Perini, G.; Bertolini, P.; Zanini, M.; *et al.* Avoidance of atrioventricular valve incompetence following orthotopic heart transplantation using direct bicaval anastomosis. **Transplantation Proceedings**, v.27, n.6, p. 3478-82, 1995.
- 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.; Bastos-Rodrigues, L., Goncalves, V.F., Teixeira, S.M.; Chiari, E.; Junqueira, A.C.; Fernandes, O.; Macedo, A.M.; Machado CR, Pena SD. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Pathogens**, v. 2, n.3, p. e24, 2006.
- Gadelha, A. A. M.; Verçosa, A. F. A.; Lorena, V. M.B.; Nakazawa, M.; Carvalho, A. B.; Souza, W. V.; Ferreira, A. G. P.; Silva, E. D.; Krieger, M. A.; Goldenberg, S.; Gomes, Y. M. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and hemagglutination test. **Vox Sanguinis**, v. 85, p. 165-170, 2003.
- Garcia, S. B.; Aranha A.L.; Garcia, F. R. B.; Basile, F. V.; A. P. M. Pinto, de Oliveira, E. C.; Zucoloto, S. A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon.what is the relationship between megacolon and colonic cancer? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n.2, p.91-93, 2003.
- Gomes, Y. M. Diagnóstico Etiológico. In: Malta J. Doença de Chagas. **Editores Savier**, p. 119-132, 1996.
- 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.



- Gonzalez, A.; Prediger, E.; Huecas, M. E.; Nogueira, N.; Lizardi, P. M. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v.81, n.11, p.3356-3360, 1984.
- Herwaldt, B. L.; Grijalva, M. J.; Newsome, A. L.; McGhee, C. R.; Powell, M. R. *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.
- Herrera, C.; Bargues, M. D.; Fajardo, A.; Montilla, M.; Triana, O. *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.
- Hoare, C.A. Morphological and taxonomic studies mammalian trypanosomes X. Revision of the systematics. **Journal of Protozoology**, v.11, p.200,1964.
- 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.
- Jannin, J.; Villa, L.; An overview of Chagas disease treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 95-97, 2007
- 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.
- Lana, M.; da Silveira, P.A.; Barnabe, C.; Quesney, V.; Noel, S.; Tibayrenc, M. *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/>
- Lewis, M.D.; Ma, J.; Yeo, M.; Carrasco, H.J.; Llewellyn, M. S.; Miles, M.A. 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.

- Luquetti, A. O.; Miles, M. A.; Rassi, A.; de Rezende, J. M.; de Souza A. A.; Povia, M. M. & Rodrigues, I. *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.
- Luz, Z. M. P.; Coutinho, M.G.; Cançado, J.R.; Krettli, A. U. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p.143-148, 1994.
- 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. & 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.; Jelicks, L. A.; Kirchhoff, L. V.; Shirani, J.; Nagajyothi, F.; Mukherjee S.; Nelson, R.; Coyle; C. M.; Spray; D. C.; de Carvalho, A. C. C.; Guan, F.; Prado; Cibele, M.; Lisanti, M.P.; Weiss, L. M.; Montgomery, S. P.; Tanowitz, H. B. **Cardiology in Review**, v.20, n.2, p.53-65, 2012.
- Madalosso, G.; Pellini, A. C. G.; Vasconcelos, M. J.; Ribeiro, A.F.; Weissmann, L.; Filho, G. S. O.; *et al.* Chagasic meningoencephalitis: case report of a recently included AIDS-defining illness in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 4, p.199-202, 2004.
- Marcon, G. E. B.; Andrade, P. D.; de Albuquerque, D. M.; Wanderley, J. S.; de Almeida, E. A.; Guarient, M. E.; Costa, S.C.B. 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.
- Meira, W. S. F.; Galvão, L. M. C.; Gontijo, E. D.; Machado-Coelho, G. L. L.; Norris, K. A.; Chiari, E. *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of

- Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 100095, 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.
- Mendonça, M. B.; Nehme, N. S.; Santos, S. S.; Cupolillo, E.; Vargas, N. *et al.* Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. **Parasitology**, v.124, n. 2, p. 177-184, 2002.
- Miles, M. A.; Toyé, 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.; Póvoa, M.; Shaw, J. J.; Lainson, R. *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.; Póvoa, M. M.; de Souza, A. A; Lainson, R.; Shaw, J. J. *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.
- Miles, A. M.; Llewellyn, M. S.; Lewis, M. D.; Yeo, M.; Baleela, R.; Fitzpatrick, S.; Gaunt, M. W.; Mauricio, I. L. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania, Looking back and to the future, **Parasitology**, v.136, p.1509–1528, 2009.
- Minter-Goedbloed, E.; Minter, D.M.; Marshall, T.F.C. Quantitative comparison between xenodiagnosis and hemoculture in detection of *Trypanosoma cruzi* (*Shizotrypanum cruzi*) in experimental and natural chronicinfections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, p. 217-225, 1978.
- Montera, M.W.; Mesquita, E. T.; Colafranceschi, A. S.; Oliveira Junior, A. M.; Rabischoffsky, A.; Ianni, B. M.; Rochitte, C. E; Mady, C.; Mesquita, C. T.; Azevedo, C. F.; Bocchi, E. A.; Saad, E. B.; Braga, F. G. M; Fernandes, F.; Ramires, F. J. A.; Bacal, F.; Feitosa, G. S.; Figueira, H. R.; Souza Neto, J. D.; Moura, L. A. Z.; Campos, L. A. A.; Bittencourt, M. I.; Barbosa, M.M.; Moreira, M. C. V.; Higuchi, M. L., Schwartzmann, P., Rocha, R.M.; Pereira S.B.; Mangini, S.; Martins S. M., Bordignon S., Salles V.A. I Diretriz Brasileira de Miocardites e Pericardites. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.100, n.4, s. 1, p.1-36, 2013.

