SHEILA CRISTINA VICENTE DA SILVA

**Caracterização molecular de *Trypanosoma cruzi*
em pacientes com doença de Chagas
sem e com imunodepressão
(infecção por HIV e transplante de órgãos)**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título de
Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Shikanai
Yasuda

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Sheila Cristina Vicente da

Caracterização molecular de *Trypanosoma cruzi* em pacientes com doença de Chagas sem e com imunodepressão (infecção por HIV e transplante de órgãos) / Sheila Cristina Vicente da Silva. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Maria Aparecida Shikanai Yasuda.

Descritores: 1.Doença de Chagas 2.Tipagem molecular 3.*Trypanosoma cruzi*
4.HIV 5.Coinfecção 6.Técnicas de genotipagem 7.Transplante de órgãos

USP/FM/DBD-206/15

Dedicatória

Aos meus pais Antonio e Janete e meus avós Manuel e Solidade,
Obrigada por serem meus exemplos de vida, minha base e me apoiarem
incondicionalmente.

Ao meu marido Carlos,
Pelo amor e companheirismo, por estar ao meu lado e ser meu porto seguro.

Agradecimentos Especiais

À Professora Maria Aparecida Shikanai Yasuda,
pelos ensinamentos, dedicação, paciência e disponibilidade.
Minha sincera admiração e gratidão pela confiança.

À Dra. Vera Lúcia Teixeira de Freitas,
pela a amizade, dedicação e valiosa orientação técnica
para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimientos

Aos pacientes, por toda colaboração.

A toda minha família, especialmente meus pais, Antonio e Janete, minhas irmãs Andréa e Ana Luiza, minha prima Heidi e meus avós Manuel e Solidade, por serem as luzes do meu caminho.

Ao meu marido Carlos e todos da minha nova família, especialmente minha sogra Celeste, minhas cunhadas e cunhados Luciana, Marcia, Vitor e Antonio. Obrigada por estarem ao meu lado proporcionando-me alegria e infinito apoio.

À Ana Marli Sartori, Karim Yaqub Ibraim, Noemia Carvalho Barbosa, Christina Terra G. Novaes e demais médicos do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias FMUSP/ Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias HC-FMUSP pelo encaminhamento dos pacientes e auxílio nos prontuários médicos.

Ao Dr. Edimar Bocchi, Dr. Fernando Bacal, Dra. Tania Varejão Strabelli e as enfermeiras Fátima Cruz e Fernanda Barone da Unidade de Insuficiência Cardíaca do Instituto do Coração HC-FMUSP pela colaboração e encaminhamento dos pacientes.

À Dra. Lígia Pierrotti e Dr. Luiz Sérgio Azevedo da Unidade de Transplante Renal, Dr. Edson Abdala do Serviço de Transplante de Fígado e Dr. Frederico Dulley do Serviço de Transplante de Medula Óssea, pelo encaminhamento dos pacientes.

À Dra. Veruska Maia da Costa, da Vigilância das Doenças de Transmissão Vetorial (UVTV) e Dra. Valéria Rita Correa, do Hospital de doenças Tropicais de Araguaiana (TO), pelo encaminhamento dos pacientes com doença de Chagas aguda.

Ao Laboratório de Parasitologia (LIM 46) pela concessão dos exames de hemocultura e xenocultura dos pacientes, especialmente à Rita Cristina Bezerra, Érika Gakiyas, Márcia Hage e Felipe Delatorre pela disponibilidade.

Ao Setor de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz - SP pela realização dos exames de xenodiagnóstico, principalmente à Carmem do Socorro Guilherme, Elizabeth Visone Nunes Westphalen e Oswaldo Cruz de Oliveira Junior.

À Dra. Maria Helena Matte, da Faculdade de Saúde Pública, pela disponibilidade e contribuição nas análises de agrupamento.

Ao Ivaldo Olimpio da Silva, do departamento medicina preventiva FMUSP, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para execução deste trabalho (FAPESP nº 2004/07368-4 e nº 2012/50273-0).

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias pelo apoio, especialmente secretária Roseli Antônia Santo, sempre prestativa nas informações e orientações dadas.

Às bolsistas de iniciação científica e capacitação técnica FAPESP TT3, Carol Medeji, Maria Izani de Andrade e Claudia Oliveira, por toda a colaboração neste projeto.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia (LIM 48): Célia Regina Furuchó, Claudia de Abreu Fonseca, Constância D. L. Lorente, Érika Y. Shimoda, Marcello Magri, Márcia Andréia Ferreira, Marjorie Vieira Batista, Paula Keiko Sato, Claudia Oliveira, Caroline Medeji, Daiane Tomomi, Daniel Valério, Felipe Delatorre, Flávia Holanda Carvalho e Vivian Coelho, pelo companheirismo e apoio durante todos esses anos.

Aos amigos do Laboratório de Micologia Médica (LIM53), principalmente Antonia, Roseli, Mônica, Gilda, Mauro, Dulce e Danilo pela agradável convivência.

Ao amigo Marcelo Silva Santos que me apresentou ao mundo da pesquisa científica, quando era apenas graduanda. Obrigada pelo incentivo.

A todos que de alguma forma auxiliaram-me na realização deste trabalho e torceram por mim. Muito obrigada!

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3. ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Urbanização e Globalização da Doença de Chagas	2
1.2	Manifestações Clínicas e Imunossupressão	3
1.3	Estrutura Genômica do Parasito	5
1.4	Estudo da Variabilidade Genética das Populações de <i>T. cruzi</i>	5
2	JUSTIFICATIVA.....	12
3	OBJETIVOS	15
3.1	Geral.....	16
3.2	Específicos	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	Casuística	18
4.1.1	CrITÉRIOS de Inclusão	19
4.1.2	Tratamento Específico Antiparasitário	23
4.1.3	Classificação das Formas Clínicas da doença de Chagas	23
4.1.4	Consulta de Prontuário Médico.....	24
4.2	Coleta de Material Biológico	25
4.3	Exame Parasitológico Direto.....	26
4.4	Exame Parasitológico Indireto	26
4.5	Isolamento de Parasitos e Obtenção de Massa.....	27
4.6	Provas Moleculares	28
4.6.1	Extração de DNA de Pacientes e Controles	28
4.6.2	Extração de DNA de Isolados de <i>T. cruzi</i>	29
4.6.3	PCR S35/36.....	30
4.6.4	Caracterização Molecular Direta de <i>T. cruzi</i> em amostras de DNA de Paciente.....	30
4.6.5	Caracterização Molecular de Isolados de <i>T. cruzi</i>	32
4.6.6	Análise dos Produtos Amplificados	35
4.6.7	Análise Estatística	36
5	RESULTADOS.....	37
5.1	Distribuição das Amostras, Sujeitos de Pesquisa e Fluxo de Análise	38
5.2	Dados Demográficos dos Sujeitos de Pesquisa.....	40
5.3	Forma Clínica da Doença de Chagas	42

5.4	Naturalidade dos Pacientes	43
5.5	Caracterização Molecular de <i>T. cruzi</i> por LSSP-PCR	44
5.5.1	LSSP-PCR.....	44
5.6	Caracterização Molecular de Isolados de <i>T. cruzi</i>	65
5.6.1	Amplificação do gene ND7 de <i>T. cruzi</i>	65
5.6.2	Tipagem Molecular Tradicional de isolados de <i>T. cruzi</i>	73
5.6.3	Classificação de <i>T. cruzi</i> em <i>Discrete Typing Unit</i> (DTU).....	82
6	DISCUSSÃO	84
7	CONCLUSÕES	92
8	REFERÊNCIAS.....	95
9	ANEXOS	111

Listas

ABREVIATURAS

AG	Grupo Agudo
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
CA	Forma Cardíaca da doença de Chagas
CA/DIG	Forma Cardíaca e Digestiva da doença de Chagas
CAT	Forma Cardíaca Atípica da doença de Chagas
CAT/DIG	Forma Cardíaca Atípica e Digestiva da doença de Chagas
CO	Grupo Coinfectados HIV/ <i>T. cruzi</i>
CO/RE	Grupo Coinfectados HIV/ <i>T. cruzi</i> e Reativação da doença de Chagas
CR	Grupo Crônico
CRI	Grupo Crônico com Imunodepressão
CS	Grupo Controle Sadio
DIG	Forma Digestiva da doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTU	<i>Discrete Typing Unit</i>
ECG	Eletrcardiograma
<i>EcoRV</i>	Enzima de restrição
EDTA	Ácido etilenodietildinitritoteracético
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i>
GPI	Glucose-6-fosfato isomerase
gRNAs	Ácido ribonucleicos guias
HCl	Ácido clorídrico
<i>HhaI</i>	Enzima de restrição
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSP60	<i>Heat Shock Protein 60</i>
IFI	Imunofluorescência Indireta
IND	Forma Indeterminada da doença de Chagas
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i> (DNA do cinetoplasto)
LANE	Faixa
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LSSP-PCR	<i>Low Stringency Single Specific Primer PCR</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitros
ND7	Subunidade 7 do gene NADH desidrogenase
pb	Pares de base
PBS	Solução Salina Tamponada

PCR	Reação em cadeia da polimerase
QBC	<i>Quantitative Buffy Coat</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rRNA	RNA ribossômico
SL	<i>Spliced Leader</i> Espaçador intergênico de genes mini-exon
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris EDTA
Tris	<i>Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane</i>
Tc	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TX	Grupo Transplantado
TX/RE	Grupo Transplantado com Reativação da doença de Chagas
TXC	Grupo Transplantado Cardíaco
TXC/RE	Grupo Transplantado Cardíaco com Reativação da doença de Chagas
TXH	Grupo Transplantado Hepático
TXMO	Grupo Transplantado de Medula Óssea
TXR	Grupo Transplantado Renal
TXR/RE	Grupo Transplantado Renal com Reativação da doença de Chagas
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
Z	Zimodemas
µg	Microgramas
µL	Microlitros
24Sα rDNA	Gene ribossômico 24Sα ou LSU rDNA
18S rDNA	Gene ribossômico 18S

FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama dos sujeitos, grupos e amostras de pesquisa.....	22
Figura 2-	Abordagem para classificação de Isolados de <i>T.cruzi</i> em DTU TcI–VI.....	35
Figura 3-	Distribuição das amostras, fluxo de processos, técnicas e análises empregadas.....	39
Figura 4-	LSSP-PCR em amostras de pacientes do grupo transplantado (TX), transplantado com reativação (TX/RE) e agudo (AG), em gel de agarose 1,6% corado com brometo de etídio.	45
Figura 5-	LSSP-PCR em amostras de pacientes do grupo coinfetado HIV/ <i>T.cruzi</i> (CO) e do grupo crônico (CR), em gel de agarose 1,6% corado com brometo de etídio.	46
Figura 6-	LSSP-PCR em amostras de pacientes do grupo crônico (CR), do grupo crônico com imunodepressão (CRI) e do grupo (TX), em gel de agarose 1,6% corado com brometo de etídio.	47
Figura 7-	LSSP-PCR em amostras de pacientes do grupo coinfetados com HIV/ <i>T. cruzi</i> e reativação (CO/RE), em gel de agarose 1,6% corado com brometo de etídio.....	48
Figura 8-	Dendrograma gerado por LSSP-PCR de 170 amostras pareadas (sangue e isolados) de 85 pacientes com doença de Chagas, utilizando método UPGMA e coeficiente de Pearson.....	50
Figura 9-	Dendrograma gerado por LSSP-PCR de 8 amostras (sangue e isolados) de um paciente coinfetado HIV/ <i>T. cruzi</i> (CO), utilizando método UPGMA e coeficiente de Pearson.....	53
Figura 10-	Dendrograma gerado por LSSP-PCR de 6 amostras (sangue, LCR e isolados) de paciente com doença de Chagas coinfetado HIV/ <i>T. cruzi</i> e reativação (CO/RE), utilizando método UPGMA e coeficiente Pearson.....	55
Figura 11-	Dendrograma gerado por LSSP-PCR de 4 amostras (sangue, LCR e isolados) de paciente com doença de Chagas coinfetado HIV/ <i>T. cruzi</i> e reativação (CO/RE), utilizando método UPGMA e coeficiente Pearson.....	57
Figura 12-	Dendrograma gerado por LSSP-PCR de 9 amostras (sangue, LCR e isolados) de paciente com doença de Chagas coinfetado HIV/ <i>T. cruzi</i> e reativação (CO/RE), utilizando método UPGMA e coeficiente Pearson.....	59

Figura 13-	Dendrograma gerado por LSSP-PCR de 7 amostras (sangue e isolados) de paciente com doença de Chagas do grupo transplantado renal (TXR), utilizando método UPGMA e coeficiente Pearson.....	61
Figura 14-	Dendrograma gerado por LSSP-PCR a partir de 23 amostras (sangue e isolados) de paciente com doença de Chagas do grupo transplantado de medula óssea (TXMO), utilizando método UPGMA e coeficiente Pearson	63
Figura 15-	Elektroforese da PCR-ND7 em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, de pacientes com doença de Chagas crônica (CR).....	69
Figura 16-	Elektroforese da PCR-ND7 em gel de agarose 2% corado com brometo de etideo, de pacientes coinfectados HIV/ <i>T. cruzi</i> sem reativação (CO)	70
Figura 17-	Elektroforese da PCR-ND7 de paciente coinfectados HIV/ <i>T. cruzi</i> com reativação da doença de Chagas (CO/RE), em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio	71
Figura 18-	Elektroforese da PCR-ND7 em diferentes isolados de um mesmo paciente do grupo CO sem reativação da doença de Chagas, em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.....	72
Figura 19-	Ensaio de PCR para a região SL (mini-exon) em amostras de epimastigotas isoladas de pacientes com co-infecção HIV/ <i>T. cruzi</i> (CO)	75
Figura 20-	Ensaio de PCR para a região 24Sα rDNA, utilizando amostras de epimastigotas isoladas de pacientes com doença de Chagas crônica (CR) e com co-infecção HIV/ <i>T. cruzi</i> (CO) e reativação (CO/RE)	77
Figura 21-	Perfil de fragmentos pós digestão da PCR-RFLP HSP60/ <i>EcoRV</i> em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio, utilizando amostras de epimastigotas isoladas de pacientes com doença de Chagas aguda (AG), crônica (CR), crônica com imunodepressão (CRI) e com co-infecção HIV/ <i>T. cruzi</i> (CO)	79
Figura 22-	Perfil de fragmentos pós digestão PCR-RFLP GPI/ <i>HhaI</i> em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio, utilizando amostras de epimastigotas isoladas de pacientes com doença de Chagas aguda (AG), crônica (CR), crônica com imunodepressão (CRI) e com co-infecção HIV/ <i>T. cruzi</i> (CO)	81

TABELAS

Tabela 1-	Dados demográficos de 106 pacientes com doença de Chagas e 75 controles sem doença	41
Tabela 2-	Distribuição de 97 pacientes com doença de Chagas em relação à forma clínica	42
Tabela 3-	Distribuição de 106 pacientes com doença de Chagas em relação à naturalidade	43
Tabela 4-	Distribuição de 106 isolados de <i>T. cruzi</i> de 106 pacientes dos grupos CR, CRI, CO, CO/RE, TX e TX/RE em relação à amplificação da sequência do gene ND7 (pares de bases (pb)).....	65
Tabela 5-	Distribuição de 95 isolados de <i>T. cruzi</i> de 95 pacientes sem e com imunodepressão e reativação em relação à amplificação da sequência do gene ND7 (pares de bases (pb))	66
Tabela 6-	Distribuição de 97 isolados de 97 pacientes com doença de Chagas em relação à PCR-ND7 e naturalidade, considerando “Regiões 1 e 2”	67
Tabela 7-	Distribuição de 93 pacientes com doença de Chagas em relação à PCR-ND7 e formas clínicas	68
Tabela 8-	Distribuição de 106 isolados de <i>T. cruzi</i> de 106 pacientes com doença de Chagas dos grupos: agudo (AG), crônico (CR), crônico com imunodepressão (CRI), coinfestado HIV/ <i>T. cruzi</i> (CO) e reativado (CO/RE), transplantado (TX) e reativado (TX/RE) em relação PCR da região SL (mini-exon)	74
Tabela 9-	Distribuição de 106 isolados de <i>T. cruzi</i> de 106 pacientes com doença de Chagas quanto aos grupos, em relação ao padrão de banda da amplificação da sequência 24Sα rDNA (LSU rDNA) de <i>T. cruzi</i>	76
Tabela 10-	Perfil da PCR-RFLP HSP60/ <i>EcoRV</i> após reação de digestão em 106 isolados de <i>T. cruzi</i> de 106 pacientes com doença de Chagas	78
Tabela 11-	Perfil dos produtos de PCR-RFLP GPI/ <i>HhaI</i> após reação de digestão em 106 isolados de <i>T. cruzi</i> de 106 pacientes com doença de Chagas	80
Tabela 12-	Distribuição de 106 isolados de 106 pacientes dos grupos: agudo (AG), crônico (CR), crônico com imunodepressão (CRI), coinfestado HIV/ <i>T. cruzi</i> (CO) e reativado (CO/RE), transplantado (TX) e reativado (TX/RE) quanto à classificação dos isolados em DTU... ..	82
Tabela 13-	Distribuição de 106 isolados de 106 pacientes com doença de Chagas segundo a classificação em DTU e naturalidade.....	83

Resumo

Silva SCV. Caracterização molecular de *Trypanosoma cruzi* em pacientes com doença de Chagas sem e com imunodepressão (infecção por HIV e transplante de órgãos) [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A doença de Chagas é caracterizada por um amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde a ausência de sintomas à doença grave com comprometimento cardíaco e/ou digestivo. A influência do parasito, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), agente etiológico da doença, nessas apresentações clínicas têm sido largamente estudada, não se tendo demonstrado o papel da diversidade genética de populações de *T. cruzi* na determinação das diferentes formas clínicas em humanos. Este trabalho teve como objetivos: a) geral: analisar as características moleculares de *T. cruzi* em pacientes com doença de Chagas com e sem imunodepressão (infecção por HIV e transplante de órgãos com e sem reativação); b) específicos: 1. Analisar comparativamente isolados do parasito quanto à distribuição em DTU; 2. Relacionar os resultados obtidos pela análise molecular do gene ND7 com a forma clínica e origem; 3. Avaliar por LSSP-PCR a variabilidade da sequência do kDNA de *T. cruzi* diretamente de amostras biológicas assim como em isolados de *T. cruzi* obtidos pelos exames de hemocultura/xenodiagnóstico; 4. Comparar os padrões polimórficos obtidos por LSSP-PCR em amostras repetidas de um mesmo paciente no mesmo sítio ou distintos sítios biológicos. Foram incluídos, após aprovação do protocolo na CAPPesq e mediante assinatura de TCLE, 106 pacientes com doença de Chagas crônica ou com imunossupressão, provenientes dos ambulatorios e enfermarias do HCFMUSP, além de 75 indivíduos controle, com provas sorológicas e moleculares negativas. Foram analisadas 187 amostras isoladas de hemocultura/xenodiagnóstico e 236 diretamente de amostras sanguíneas de pacientes. Os seguintes grupos foram constituídos: Agudo-AG, Crônico-CR, Crônico Imunodeprimido-CRI (doenças autoimunes/neoplasias), Coinfecção-CO (infecção por HIV/*T. cruzi*), Coinfecção-CO/RE (infecção por HIV/*T. cruzi* e reativação da doença de Chagas), Transplantado-TX, Transplantado-TX/RE (Transplantado com reativação da doença de Chagas). Foram identificados DTU TcI, TcV, TcVI e em maior número TcII, por ensaios de tipagem molecular do parasito, com distribuição estatisticamente significativamente de acordo com a naturalidade dos pacientes ($P=0,013$). Quanto ao gene ND7, observou-se que a banda de ~900 bp ocorreu em 83,0% das amostras das regiões norte, nordeste, centro-oeste e Bolívia e a de ~400pb em 54% das amostras nas regiões sul e sudeste brasileiras sendo esta diferença estatisticamente significante ($P<0,001$). A comparação dos perfis observados por LSSP-PCR a partir de amostras extraídas diretamente do sangue e de isolados obtidos de hemocultura/xenodiagnóstico mostrou maior variabilidade em amostras sanguíneas, confirmada pelo dendrograma. Adicionalmente, o estudo de amostras repetidas do mesmo paciente permitiu confirmar a maior variabilidade nas amostras diretamente extraídas do sangue, com mudança dos padrões durante e após o tratamento com reaparecimento de perfis antigos não presentes no período pré-tratamento imediato, além de presença de perfis diferentes em distintos sítios biológicos do mesmo paciente. O encontro de DTU diferentes de TcII nos grupos CR/CRI e AG enfatiza a necessidade de atentar para a diferença em limiares de reatividade segundo DTU na análise da parasitemia por PCRq (quantitativa), conforme registrado na literatura. Os dados observados por LSSP-PCR acrescentam informações adicionais não revelados por tipagem molecular, representando novos

desafios para o entendimento da relação hospedeiro-parasito em pacientes com doença de Chagas sem e com imunossupressão, ao lado de fatores como nível de parasitemia e pressão seletiva de medicamentos antiparasitários e imunossupressores.

Descritores: doença de Chagas; tipagem molecular; *Trypanosoma cruzi*; HIV; coinfeção; técnicas de genotipagem; transplante de órgãos.