- 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>
- Morel, C.; Chiari, E.; Camargo, E. P.; Mattei, D. M.; Romanha, A. J. *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, M.; D'ávila, D. A.; Silva, M. N.; Galvão, L. M. C.; Macedo, A. M.; Chiari, E.; Gontijo, E. D.; Zingales, B. *Trypanosoma cruzi* benzimidazole 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.
- Murthy, V. K.; Dibbern, K. M.; Campbell, D. A. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. **Molecular and Cellular Probes**. v. 6, n.3, p.237-243, 1992.
- Pena, S. D., G. Barreto, A. R. Vago, L. De Marco, F. C. Reinach, *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.
- Pittella, J. E. H. Central nervous system involvement in Chagas disease: a hundred-year-old history. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 103, 973- 978, 2009.
- Pittella, J. E. H. Central nervous system involvement in Chagas disease, an updating. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 2, p. 111-116, 1993.
- 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.
- Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v.1, n.2, p. 92-100, 2001.
- Punukollu, G.; Gowda, R. M.; Khan, I. A.; Navarro, V. S.; Vasavada, B. C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **The International Journal of Cardiology**, v. 115, n.3, p. 279-283, 2007.

- Raether, W.; Hanel, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology Research**, v. 90, p. s19-39, 2003.
- Rassi A. *et al.* Clinical features. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. **Editora Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, p. 81-101, 1992.
- Rassi Jr, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas' disease. **Lancet**, v. 375, p.1388-402, 2010.
- Rassi, A. J.; Rassi, A.; Rezende, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.
- Revollo, S.; Oury, B.; Laurent, J. P.; Barnabe, C.; Quesney, V. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. **Experimental Parasitology**, v. 89, n.1, p. 30-39, 1998.
- Rey, L. **Parasitologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 856p, 2001.
- Rozas, M.; Doncker, S.; Adai, V.; Coronado, X.; Barnabé, C.; Tibayrenc, M.; Solari, A.; Dujardin, J. C. 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.
- Santo, A. H. Tendência da mortalidade relacionada à doença de Chagas, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2006: estudo usando causas múltiplas de morte. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 26, n.4, p.299-309, 2009.
- 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.
- Schijman, A.G.; Vigliano, C.; Burgos, J.; Favaloro R.; Perrone, S.; Laguens, R.; Levin, M. J. 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, p.1114-1117, 2000.
- Schijman, A. G.; Bisio, M.; Orellana, L.; Sued, M.; Duffy, T. *et al.* International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.5, n. 1, p. e931, 2011.
- Simpson, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual Review of Microbiology** v.41, p.363-382, 1987.

- 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
- Sturm, N. R.; Degraeve, 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.
- Taylor, D.; Edwards, L.; Aurora, P.; Christie, J.; Dobbels, F.; Kirk, R.; *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, D. E.; Crepaldi, P. H.; Benchimol, M.; Souza, W. Atlas Didático - O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, 2011. Disponível em: [http://labspace.open.ac.uk/PUB\\_527\\_1.0](http://labspace.open.ac.uk/PUB_527_1.0)
- 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.
- Toledo, M. J.; Bahia, M. T.; Carneiro, C. M.; Martins-Filho, O. A.; Tibayrenc, M.; Barnabé, C.; Tafuri, W. L.; de Lana, M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 223-230, 2003.
- Valadares, H. M.; Pimenta, J. R.; De Freitas, J. M.; Duffy, T.; Bartholomeu, D. C.; De Paula, O. R.; Chiari, E.; Moreira, M. D. A. C.; Filho, G. B.; Schijman, A. G.; Franco, G. R.; Machado, C. R.; Pena, S. D.; Macedo, A. M. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n.7, p. 839-50, 2008.
- Vilas-Boas, F.; Feitosa, G. S.; Soares, M. B.; Mota, A.; Pinho-Filho, J. A. *et al.* Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart

- failure due to Chagas disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n.2, p. 159-166, 2006.
- Virreira, M.; Torrico, F.; Truyens, C.; Vega, A. C.; Solano, M. *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.
- Weber, J. L.; David, D.; Heil, J.; Fan, Y.; Zhao, C. *et al.* Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. **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** 51(6): 771-777. 1994.
- World Health Organization, Expert Committee, Control of Chagas disease. **World Health Organization technical report series**, p.1-109, 2002.
- World Health Organization. Making health research work for poor people, The World Health Report. **Tropical Disease Research**, p. 30-33, 2005.
- 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. **Pan American Health Organization**. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&id=3591&layout=blog&Itemid=1051&lang=pt](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&id=3591&layout=blog&Itemid=1051&lang=pt), 2014.
- Yeo, M.; Acosta, N.; Llewellyn, M.; Sanchez, H.; Adamson, S. *et al.* Origins of Chagas disease, Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International Journal for Parasitology**, v.35, n.2, p.225-233, 2005.

- 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.; Andrade, S. G.; Briones, M. R.; Campbell, D. A.; Chiari, E. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.7, p.1051-1054, 2009.
- Zingales, B.; Miles, M. A.; Campbell, D. A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A. M. *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.