Summary

Silva SCV. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* in patients with Chagas' disease with and without immunosuppression (HIV infection and organ transplantation) [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Chagas' disease is characterized by a broad spectrum of clinical manifestations, ranging from asymptomatic cases to severe cardiovascular and/or gastrointestinal involvement. The clinical presentations are thought to be determined primarily by genetic diversity of populations of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), but no correlation was clearly demonstrated yet. This study aimed to: a) general: to analyze the molecular characteristics of *T. cruzi* in patients with Chagas' disease with and without immunosuppression (HIV infection and organ transplantation with or without reactivation); b) specifics: 1. To analyze comparatively isolates from the parasite as for the distribution in DTU; 2. To describe the results obtained by molecular analysis of gene ND7 in relationship with the clinical form and origin; 3. To assess by LSSP-PCR the variability of the sequence of the *T. cruzi* kDNA directly from biological samples, as well as in *T. cruzi* isolates obtained by examination of blood culture/xenodiagnosis; 4. To compare the polymorphic patterns obtained by LSSP-PCR in repeated samples of the same patient on the same site or different biological sites. After approval of the protocol in CAPPesq and by signing an informed consent, 106 patients with chronic Chagas disease or immunosuppression, from the HCFMUSP's clinics and wards, and 75 control subjects with negative serological and molecular tests were included. They were analyzed 187 isolated samples from blood culture/xenodiagnosis and 236 directly from blood samples of patients. The following groups were formed: Acute-AC, Chronic-CR, Chronic immunocompromised-CRI (autoimmune diseases/ neoplasms), Coinfection-CO (HIV/*T. cruzi* infection), Coinfection-CO/RE (HIV/*T. cruzi* and reactivation of Chagas disease), Transplantation-TX, Transplantation-TX/RE (Transplantation/ with reactivation of Chagas' disease). DTU TcI, TcV, TcVI and higher TcII number were identified for molecular typing assays of the parasite and the distribution of DTU was statistically significant according to patient's naturality ($P=0.013$). As for ND7 gene, was observed that the band of ~ 900 bp was prevalent in 83% of the samples in the North, Northeast, Midwest regions and Bolivia and the band of ~400bp occurred in 54% of the samples of Brazilian' South and Southeast regions, this distribution was statistically significant ($P<0.001$). The comparison between the profiles observed by LSSP-PCR from samples taken directly from blood and isolates obtained from blood culture/xenodiagnosis showed greater variability in blood samples, confirmed by dendrogram. Additionally, the study of repeated samples from the same patient allowed to confirm the greater variability in blood samples taken directly, with changing patterns during and after the treatment with reappearance of old profiles not present in the immediate pre-treatment period, and the presence of different profiles at different biological sites in the same patient. The presence of other DTUs than TcII in chronic and chronic immunosuppressed patients and AC groups emphasizes the need to pay attention to the different reactivity thresholds for the various DTU in the analysis of parasitaemia by PCRq (quantitative), according to the data registered in the literature. The results observed by LSSP-PCR add further information not revealed by molecular typing, representing new challenges for the understanding of the host-parasite relationship in patients with Chagas' disease with and without

immunosuppression, alongside factors such as level of parasitaemia and selective pressure of antiparasitic drugs and immunosuppressive.

Descriptors: Chagas disease; molecular typing; *Trypanosoma cruzi*; HIV; coinfection; genotyping techniques; organ transplantation.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 URBANIZAÇÃO E GLOBALIZAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS

Um século após a sua descoberta, a doença de Chagas ainda representa um importante problema de saúde pública na América Latina. Além disso, devido à crescente população migratória, a urbanização da doença foi registrada não só em países endêmicos como em áreas não endêmicas, como na América do Norte e alguns países europeus (Dias, 2007; Schmunis, 2007; Senior, 2007; Dias et al., 2008; Lescure et al., 2008, Requena-Mendez et al., 2014). As estimativas atuais sugerem que aproximadamente 7,7 milhões de indivíduos estejam infectados na América Latina, sendo a maioria no estágio crônico da doença; destes, quase 1.9 milhões vivem no Brasil (Weekly Epidemiological Record, 2007).

Com a migração de grandes contingentes populacionais nas décadas de 70 e 80 da zona rural para a área urbana em busca de oportunidades de trabalho e melhores condições de vida, ocorreu a urbanização da doença de Chagas em grandes metrópoles, passando a ter importância outras formas de transmissão, como a transfusional, congênita e transplantes de órgãos (Wendel, 1998; Ministério da Saúde, 2003, 2004 e 2005a).

Além disso, com as migrações humanas para as regiões não endêmicas, a doença de Chagas ganhou novos espaços em outros países e continentes tais como a Espanha, Itália, Suécia, Suíça, França, Inglaterra, Estados Unidos, Japão, Austrália entre outros, com risco de transmissão congênita ou por transplante de órgãos de indivíduos infectados, que migraram das áreas endêmicas para essas regiões (Garraud et al., 2007; Schmunis, 2007, Gascon et al., 2010, Requena-Mendez et al., 2014).

Além das mudanças relativas às vias de transmissão da moléstia, a presença de pessoas infectadas em zonas urbanas propiciou não só a sua transmissão, mas também a presença de reativação em pacientes imunodeprimidos sob intensa imunodepressão por comorbidades e uso de medicamentos imunossupressores ou

citotóxicos para tratamento de neoplasias ou rejeição em transplantes ou doenças autoimunes.

A co-infecção HIV e *T. cruzi* tem sido registrada principalmente no Brasil e Argentina, supondo-se a ocorrência de 5 a 20 mil pacientes coinfectados apenas no Brasil (Ramos et al., 2010). Em cerca de 15-20% dos casos de co-infecção, tem-se registrado a reativação da doença de Chagas (Sartori et al., 2007, Almeida et al., 2011), consequentemente alterando a evolução clínica com manifestações graves, na qual a letalidade alcança 100% em pacientes não tratados (Del Castillo et al., 1990; Ferreira et al., 1997; Sartori et al., 1999; Corti, 2000; Morgado et al., 2000; Sartori et al., 2007).

1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E IMUNOSSUPRESSÃO

A infecção chagásica apresenta duas fases bem distintas: a fase aguda e crônica. A fase aguda é definida por diferentes manifestações clínicas, apresentando febre, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite, com duração média de 8-16 semanas, sendo mais grave em crianças menores de cinco anos, pacientes idosos e imunodeprimidos (Camargo e Takeda, 1979; Ferreira et al., 1997). Já na fase crônica, a maioria dos indivíduos infectados geralmente evolui para um estado de aparente equilíbrio parasito-hospedeiro, sem manifestações clínicas, forma indeterminada da doença, que constituem 60 a 70% dos indivíduos infectados. Esta fase caracteriza-se por baixo nível de parasitemia, aumento de anticorpos da classe IgG e longo período de latência clínica, cerca de 10 a 30 anos. Após esse período, 30 a 40% dos pacientes podem apresentar diferentes manifestações clínicas, sendo classificadas nas seguintes formas: cardíaca (30%), digestiva (7 a 8%) e ainda a forma cardíaca/digestiva ou forma mista, estas últimas mais graves (Ministério da Saúde, 2005b).

Na forma indeterminada, não há sintomas ou sinais clínicos da doença, o eletrocardiograma em repouso é normal, o mesmo ocorrendo com a área cardíaca e o estudo radiológico do esôfago e do cólon. A forma crônica cardíaca (cardiomiopatia chagásica crônica - CCC) é uma das mais importantes formas clínicas, por ser

progressiva e poder evoluir com elevada morbimortalidade. Pode apresentar-se sem sintomatologia embora com alterações eletrocardiográficas, mas pode também evoluir com graves manifestações clínicas de arritmia, bloqueios de condução atrioventricular e insuficiência cardíaca (Ministério da Saúde, 2005b). Já a forma digestiva da doença de Chagas acomete todo o tubo digestivo, com predomínio no esôfago e cólon terminal, com consequentes alterações da motilidade e morfologia, sendo o megaesôfago e o megacólon as manifestações mais comuns (Ferreira et al., 2005; Dias, 2008).

Em casos de reativação da doença de Chagas observados em pacientes submetidos à imunossupressão por drogas, em transplantes de órgãos ou à quimioterapia citotóxica, ou secundária a neoplasias ou doenças autoimunes, são descritos meningoencefalite, miocardite, paniculite sob forma de exantema máculo-papular, eritema nodoso e esofagite, entre outros (Bestetti et al., 2004; D'Ávila et al., 2005; Benvenuti et al., 2005; Fiorelli et al., 2005; Diez et al., 2007; Gallerano et al., 2007; Marchiori et al., 2007).

Na co-infecção HIV- *T. cruzi*, a reativação tem sido registrada sob forma de meningoencefalite em 70 a 90% dos pacientes, de miocardite em 30 a 40%, encefalite e meningoencefalite em 5 a 15% e comprometimento de outros órgãos mais raramente: esôfago, peritônio, cervix uterina, pele, miosite e olhos (Ferreira et al., 1997; Sartori et al., 1999; Sartori et al., 2007; Ministério da Saúde, 2007, Almeida et al., 2011). Já foi relatado a presença de quadros oligossintomáticos em estudos prospectivos com síndromes febris, mononucleose infecciosa-símile ou assintomáticos em paciente que transmitiu a infecção ao recém-nascido (Sartori et al., 2007). Embora os mecanismos que geram a alta parasitemia detectada por microscopia direta ou por PCR quantitativo nas formas graves de reativação da doença de Chagas sejam ainda pouco compreendidos, acredita-se que estas manifestações sejam consequências do comprometimento de imunidade celular (com queda de $CD4 < 200$ células/mm³ em cerca de 80% dos casos e de outros múltiplos fatores relacionados ao parasito (tipo da cepa, virulência, antigenicidade, tropismo celular, carga parasitária), ao hospedeiro humano (idade, sexo, raça, outras expressões da resposta imune) ou fatores ambientais como a nutrição e uso de drogas

imunodepressoras (Silva et al., 1993; Vago et al., 2000; Sartori et al., 2007, de Freitas et al., 2011).

1.3 ESTRUTURA GENÔMICA DO PARASITO

A estrutura genômica do parasito é organizada em uma região de DNA nuclear e outra extra extranuclear caracterizada, no caso dos membros da ordem Kinetoplastida, por uma mitocôndria única e alongada, constituindo o cinetoplasto. Essa organela é composta de duas classes de moléculas de DNA circulares denominadas maxicírculos e minicírculos, correspondentes a cerca de 23 a 30% de todo o DNA celular, denominado DNA do cinetoplasto ou kDNA do *T. cruzi* (Stuart, 1983; Degraeve et al., 1988).

Os minicírculos estão presentes em torno de 10.000 a 20.000 cópias por célula, que se encontram concatenados entre si, sendo constituídos de quatro regiões conservadas intercaladas por quatro regiões variáveis. As regiões conservadas contêm a região de replicação do DNA, enquanto as regiões variáveis estão envolvidas com a produção de pequenos RNAs guias (gRNAs) que participam da editoração dos mRNAs das enzimas mitocondriais. Os maxicírculos estão presentes em cerca de 20 a 50 cópias por célula e contêm os genes de proteínas relacionadas com a respiração celular, bem como de RNAs ribossomais (Simpson, 1987; Westenberger et al., 2006).

1.4 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *T. CRUZI*

O protozoário tem sido selecionado como alvo de estudo para explicar a grande variabilidade no quadro clínico dos pacientes com doença de Chagas.

Inicialmente, na década de 70, as populações de *T. cruzi* foram analisadas considerando as seguintes variáveis: morfologia do parasito no sangue periférico, curva de parasitemia, taxa de mortalidade, achados histopatológicos e

comportamento de camundongos infectados com o protozoário. Os isolados de pacientes com doença de Chagas foram classificados em três Biodemas: Tipo I, II e III (Andrade, 1974; Andrade et al., 1983).

Através de ensaios de eletroforese de isoenzimas, importantes contribuições foram inicialmente registradas por Miles et al. (1977) em trabalho realizado com isolados de São Felipe, Bahia (Brasil). Foi observado um claro dimorfismo entre os parasitos isolados de hospedeiros que habitavam ambientes silvestres daqueles de ambiente domiciliar ou peridomiciliar, estabelecendo-se dois grupos principais, denominados pelos autores de Zimodema 1 e Zimodema 2 respectivamente.

Posteriormente, Miles et al. (1978) também por análise isoenzimática, demonstraram a heterogeneidade das populações do parasito isoladas de humanos, mamíferos e triatomíneos silvestres classificando-os em três grupos principais denominados Zimodemas: Z1, Z2 e Z3. Os zimodemas Z1 e Z3 foram correlacionados predominantemente ao ciclo silvestre do parasito e observados na doença humana apenas na fase aguda, enquanto que Z2 foi associado ao ciclo doméstico e à doença de Chagas crônica no homem.

A distribuição quanto ao padrão isoenzimático Z1, Z2 e Z3 também foi avaliada em 316 isolados de *T. cruzi* provenientes da Venezuela, Amazônia brasileira e regiões central e nordeste do Brasil. Na Venezuela, houve predominância de *T. cruzi* Z1 e, mais raramente, *T. cruzi* Z3. *T. cruzi* Z1 e Z3 causaram infecções esporádicas da doença de Chagas na Amazônia brasileira e, os isolados Z2, não encontrados na Venezuela ou na Bacia Amazônica, foram isolados na grande maioria de pacientes das regiões central e nordeste do Brasil. Essas observações levaram à sugestão de que os diferentes tipos de *T. cruzi* podem estar relacionados às diferentes formas da doença de Chagas no Brasil e na Venezuela (Miles et al., 1981).

Chapman et al. (1984) analisaram 28 isolados obtidos de triatomíneos e mamíferos provenientes do Chaco paraguaio. Foi verificado que 89,2% dos isolados demonstraram um perfil isoenzimático heterogêneo, possivelmente relacionado com o Zimodema 2 boliviano descrito previamente por Miles et al. (1981). Dos 28 isolados, 3 demonstraram padrões semelhantes aos isolados pertencentes ao Zimodema da maioria dos isolados brasileiros.

No intuito de determinar por padrões isoenzimáticos à influência de passagens seriadas de isolados de *T. cruzi* pertencentes a diferentes Zimodemas (A, B, C, D e AB) e Esquizodemas inoculados em camundongos C3H, Carneiro et al. (1990) observaram que após aproximadamente 18 meses de manutenção de culturas do parasito, ocorreram mudanças de padrão de isolados Zimodema B para Zimodema A, de Zimodema C para B, Zimodema D para A e, por fim, do Zimodema misto AB para apenas Zimodema A. Além disso, também foram verificadas alterações nos padrões de esquizodemas dos isolados. Os resultados mostraram que a manutenção prolongada de *T. cruzi* em camundongos pode alterar os padrões isoenzimáticos, sugerindo um efeito seletivo sobre estas populações do parasito.

Na década de 90, estudos moleculares corroboraram esses resultados utilizando alvos para diferenciação genética de isolados *T. cruzi* com sequências do gene do DNA ribossomal, que comparado a genes análogos de outros tripanosomatídeos, revelou uma região altamente divergente, localizada no final 3' deste gene de *T. cruzi*. Essa região foi denominada 24S α rDNA ou subunidade maior ribossomal (LSU rDNA) (Souto e Zingales, 1993).

Souto et al. (1996) demonstraram um claro dimorfismo através da região intergênica de mini-exon e gene ribossomal (24S α rDNA) na análise de 88 isolados de *T. cruzi* derivados de humanos, triatomíneos e mamíferos do ciclo silvestre. Com o emprego dos iniciadores para as sequências de mini-exon e 24S α rDNA, três possíveis associações foram observadas: a) linhagem 1 com um produto de 125 pb originado da reação de amplificação do 24S α rDNA e o produto de 300 pb determinado pela amplificação de mini-exon; b) linhagem 2, correspondente aos produtos de 110 pb do 24S α rDNA e de 350 pb de mini-exon, c) linhagem 1/2 (mista), relacionada à presença de ambos os produtos 110pb e 125pb do 24S α rDNA associado ao produto de 300 pb de mini-exon. A análise por “*Random Amplified Polymorphic DNA*” (RAPD) possibilitou a classificação em dois grupos principais: um apenas com linhagens 1, 1/2, e outro grupo formado pela linhagem 2.

Complementarmente ao estudo acima, Zingales et al. (1998), em estudo epidemiológico, investigaram a distribuição dessas duas linhagens principais (1 e 2) originadas de triatomíneos, mamíferos e 157 isolados humanos de 12 diferentes áreas

geográficas do Brasil. Foi demonstrado que a linhagem 1 está relacionada ao ciclo doméstico e regiões dos estados de Minas Gerais, Paraíba e Piauí, enquanto que no ciclo silvestre as duas linhagens (1 e 2) circulam igualmente e estão relacionadas com a região amazônica.

Vários estudos relataram a divisão de populações de *T. cruzi* em dois grandes grupos, que receberam denominações distintas. Para homogeneizar a nomenclatura, a comunidade científica, reunida no “*International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease*” em 1999, definiu que os isolados e cepas de *T. cruzi* após serem caracterizados por técnicas moleculares, como “*Multilocus Enzyme Electrophoresis*” (MLEE), “*Random Amplified Polymorphic DNA*” (RAPD), ou loci genéticos, tais como genes de mini-exon e 24S α rDNA, deveriam ser classificados como *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Ressalta-se que em publicação de Zingales et al. (2009) reuniram-se todas as contribuições registradas, redefinindo a classificação de cepas e dos isolados de *T. cruzi* em seis Discrete Typing Units (DTUs): *T. cruzi* I-VI.

Subsequentemente, em trabalho desenvolvido por Brisse et al. (2000) com base em MLEE e RAPD, foi proposta uma nova subdivisão dos grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II em seis subgrupos ou DTUs assim designados: *T. cruzi* I e *T. cruzi* IIa-IIe. Posteriormente, em 2001, Brisse et al. utilizaram marcadores 24S α rDNA e mini-exon para tipagem molecular de 50 isolados, baseando-se em padrão de MLEE/RAPD encontrado anteriormente. Cinco grupos de cepas foram identificados: I, IIa, IIc, IId e duas linhagens juntas IIb/IIe respectivamente. Adicionalmente, utilizando seqüências de mini-exon e 18S rDNA foi possível distinguir a linhagem IIe da linhagem IIb. Destaca-se que nesse trabalho foi possível identificar todas as linhagens de *T. cruzi*.

No intuito de explorar o papel da diversidade genética das populações de *T. cruzi* na determinação das diferentes formas clínicas da doença, comparando isolados de pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi* e pacientes com doença de Chagas crônica, Perez-Ramirez et al., em 1999, pela técnica de RAPD não encontraram associação entre os genótipos de isolados de *T. cruzi* e as formas clínicas da doença associadas ou não ao vírus HIV. A variabilidade observada nos genótipos foi

relacionada às regiões geográficas nas quais os pacientes possivelmente se infectaram.

Estes estudos foram importantes para descrever o perfil da distribuição das linhagens e seus subgrupos no Brasil e parte da América do Sul, além de determinar os grupos mais prevalentes com a doença de Chagas no homem. Deve-se enfatizar que os estudos de isolados de *T. cruzi* têm várias limitações em decorrência da: a) sensibilidade dos testes de xenodiagnóstico e hemocultura; b) dificuldade de se trabalhar com vetores e hospedeiros; c) possibilidade de seleção natural dos isolados pelo meio de cultura. Considerando estas limitações, outros métodos têm sido propostos para estudar o parasito diretamente no sangue ou tecido do paciente infectado.

Um dos métodos foi apresentado por Vago et al. (1996), que utilizaram a técnica de “*Low Stringency Single Specific Primer-PCR*” (LSSP-PCR) na análise de tecido cardíaco de um paciente com cardiopatia chagásica e de 16 isolados do parasito no homem e em vetores, tendo sido possível caracterizar DNA de *T. cruzi* extraído diretamente de tecido e demonstrar a utilidade e a reprodutibilidade da técnica em traçar o perfil da região variável do minicírculo (kDNA). Em 1999, Andrade et al. empregaram a mesma técnica para estudar o polimorfismo da região variável dos minicírculos do kDNA por LSSP-PCR inoculando concomitantemente duas diferentes linhagens de *T. cruzi* em camundongos BALB/c, demonstrando distribuição diferencial no coração (cepa JG), no reto, diafragma, esôfago e sangue com predominância da cepa Col1.7G2. Em 2002, o mesmo grupo testou a distribuição diferencial dos parasitos em 4 linhagens de camundongos, visando verificar o papel do hospedeiro nesta distribuição. Ao observar uma distribuição distinta entre as linhagens de camundongos BALB/c e DBA-2 versus C57BL/6 e Swiss, sugeriram uma possível relação da distribuição dos parasitos inoculados com o locus MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) destes hospedeiros.

Burgos et al. (2005) detectaram em um paciente com aids e reativação da doença de Chagas no sistema nervoso central (SNC) diferentes sublinhagens de *T. cruzi* II observadas no sangue e cérebro através de PCR para a sequência de mini-exon e 24S α rDNA, essas diferenças também foram comprovadas neste mesmo

trabalho com a utilização de mais duas técnicas moleculares: PCR-LSSP e PCR-RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”) para região do kDNA. Em 2008, os mesmos autores demonstraram em outro paciente com aids e reativação da doença no SNC uma mistura de duas populações de *T. cruzi*: *T. cruzi* I e *T. cruzi* IId/e demonstrando uma predominância do *T. cruzi* I no líquido cefalorraquidiano (LCR). Esta variabilidade genética de parasitos em um mesmo paciente tem sido observada em alguns, mas não em todos os trabalhos que analisam pacientes sob imunossupressão ou em infecção experimental em camundongos após a instituição de imunossupressão (Lages-Silva et al., 2002; Brito et al., 2003, Burgos et al., 2005, 2008; Freitas et al., 2005).

Pela análise de microarranjos de DNA, técnica que permite examinar simultaneamente a expressão diferencial de milhares de genes em organismos e tecidos, Baptista et al. (2006) analisaram a transcrição diferencial de genes de três isolados de pacientes com a forma indeterminada e três isolados de pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas. Foi observado que o transcrito da subunidade 7 do gene NADH desidrogenase (ND7), localizado no maxicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA), era cerca de 30 vezes mais abundante nos isolados de pacientes com a forma cardíaca em relação aos isolados de pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas, tendo-se verificado um padrão de bandas de aproximadamente 500 pares de bases em 89,9% dos pacientes com a forma indeterminada e aproximadamente 900 pares de bases em 90% dos pacientes com a forma cardíaca da doença. Os autores destacam que o gene ND7 codifica a parte principal pré-editada da subunidade ND7 do complexo respiratório I (entidade multimolecular composta por mais de 40 subunidades em mamíferos e plantas), na qual dois elétrons transferem-se do NADH para ubiquinona (quinona lipossolúvel da membrana mitocondrial) no processo de fosforilação oxidativa. Como resultado final, foi demonstrada a possibilidade do polimorfismo do gene ND7, estar relacionado às formas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas.

Mais recentemente, este mesmo grupo de pesquisadores liderado agora por Carranza et al. (2009) também avaliaram o gene ND7 e outros genes mitocondriais do maxicírculo por análise de microarranjos. Ao analisarem 84 isolados de 75

pacientes com a forma cardíaca e indeterminada, verificaram a ausência de correlação com as diferentes formas clínicas.

Devido à natureza híbrida de algumas populações de *T. cruzi*, diferentes metodologias para genotipagem do parasito em DTU TcI a TcVI, estão sendo aplicadas. O método proposto por Lewis et al. (2009) apresenta uma metodologia simples e acurada, capaz de identificar todos os genótipos do parasito, avaliando os resultados do RFLP-PCR de dois genes: HSP60 e GPI (Sturm et al., 2003; Gaunt et al., 2003) juntamente com os padrões amplificados pelo gene 24S α rDNA (LSU rDNA).

Apesar de vários estudos terem sido registrados na literatura procurando relacionar características biológicas e moleculares do parasito ao quadro clínico e lesões de diferentes órgãos e tecidos, o estabelecimento destas associações continua sendo um desafio.

2 Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é caracterizada por um amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde a ausência de sintomas à doença grave com comprometimento cardíaco e/ou digestivo. A influência do parasito, nas apresentações clínicas tem sido largamente estudada principalmente em pacientes com doença crônica, não se tendo demonstrado muito claramente o papel da diversidade genética das populações de *T. cruzi* na determinação das diferentes formas clínicas nos pacientes.

Assim como em pacientes com doença de Chagas crônica, que além da doença de Chagas são infectados pelo vírus HIV, ou que são submetidos à terapia imunossupressora e/ou ainda transplantes de células tronco-hematopoiéticas ou órgãos sólidos, também apresentam essa variabilidade clínica. Além disso, podem apresentar um quadro ainda mais grave: a reativação da doença de Chagas.

Estudos realizados em pacientes crônicos com co-infecção HIV/*T.cruzi* e transplantes são escassos na literatura, geralmente são relatos de casos isolados, que demonstram maior variabilidade genética do parasito em pacientes com reativação da doença de Chagas, estudando diferentes sítios de infecção (Burgos et al., 2005; 2008) ou trabalhos utilizando modelos murinos com imunossupressão (Brito et al., 2003).

Um estudo com maior número de pacientes com co-infecção HIV/*T.cruzi* foi realizado em 1999 por Perez–Ramirez et al. pela técnica de RAPD com 29 isolados de pacientes. Apesar da ausência de associação entre o perfil polimórfico de isolados de *T. cruzi* e as formas clínicas da doença associadas ou não ao vírus HIV, é clara na literatura a presença de variabilidade genética em um mesmo paciente imunodeprimido ou em camundongos que receberam imunossupressão.

Há, pois, grande interesse na análise de amostras de pacientes sem ou sob regime de imunossupressão para avaliar a presença de maior variabilidade genética nessa condição, uma vez que, muitos estudos enfatizam o papel do hospedeiro, que, associadamente ao parasito, pode contribuir para a diversidade clínica observada na doença de Chagas (Zingales et al., 1998; Vago et al., 2000; Abel et al., 2001; Macedo et al., 2001, 2004; Rodrigues et al. 2005; Baptista et al., 2006; Lages-Silva et al.,

2006; Zafra et al., 2007; Carranza et al., 2009; Costa et al., 2009; Cunha-Neto et al., 2005, 2009).

Desse modo, se faz necessário, um estudo integrado das características moleculares do parasito, frente a aspectos clínicos apresentados pelos pacientes, na tentativa de detectar relações e estabelecer perfis mais específicos, que possam orientar o prognóstico ou mesmo trazer informações sobre possível resposta ao tratamento específico da doença de Chagas.

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Descrever as características moleculares de *T. cruzi* em pacientes com doença de Chagas com e sem imunodepressão (infecção por HIV e transplante de órgãos com e sem reativação).

3.2 ESPECÍFICOS

- a. Analisar comparativamente isolados de *T. cruzi* pela amplificação das sequências dos genes: SL (mini-exon), 24S α rDNA (LSU rDNA), HSP60, GPI e ND7 em grupos com e sem imunodepressão, bem como, isolados de um mesmo paciente em diferentes períodos e/ou sítios biológicos;
- b. Relacionar os resultados obtidos pela análise molecular do gene ND7 com a forma clínica apresentada pelos pacientes juntamente com os dados de naturalidade (origem);
- c. Avaliar por LSSP-PCR a variabilidade da sequência do kDNA de *T. cruzi* diretamente de amostras biológicas assim como em isolados de *T. cruzi* obtidos pelos exames de hemocultura e/ou xenodiagnóstico de pacientes com doença de Chagas com e sem imunodepressão;
- d. Comparar os padrões polimórficos obtidos por LSSP-PCR em amostras de um mesmo paciente a partir de coletas realizadas em diferentes períodos e/ou distintos sítios biológicos.

4 Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

No presente estudo foram incluídos 106 pacientes com doença de Chagas, provenientes do Ambulatório de Doença de Chagas, do Serviço de Extensão e Atendimento ao Paciente com infecção por HIV/AIDS (SEAP) da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, das Unidades de Transplante Renal, Serviço de Transplante de Fígado, Serviço de Transplante de Medula Óssea e Unidade de Reumatologia do Instituto Central do HCFMUSP e da Unidade de Insuficiência Cardíaca e Transplante do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, além de 75 sujeitos controles saudáveis, com provas sorológicas e moleculares negativas e sem histórico prévio de doença de Chagas.

Foram realizadas 187 análises em amostras isoladas de exames de hemocultura e xenodiagnóstico (formas epimastigotas de *T. cruzi*) e 236 análises diretamente de amostras sanguíneas de pacientes. Destacamos que, entre os 106 pacientes chagásicos, 45 deles apresentaram mais de 1 amostra de sangue e/ou isolado de *T. cruzi*.

O presente protocolo de pesquisa, intitulado originalmente como: “Estudo de pacientes com doença de Chagas com e sem infecção por HIV: polimorfismo dos genes de citocinas IL10, IL-12B, IFN- γ e do gene da cadeia alfa do receptor de IFN- γ (IFNGR1) e tipagem molecular de isolados de *Trypanosoma cruzi*”, foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, bem como Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (CAPPesq 0174/11).

Parte das amostras foi oriunda de material estocado (1996-2009), coletado mediante TCLE assinados em projeto previamente aprovado pela CAPPesq (0231/02 e emenda 010/95) como segue: Projeto de Pesquisa CAPPesq - 0231/02

“Caracterização molecular de *Trypanosoma cruzi* isolados de pacientes com doença de Chagas e co-infecção HIV-*Trypanosoma cruzi* – Nível de parasitemia por técnicas parasitológicas e moleculares”. Emenda do Protocolo 010/95: “Doença de Chagas em pacientes HIV positivos: prevalência, aspectos clínicos e laboratoriais da associação pela infecção por *Trypanosoma cruzi* e HIV”.

Os participantes assinaram o TCLE ou tiveram garantido o sigilo sobre sua identificação, no caso das amostras armazenadas (Resolução nº 347 do Conselho Nacional da Saúde, Ministério da Saúde, 2005c).

4.1.1 Critérios de Inclusão

Seguem os critérios adotados para inclusão dos sujeitos de pesquisa, definição e siglas para cada grupo estudado:

- I - Grupo Agudo (AG): constituído por 9 pacientes com doença de Chagas aguda, sendo 8 provenientes de surtos de contaminação oral, sem imunodepressão, sem infecção pelo vírus HIV e não submetidos a transplante de órgãos e 1 paciente pós transplantado renal (receptor de órgão infectado pelo doador), imunodeprimido, sem HIV, mas que apresentou quadro clínico de doença aguda. O diagnóstico da doença de Chagas aguda foi definido pela presença de *T. cruzi* em exame direto do sangue periférico e pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM, excluindo anticorpos falso-positivos (depois da absorção do fator reumatóide), segundo os critérios descritos por Umezawa et al., 1996 e 2001, Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012. Os pacientes desse grupo foram nomeados de AG1 a AG9;
- II - Grupo Crônico (CR): constituído por 27 pacientes com doença de Chagas crônica, sem imunodepressão, sem infecção pelo vírus HIV e não submetidos a transplante de órgãos, portadores de diferentes formas clínicas da moléstia. Diagnóstico da doença de Chagas crônica foi realizado com presença de duas provas sorológicas positivas entre três realizadas: ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência indireta $\geq 1/40$ (IFI) ou hemaglutinação indireta $\geq 1/40$ (HA), segundo os critérios descritos por

Ferreira e Ávila, 2001. Os pacientes desse grupo foram nomeados de CR1 a CR27;

III - Grupo Crônico com Imunodepressão (CRI): 15 pacientes com doença de Chagas crônica, sem infecção pelo vírus HIV, porém na fila para transplante de órgãos (10 pacientes), imunodeprimidos pelo uso de drogas imunodepressoras ou portadores de doenças de base (5 pacientes) tais como: linfoma não Hodgkin, leucemia linfocítica crônica (LLC), aplasia medular, poliomiosite e vírus T-linfotrópico humano (HTLV). O diagnóstico da doença de Chagas crônica foi realizado segundo os mesmos critérios do grupo de doença de Chagas crônica. Os pacientes desse grupo foram nomeados de CRI1 a CRI15;

IV - Grupo com Co-infecção HIV/*T.cruzi* (CO): composto por 27 pacientes com doença de Chagas crônica e infecção por HIV, sem reativação da doença de Chagas. A infecção por HIV foi diagnosticada pela prova imunoenzimática (ELISA) positiva, seguida de confirmação por Imunoblot e o diagnóstico de doença de Chagas de maneira semelhante ao grupo crônico. Os pacientes desse grupo foram nomeados de CO1 a CO27;

V - Grupo com Co-infecção HIV/*T.cruzi* e Reativação (CO/RE): 6 pacientes com doença de Chagas crônica com infecção por HIV e reativação da doença de Chagas, sendo o diagnóstico de reativação realizado pela presença de *T. cruzi* em exame direto do sangue periférico e/ou líquido cefalorraquidiano (LCR). Três pacientes apresentaram exame direto positivo em amostras do LCR e os demais somente em sangue periférico. Os pacientes desse grupo foram nomeados de CO/RE1 a CO/RE6;

VI - Grupo Transplantado (TX): composto por 20 pacientes com doença de Chagas crônica, sem infecção por HIV, imunodeprimidos e submetidos a transplantes, sendo:

- Cardíaco (TXC): 11 pacientes com amostras pós transplante, nomeados de TXC1 a TXC11

- Hepático (TXH): 2 pacientes com amostras pós transplante, nomeados de TXH1 e TXH2
- Medula Óssea (TXMO): 2 pacientes com amostras pré e pós transplante, nomeados de TXMO1 e TXMO2
- Renal (TXR): composto por 5 pacientes sendo 1 paciente com amostras pré e pós transplante, nomeado como TXR1, e 4 com amostras somente pós transplante, nomeados de TXR2 a TXR5

O diagnóstico de doença de Chagas foi definido seguindo mesmos critérios do grupo de doença de Chagas crônica;

VII - Grupo Transplantado com Reativação (TX/RE): 2 pacientes com doença de Chagas crônica, sem infecção por HIV, com reativação da doença de Chagas submetidos a transplantes de órgãos:

- Cardíaco (TXC/RE): 1 paciente com amostras pós transplante, nomeado de TXC/RE1
- Renal (TXR/RE): 1 paciente com amostras pós transplante, nomeado de TXR/RE1

O diagnóstico de doença de Chagas crônica foi o mesmo que para o grupo crônico, e o da reativação da doença definido pela presença de *T. cruzi* em exame direto do sangue periférico e/ou presença de formas amastigotas em infiltrado inflamatório de tecidos;

VIII - Grupo Controle Sadio (CS): constituído por 75 indivíduos voluntários, aparentemente saudáveis, sem histórico e contato prévio com triatomíneos e/ou familiares com doença de Chagas. Os sujeitos apresentaram provas moleculares (PCR qualitativa para kDNA de *T. cruzi*) e sorológicas (ELISA, IFI, HA e/ou TESA-Blotting) negativas para doença de Chagas (Umezawa et al, 1996; Ferreira e Ávila, 2001).

A **Figura 1** está representado o diagrama estrutural incluindo todos os sujeitos, grupos e amostras utilizadas no presente estudo:

Figura 1 - Diagrama dos sujeitos, grupos e amostras de pesquisa

No decorrer da tese, utilizou-se o termo “pacientes com doença de Chagas e imunodepressão” para os portadores de infecção por HIV e os submetidos a transplante de órgãos.

4.1.2 Tratamento Específico Antiparasitário

No presente estudo, um total de 30 pacientes receberam tratamento antiparasitário específico para a doença. Todos os pacientes com doença de Chagas aguda (9 pacientes grupo AG) e crônica reativada associada à infecção por HIV (6 pacientes grupo CO/RE) ou transplante de órgãos (2 pacientes grupo TX/RE), receberam tratamento específico antiparasitário (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, Ministério da Saúde, 2005b).

Sete pacientes coinfectados com HIV (grupo CO) também receberam o mesmo tratamento segundo critérios definidos por Sartori et al., 2007, além disso, a indicação para tratamento específico também ocorreu em 5 pacientes transplantados (2 transplantes de medula óssea, 1 cardíaco e 2 transplantados renais) e 1 paciente com doença de Chagas crônica imunodeprimido (grupo CRI).

4.1.3 Classificação das Formas Clínicas da doença de Chagas

A classificação dos pacientes segundo as formas clínicas foi realizada por médicos dos mesmos ambulatorios de acordo com critérios definidos pelo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (Ministério da Saúde, 2005b), Medrado-Faria et al., 1982 e Sartori et al., 2007. As definições e nomenclaturas adotadas para as diferentes formas clínicas dos pacientes foram:

- a. Forma Indeterminada (IND) - indivíduos sem alterações ao exame clínico, ECG e exames radiológicos
- b. Forma Cardíaca (CA) - alterações compatíveis com doença de Chagas: indivíduos que apresentaram bloqueio de ramo direito (BRD), bloqueio de ramo esquerdo (BRE) (sem hipertensão), hemibloqueio anterior esquerdo (HBAE), extra-sístoles frequentes, fibrose em indivíduos com menos de 40

- anos, fibrilação atrial em indivíduo com menos de 50 anos e bloqueio aurículo-ventricular total (BAVT);
- c. Forma Cardíaca Atípica (CAT) - alterações encontradas em outras condições que não a cardiopatia chagásica.
 - d. Forma Cardíaca e Digestiva (CA/DIG) - mesmas alterações definidas na forma cardíaca (CA) incluindo indivíduos com megaesôfago e/ou megacólon: megaesôfago - indivíduos com diagnóstico megaesôfago ao Rx ou com história de disfagia progressiva, associada a dados epidemiológicos sugestivos da doença de Chagas, independente do resultado do estudo radiológico do esôfago; megacólon – obstipação intestinal progressiva durante mais de 8 dias com ou sem uso de laxantes e história de fecaloma, na sua maioria com diagnóstico comprovado pelo enema opaco;
 - e. Forma Cardíaca Atípica e Digestiva (CAT/DIG) – indivíduos com alterações definidas em CAT e portadores de megaesôfago e/ou megacólon (como descrição no item anterior);
 - f. Forma Digestiva (DIG) - indivíduos que somente apresentam alterações digestivas: megaesôfago - diagnóstico megaesôfago ao Rx ou com história de disfagia progressiva, associada a dados epidemiológicos sugestivos da doença de Chagas, independente do resultado do estudo radiológico do esôfago; megacólon – obstipação intestinal progressiva durante mais de 8 dias com ou sem uso de laxantes e história de fecaloma, na sua maioria com diagnóstico comprovado pelo enema opaco;

A definição da forma clínica da doença, refere-se ao momento em que a amostra biológica (sangue ou isolado de *T. cruzi*) foi coletada. Para os pacientes com doença de Chagas aguda, não se aplicam essas definições.

4.1.4 Consulta de Prontuário Médico

A consulta de prontuários médicos dos pacientes incluídos no estudo foi realizada junto ao Serviço de Arquivo Médico do Hospital das Clínicas da Faculdade

de Medicina da Universidade de São Paulo ou pelo sistema HCnet online em busca das seguintes informações:

- Data de nascimento, sexo e idade;
- Naturalidade (Local de nascimento/origem);
- Forma clínica da doença de Chagas: aguda ou crônica/ indeterminada, cardíaca, cardíaca/digestiva ou somente digestiva;
- Infecção pelo vírus HIV e/ou reativação da doença de Chagas;
- Contagem de CD4, CD8 e carga viral em pacientes infectados pelo vírus HIV;
- Uso de drogas imunossupressoras;
- Transplante de órgãos;
- Tratamento específico para a doença de Chagas;
- Dosagem de globulinas/immunoglobulinas.

4.2 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Para o presente protocolo de pesquisa foram utilizadas amostras coletadas de fevereiro de 1996 a julho de 2014. Ressaltamos que amostras de 1996 a 2009 foram coletadas mediante TCLE assinados em projetos anteriores e previamente aprovados. Nesse período, foram coletadas 267 amostras (157 provenientes de sangue e 110 isolados de *T. cruzi*) de um total de 55 pacientes. O uso de amostras previamente coletadas foi aprovado pela CAPPesq segundo a regulamentação vigente.

As amostras de janeiro de 2010 a julho de 2014 foram coletadas pelo presente protocolo de pesquisa CAPPesq 0174/11, em um total de 156 amostras (79 sanguíneas e 77 isolados de *T. cruzi*) de 51 pacientes.

O total geral de amostras analisadas foram de 423 (236 sanguíneas e 187 isolados de *T. cruzi*) de 106 pacientes, além de 236 amostras sanguíneas de 75 controles sadios sem doença.

Foram coletados 63 mL de sangue de cada paciente, sendo:

- a) 40 mL em tubos estéreis contendo heparina, sendo 30 mL para os exames de hemocultura e 10 mL para xenodiagnóstico;
- b) 18 mL de sangue em tubos estéreis contendo EDTA: 10 mL adicionado igual volume de tampão contendo Guanidina HCl 6 M/ EDTA 0,2 M e 8 mL processados em plasma, creme leucocitário com e sem hemácias e sangue total para provas moleculares;
- c) 5 mL de LCR: 2 mL para ensaios moleculares e 3 mL para cultura (pacientes com reativação).

Para os sujeitos controles sadios foram coletados 10 mL de sangue em tubos estéreis contendo EDTA e adicionado igual volume de tampão contendo Guanidina HCl 6 M/EDTA 0,2 M para provas moleculares e/ou 7 mL de sangue em tubo seco para provas sorológicas.

4.3 EXAME PARASITOLÓGICO DIRETO

4.3.1 Microscopia direta

Esse ensaio foi realizado por dois métodos: exame microscópico do creme leucocitário (Luquetti e Rassi, 2000) e “Quantitative Buffy Coat” (QBC) (Amato-Neto et al., 1998) no Laboratório de Investigação Médica em Parasitologia do HC–FMUSP – LIM 46.

4.4 EXAME PARASITOLÓGICO INDIRETO

4.4.1 Hemocultura

As hemoculturas foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica em Parasitologia de HC – FMUSP - LIM 46, conforme descrição prévia de Chiari et al. (1966) e modificação de Luz et al. (1994): 30 mL de sangue são centrifugados, após remoção do plasma, o sedimento contendo hemácias é lavado uma vez em meio LIT

(Liver Infusion Tryptose), ressuspenso em 10 mL do mesmo meio e distribuído em 6 tubos contendo 2 mL de meio LIT em cada.

A leitura desses tubos para pesquisa de parasitos foi realizada em 15, 30, 60 e 90 dias a partir da semeadura.

Quando positivos, os tubos descritos acima foram enviados para o Laboratório de Investigação Médica em Imunologia do HC – FMUSP - LIM 48 para isolamento e obtenção de massa parasitária para realização dos ensaios de tipagem molecular.

4.4.2 Xenodiagnóstico

Foram utilizadas de 20 a 40 ninfas de *Triatoma infestans* (3º e 4º estadio) alimentadas (*in vitro*), em 10 mL de sangue do paciente segundo Perez-Ramirez et al. (1999). A pesquisa de *T. cruzi* no conteúdo digestivo dos triatomíneos foi executada no 30º e 60º dia da coleta.

Cerca de 8 isolados de *T. cruzi* de 8 pacientes coletados no ano de 1996, utilizados para o presente estudo, foram cedidos pelo Instituto Adolfo Lutz – SP Seção de Parasitoses Sistêmicas e pelo Laboratório de Investigação Médica em Parasitologia do HC– FMUSP – LIM 46. Atualmente esta prova tem sido realizada somente pelo Laboratório de Investigação Médica em Parasitologia do HC– FMUSP – LIM 46.

4.5 ISOLAMENTO DE PARASITOS E OBTENÇÃO DE MASSA

Através dos exames de hemocultura e/ou xenodiagnóstico, amostras positivas dos pacientes foram cultivadas no Laboratório de Investigação Médica em Imunologia do HC - FMUSP - LIM 48.

Para o repique inicial foram inoculados 500 µL da amostra de hemocultura positiva em 4,5 mL de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) e mantidos em estufa a 26 °C. A cultura foi monitorada semanalmente, realizando manutenção do meio e

repiques sempre que necessário. Após o 4º repique e obtenção de massa parasitária acima de 10^7 *T. cruzi*/mL, a cultura foi centrifugada a 6800 x g (8000 rpm) por 10 minutos a 10 °C, o precipitado formado foi lavado três vezes com tampão salina fosfato (PBS), acrescido 1 mL de tampão Tris HCl - EDTA pH 8.0 (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA) e por fim, a amostra foi armazenada a -80 °C até o momento da extração de DNA.

4.6 PROVAS MOLECULARES

Todos os ensaios moleculares foram realizados no Laboratório de Investigação Médica em Imunologia (LIM48) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina USP.

Para a confiabilidade dos resultados de PCR, salienta-se em todas as reações, o uso de dois controles negativos, sendo um da sala de mistura de reagentes de PCR e outro da sala de aplicação do DNA e um controle positivo de reação, DNA de cepa referência de *T. cruzi*: Y e/ou cepa Tulahuen. Além disso, todas as reações foram executadas em ambientes fisicamente separados, sendo:

- 1 ambiente para mistura de reagentes para reação de PCR;
- 2 ambientes para aplicação do DNA (1 para amostras de pacientes/controles e outra para cepas e isolados de *T. cruzi*);
- 1 ambiente somente para a visualização dos produtos amplificados em gel de agarose.

4.6.1 Extração de DNA de Pacientes e Controles

Foram empregadas duas técnicas para extração de DNA em amostras sanguíneas de pacientes e controles sadios:

4.6.1.1 Extração de DNA em Tampão Guanidina HCl/EDTA

Foram coletados 10 mL de sangue total em 10 mL de Guanidina-HCl-EDTA pH 8,0 (Ávila et al., 1991). A extração foi realizada segundo Wincker et al. (1994) com algumas modificações: a 500 µL da amostra, foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, a fase superior foi recuperada repetindo-se o procedimento. Após uma última etapa de purificação com clorofórmio/álcool isoamílico seguiu-se a precipitação com etanol absoluto e acetato de sódio 3M. O DNA foi ressuspenso em 50 µL de água bidestilada estéril.

4.6.1.2 Extração por QIAamp® DNA Mini

Utilizou-se 200 µL de sangue total com mesmo volume de Guanidina-HCl-EDTA (e/ou eventualmente líquido cefalorraquidiano (LCR), plasma, creme leucocitário com e sem hemácias) para extração de DNA, conforme o manual do fabricante.

Salienta-se que as extrações das amostras biológicas dos pacientes foram realizadas uma a uma em dias distintos, sendo cada uma pareada a um controle sadio e em fluxo laminar previamente esterilizado.

4.6.2 Extração de DNA de Isolados de *T. cruzi*

Para a extração de DNA em isolados de *T. cruzi* (amostras de formas epimastigotas provenientes dos exames de hemocultura e/ou xenodiagnóstico, previamente cultivadas e congeladas como descrito no item 4.5) a seguinte técnica foi empregada, de acordo com Sambrook et al. (1989) com modificações, utilizou-se a proteinase K na concentração final de 100 µg/mL e dodecilsulfato de sódio (SDS) 1%, incubado por 2 horas em banho maria 56°C ou “overnight” a 37 °C. Após inativação a 100°C por 10 minutos, o DNA foi extraído com o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), precipitado com álcool absoluto e acetato de sódio 3M mantido por 1 hora a -80°C ou *overnight* a -20°C, lavado com álcool a 70% e por fim ressuspenso em 50 µL de água bidestilada estéril.

Salienta-se que as salas de trabalho para manuseio das amostras sanguíneas de pacientes e controles são fisicamente separadas das salas utilizadas para extração de DNA de cepas e isolados de *T. cruzi*.

Para todas as técnicas de extração executadas, a quantidade de DNA, razão e sua pureza foram determinadas através de espectrofotômetro (NanoDrop Lite-Thermo Scientific).

4.6.3 PCR S35/36

Para avaliação da presença de DNA do parasito em 236 amostras sanguíneas de pacientes e controles, bem como em 187 isolados de *T. cruzi*, foi realizado ensaio com um par de oligonucleotídeos iniciadores designados S35 e S36 específicos para *T. cruzi*, que amplificam um fragmento de 330 pares de bases de DNA da região variável do minicírculo do cinetoplasto (kDNA), segundo Ávila et al. (1991) e de Freitas et al. (2011) com algumas modificações e volume final de 25 µL. Segue a sequência dos iniciadores:

S35 – 5' – AAA TAA TGT ACG GG(T/G) GAG ATG CAT GA – 3'

S36 – 5' – GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA – 3'

A reação foi feita em duplicata e, como controle para verificar a presença de inibidores na amostra de DNA extraída, numa das réplicas foram acrescentados 2×10^{-15} de DNA de *T. cruzi* da cepa Y. Os resultados da reação só foram considerados ao se observar amplificação do produto específico no teste de inibição.

4.6.4 Caracterização Molecular Direta de *T. cruzi* em amostras de DNA de Paciente

A técnica LSSP-PCR (“*Low Stringency Single Specific Primer- PCR*”), possui alto poder discriminatório para caracterizar populações de *T. cruzi* na presença de grande quantidade de DNA humano, ou seja, torna possível a caracterização molecular do parasito diretamente da amostra de DNA extraída do sangue.

4.6.4.1 LSSP-PCR

Neste ensaio foram analisadas 236 amostras de DNA de pacientes e 187 amostras de DNA de isolados de *T. cruzi* dos 106 pacientes, e 2 cepas de referência: Y (TcII) e Tulahuen (TcI). Além disso, para uma análise comparativa do perfil genético do parasito, entre amostras de sangue e isolados do mesmo paciente, coletadas no mesmo dia, ou seja, amostras “pareadas”, analisamos 170 amostras (85 de sangue e 85 de isolados) de 85 pacientes.

Para este ensaio, utilizou-se como alvo a região variável do DNA minicírculo no cinetoplasto de *T. cruzi* (kDNA), que amplifica um fragmento de 330pb. Conforme descrito por Brito et al. (2008) com modificações, o ensaio foi executado em duas etapas:

1ª Após amplificação de DNA com os iniciadores S35/36, o produto amplificado de 330pb foi recuperado e purificado do gel de agarose utilizando o kit “*GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification*” (GE Health Care Life Sciences, UK) seguindo as instruções do fabricante.

2ª O DNA purificado foi submetido a nova amplificação utilizando apenas o iniciador S35 nas seguintes condições de PCR: desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos seguida de 40 ciclos com temperatura de desnaturação de 94° C por 1 minuto, pareamento 30° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto e por fim, extensão final a 72° C por 10 minutos. Nessas condições, o oligonucleotídeo S35, hibridiza especificamente na sua região complementar, produzindo um conjunto heterogêneo de produtos de reações que constituem um único “perfil de assinatura gênica” (perfil de banda), uma vez que a região alvo do kDNA é altamente variável (Segatto et al., 2013).

Para assegurar a reprodutibilidade dos resultados obtidos por esse ensaio, as reações foram repetidas pelo menos duas vezes em tempos distintos.

4.6.4.2 Análise de Agrupamento

Para a construção de uma árvore de agrupamentos ou dendrograma, avaliando o perfil de banda de *T. cruzi* verificado por LSSP-PCR em amostras de DNA pareadas (sangue e isolado de *T. cruzi*) de mesmo paciente, com mesma data de coleta, foram selecionadas 170 amostras de 85 pacientes dos grupos: agudo (AG): N=9, crônico (CR): N=22, crônico imunodeprimidos (CRI): N=8, coinfectado com HIV/*T. cruzi* (CO): N=18, coinfectado com HIV/*T. cruzi* e Reativado (CO/RE): N=6, transplantado (TX) N=20: cardíaco (TXC) N=11, hepático (TXH) N=2, medula óssea (TXMO) N=2, renal (TXR) N=5 e por fim transplantado reativado (TX/RE) N=2: cardíaco (TXC/RE) N=1 e renal (TXR/RE) N=1. É importante salientar que, dos 85 pacientes analisados, 38 possuem mais de 1 amostra de sangue e/ou isolado de *T. cruzi*, portanto para o dendrograma, consideramos apenas a primeira amostra de sangue pareada com a mesma data do isolado.

O perfil de banda encontrado em cada uma das 170 amostras foi inicialmente analisado no programa Image Lab™ versão 5.2.1 (Bio-Rad) para determinar o número e tamanho da banda em pares de bases. Bandas claras ou intensas e acima de 330 pb não foram consideradas. Após essa etapa, o dendrograma foi construído no programa “GelWorks 1D Advanced” versão 4.01 e “GelWorks 1D Database” versão 1.12 (UVP Bioimaging Systems, Upland, CA) utilizando o método de agrupamento algoritmo “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” (UPGMA) e coeficiente de similaridade de Pearson.

O dendrograma também foi realizado em amostras de sangue e isolados não pareados de 6 pacientes. Esses pacientes, possuem variáveis a serem consideradas nos perfis eletroforéticos verificados por LSSP-PCR, como por exemplo, amostras provenientes de diferentes sítios biológicos (sangue e LCR), amostras pré e pós tratamento antiparasitário e pré e pós transplante de órgão.

4.6.5 Caracterização Molecular de Isolados de *T. cruzi*

Em todos os ensaios de caracterização, foram analisadas 187 amostras de isolados de *T. cruzi* dos 106 pacientes com doença de Chagas, além de 2 cepas de referência: Y (TcII) e Tulahuen (TcI).

4.6.5.1 Amplificação da Sequência do Gene ND7 de *T. cruzi*

Para a amplificação do gene da subunidade 7 da NADH desidrogenase (ND7) localizado no maxicirculo do cinetoplasto (kDNA) do parasito, foram utilizados os iniciadores MAXI 1 e MAXI 2, descritos previamente por Baptista et al. (2006). Os ciclos consistiram de desnaturação inicial por 2 minutos a 93°C, seguida por desnaturação a 93 °C por 30 segundos, pareamento a 60° C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, repetidos 30 vezes e por fim uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Ressalta-se o emprego de dois controles negativos: um da sala de preparo dos reagentes da mistura reativa de PCR e outro da sala de aplicação do DNA, além disso, para o controle positivo da reação foram utilizados 5×10^{-10} µg/µL de DNA da cepa Y como referência, que apresentou um padrão de banda de aproximadamente 400 pares de bases.

4.6.5.2 Tipagem Molecular Tradicional de Isolados de *T. cruzi*

4.6.5.2.1 Amplificação da Região Intergênica do Gene de Mini-exon (SL)

Para a reação de PCR na região intergênica do gene de mini-exon ou “*spliced-leader*” (SL) foram utilizados três iniciadores: TC, TC1 e TC2, como descrito previamente por Souto *et al.*, 1996. Os ciclos consistiram de desnaturação inicial de 1 minuto a 94 °C; 27 ciclos de 94 °C por 30 segundos, pareamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; extensão final a 72 °C por 10 minutos.

4.6.5.2.2 Amplificação do Domínio Divergente do gene 24Sa rDNA (LSU rDNA)

Neste ensaio, para amplificação do domínio divergente do gene 24Sa rDNA da subunidade maior do DNA ribossomal (LSU rDNA), foram utilizados os iniciadores D71 e D72 como em procedimento descrito previamente por Souto et al. (1993). Os ciclos consistiram de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, pareamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, repetidos 30 vezes.

4.6.5.2.3 Análise do Gene da Proteína de Choque Térmico 60 por PCR-RFLP

A técnica de PCR-RFLP (*“Restriction Fragment Length Polymorfism”*) foi utilizada para amplificação da sequência do gene da proteína de choque térmico 60 (*“Heat Shock Protein 60- HSP60”*) de *T. cruzi* com os iniciadores HSP60_for e HSP60_rev descritos por Sturm et al. (2003) seguida de clivagem com a enzima de restrição *EcoRV*, conforme protocolo descrito por Lewis et al. (2009) com algumas modificações. As condições de PCR consistiram de desnaturação inicial por 2 minutos a 94 °C; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, pareamento a 60 °C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para a digestão da enzima de restrição, 10 µL do produto de PCR foram digeridos numa reação contendo 1U/ µL da enzima *FastDigest EcoRV* de acordo com fabricante (*“Thermo Scientific”*). A separação dos fragmentos foi visualizada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

4.6.5.2.4 Análise do Gene da Enzima Glucose-6-fosfato isomerase por PCR-RFLP

Para amplificação da sequência do gene da enzima glucose-6-fosfato isomerase (GPI) de *T. cruzi* por PCR-RFLP, foram utilizados os iniciadores GPI_for e GPI_rev descritos por Gaunt et al. (2003) seguida de clivagem com a enzima de restrição *HhaI*, conforme protocolo descrito por Lewis et al. (2009) com algumas modificações. As condições de PCR consistiram de desnaturação inicial por 2 minutos a 94 °C; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, pareamento a 60 °C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para a digestão da enzima de restrição, 10 µL do produto de PCR foram digeridos numa reação contendo 1U/ µL da enzima *FastDigest HhaI* de acordo com fabricante (Thermo Scientific). A separação dos fragmentos foi visualizada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

4.6.5.2.5 Classificação de Isolados de *T. cruzi* em DTU

No presente estudo, utilizamos as seguintes abordagens para a classificação dos isolados de *T. cruzi* em DTU (*Discrete Typing Unit*) de TcI –VI conforme

consenso proposto por Zingales et al. (2009) e revisado por Zingales et al. (2012) representada na **Figura 2** e modificada de Lewis et al. (2009):

Figura 2- Abordagem para classificação de Isolados de *T. cruzi* em DTU TcI–VI

Em nossa casuística, somente isolados de *T. cruzi* DTU TcI, II, V e VI, destacados em cinza na figura 2, foram detectados.

4.6.6 Análise dos Produtos Amplificados

Os produtos obtidos após amplificação foram revelados em gel de agarose a 1,6% a 3% (TAE 1x), dependendo do tamanho do produto amplificado, corado com brometo de etídio e registrados pelo aparelho de fotodocumentação Gel Doc™ XR+ System (Bio Rad).

A análise dos produtos amplificados por LSSP-PCR, foi sistematicamente padronizada: gel de agarose 1,6%, 6 Volts/cm e o tempo total de corrida da eletroforese de 45 minutos.

4.6.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no programa SPSS Statistics versão 20.0, considerando apenas 1 amostra por paciente.

Os grupos de pacientes denominados CR (crônicos), CO (coinfectados HIV/*T. cruzi*), CO/RE (coinfectados HIV/*T. cruzi* reativados), TX (transplantados) e TX/RE (transplantados com reativação) foram comparados entre si. A análise realizada através de Teste Qui Quadrado ou Teste Exato de Fisher foi considerada estatisticamente significativa, quando $P < 0,05$. As análises foram feitas considerando as seguintes variáveis:

- Grupo, idade e sexo;
- Naturalidade (Local de Nascimento/ origem);
- Forma clínica da doença de Chagas;
- Perfil das sequências dos genes: SL (mini-exon), 24Sα rDNA (LSU rDNA), HSP60, GPI e ND7 em isolados de *T. cruzi*.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS, SUJEITOS DE PESQUISA E FLUXO DE ANÁLISE

Visando um melhor entendimento dos resultados e análises apresentados no presente estudo, na **Figura 3** está representado o fluxo dos processos realizados desde a coleta da amostra, técnicas e métodos empregados até as análises finais. Através desse fluxo, podemos observar de maneira geral, a sequência de análises utilizadas para a caracterização de *T. cruzi* diretamente de amostras de DNA de paciente, começando pela reação de PCR S35/36 e a caracterização tradicional dos isolados de *T. cruzi* para classificação em *Discrete Typing Units* (DTUs) TcI-VI.

Legenda:

A) N° de Sujeitos/N° Total de Amostras;

B) N° de Amostras Sanguíneas/N° de Isolados de *T. cruzi*;

*Realizado dendrograma em algumas amostras.

Figura 3 - Distribuição das amostras, fluxo de processos, técnicas e análises empregadas

5.2 DADOS DEMOGRÁFICOS DOS SUJEITOS DE PESQUISA

Foram incluídos 106 pacientes com doença de Chagas e 75 controles sadios, no período de 1996 a 2014. Entre os pacientes, foram analisadas 236 amostras de sangue e 187 amostras de formas epimastigotas de *T. cruzi* (isolados) provenientes dos exames de hemocultura e/ou xenodiagnóstico. Além disso, 236 amostras de sangue de controles sadios (sem doença) foram utilizadas como controles de extração de DNA e em reações de PCR S35/36.

Na **Tabela 1** foram descritos dados demográficos dos 106 pacientes e 75 controles. Os sujeitos foram distribuídos segundos os grupos: agudo (AG), crônico (CR), crônico com imunodepressão (CRI), coinfectados HIV/*T. cruzi* (CO) e com reativação da doença (CO/RE), submetidos a transplante órgãos (TX) e com reativação (TX/RE) e controles sadios (CS).

Tabela 1- Dados demográficos de 106 pacientes com doença de Chagas e 75 controles sem doença.

Parâmetros		Grupos							
		AG	CR	CRI	CO	CO/RE	TX ^a	TX/RE ^a	CS ^a
		N=9	N=27	N=15	N=27	N=6	N=20	N=2	N=75
Sexo	F	3 (1,7)	14 (7,7)	6 (3,3)	13 (7,2)	2 (1,1)	6 (3,3)	1 (0,6)	35 (19,3)
N (%)	M	6 (3,3)	13 (7,2)	9 (5)	14 (7,7)	4 (2,2)	14 (7,7)	1 (0,6)	40 (22,1)
	Média (DP)	37 (24)	47 (12)	53 (11)	47 (12)	35 (6)	51 (12)	36 (0)	32 (11)
Idade	Mediana	32	51	54	44	33	50	36	28
(anos)	Máximo	79	66	68	73	45	74	36	74
	Mínimo	13	20	32	28	28	28	36	18

a- Grupos: (TX) composto por 11 transplantados do coração (TXC), 2 de fígado (TXH), 2 de medula óssea (TXMO), 5 de rim (TXR); TX/RE: Transplantados com reativação: 1 de coração (TXC/RE) e 1 de rim (TXR/RE); (CS) controles sadios.

De forma geral, nota-se um leve predomínio do sexo masculino (55,8%) na população estudada. Em relação à idade, observa-se uma média total de 41 anos, idade máxima de 79 e mínima de 13 anos, sendo os pacientes da forma aguda e aqueles com reativação (quer por transplante ou co-infecção HIV/*T. cruzi*) com faixa etária média entre 35-37 anos e os restantes entre 47-53 anos.

5.3 FORMA CLÍNICA DA DOENÇA DE CHAGAS

A distribuição das formas clínicas da doença em relação aos seis grupos de pacientes está representada na **Tabela 2**.

Tabela 2- Distribuição de 97 pacientes com doença de Chagas em relação à forma clínica.

Parâmetros		Grupos						Total N=97
		CR	CRI	CO	CO/RE	TX ^a	TX/RE ^a	
		N=27	N=15	N=27	N=6	N=20	N=2	
Forma Clínica da doença de Chagas	N (%)							
	CA ^b	16 (16,5)	6 (6,2)	7 (7,2)	2 (2,1)	14 (14,4)	2 (2,1)	47 (48,5)
	CAT ^b	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	3 (3,1)	0 (0)	4 (4,1)
	CA/DIG ^b	2 (2,1)	1 (1,0)	5 (5,2)	2 (2,1)	2 (2,1)	0 (0)	12 (12,4)
	CAT/DIG ^b	0 (0)	0 (0)	1 (1,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,0)
	DIG ^b	2 (2,1)	2 (2,1)	3 (3,1)	1 (1,0)	1 (1,0)	0 (0)	9 (9,3)
	IND ^b	6 (6,2)	5 (5,2)	10 (10,3)	1 (1,0)	0 (0)	0 (0)	22 (22,7)
	SD ^b	1 (1,0)	1 (1,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2,1)
Total		27 (27,8)	15 (15,5)	27 (27,8)	6 (6,2)	20 (20,6)	2 (2,1)	97 (100)

a- Grupos: (TX) composto por 11 transplantados do coração (TXC), 2 de fígado (TXH), 2 de medula óssea (TXMO), 5 de rim (TXR); TX/RE: Transplantados com reativação: 1 de coração (TXC/RE) e 1 de rim (TXR/RE); **b-** Formas clínicas: (CA) cardíaca, (CAT) cardíaca atípica, (CA/DIG) cardíaca e digestiva, (CAT/DIG) cardíaca atípica e digestiva, (DIG) digestiva, (IND) indeterminada, (SD) dois pacientes sem a determinação da forma clínica por falta de informações no prontuário e outro por perda de seguimento clínico.

Dos cento e seis pacientes chagásicos estudados, nove apresentavam doença de Chagas aguda (AG), e não foram incluídos nesta tabela.

Entre os 97 pacientes classificados quanto à forma clínica da doença, dos grupos crônico (CR), crônico com imunodepressão (CRI), coinfectados com HIV/*T. cruzi* (CO) e reativação (CO/RE), transplantados (TX) e reativados (TX/RE), nota-se um predomínio da forma cardíaca (CA) com 48,5% dos casos enquanto que a forma cardíaca atípica com manifestação digestiva (CAT/DIG) se encontra em menor porcentagem 1%. Salienta-se que a forma clínica apresentada entre os pacientes, se refere ao momento em que a primeira coleta de sangue foi realizada.

5.4 NATURALIDADE DOS PACIENTES

A distribuição dos 106 pacientes com doença de Chagas pertencentes aos sete grupos definidos (AG, CR, CRI, CO, CO/RE, TX e TX/RE) em relação à naturalidade está representada na **Tabela 3**.

Tabela 3- Distribuição de 106 pacientes com doença de Chagas em relação à naturalidade.

Parâmetros		Grupos						
		AG	CR	CRI	CO	CO/RE	TX ^a	TX/RE ^a
		N=9	N=27	N=15	N=27	N=6	N=20	N=2
N (%)	Centro-oeste	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,9)	0 (0)
	Nordeste	0 (0)	9 (8,5)	6 (5,7)	15 (14,2)	4 (3,8)	9 (8,5)	0 (0)
	Norte	8 (7,5)	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Sudeste	1 (0,9)	14 (13,2)	8 (7,5)	10 (9,4)	1 (0,9)	9 (8,5)	2 (1,9)
	Sul	0 (0)	1 (0,9)	0 (0)	2 (1,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0)
	Bolívia	0 (0)	2 (1,9)	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Total	9 (8,5)	27 (25,5)	15 (14,2)	27 (25,5)	6 (5,7)	20 (18,9)	2 (1,9)

a- Grupos: (TX) composto por 11 transplantados do coração (TXC), 2 de fígado (TXH), 2 de medula óssea (TXMO), 5 de rim (TXR); TX/RE: Transplantados com reativação: 1 de coração (TXC/RE) e 1 de rim (TXR/RE).

De acordo com a naturalidade (local de nascimento) e provável local de aquisição da doença de Chagas, pelo questionamento epidemiológico, nota-se que grande parte dos pacientes é oriunda do nordeste (40,6%) e sudeste (42,5%) do Brasil.

5.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *T. CRUZI* POR LSSP-PCR

No intuito de estabelecer um melhor método discriminatório para avaliar o perfil genético de amostras de DNA de *T. cruzi*, desta vez, diretamente extraídas de sangue total dos pacientes, utilizamos para este ensaio 236 amostras de DNA de pacientes extraídas diretamente do sangue e para uma análise comparativa de resultados, amostras de DNA de 187 isolados de *T. cruzi*

5.5.1 LSSP-PCR

Como etapa inicial, a PCR convencional realizada com os iniciadores S35/S36 foi positiva para todas as amostras sanguíneas e isolados de *T. cruzi* dos 106 pacientes com doença de Chagas dos grupos agudos (AG), crônicos (CR), crônicos com imunodepressão (CRI), coinfectados HIV/*T. cruzi* (CO) e reativação (CO/RE), transplantados (TX), transplantados com reativação (TX/RE) e negativa em amostras de 75 controles sadios (CS). Na etapa seguinte, utilizando o produto purificado de 330pb, foi realizado o ensaio de LSSP-PCR. Todas as amostras foram positivas para este ensaio, revelando diferentes perfis de bandas tanto em amostras de DNA extraídas de sangue quanto isolado de *T. cruzi* de mesmo paciente.

Para evidenciarmos tais dados, por LSSP-PCR, trabalhamos com amostras de DNA extraído de sangue e DNA extraído de isolado de *T. cruzi* do mesmo paciente e que tinham a mesma data de coleta, denominando-as de amostras “pareadas” (170 amostras de 85 pacientes) e amostras de sangue e isolados que não tinham esse critério, denominamos de amostras “não pareadas” (151 de sangue e 102 de isolados de 21 pacientes).

Como exemplo dos resultados do ensaio de LSSP-PCR, nos diferentes grupos de pacientes estudados, na **Figura 4**, estão representadas 12 amostras pareadas (sangue e isolado do mesmo paciente e mesma data) de 2 pacientes do grupo transplantado (TX), 1 paciente do grupo transplantado com reativação (TX/RE) e 9 pacientes pertencentes ao grupo agudo (AG).

Figura 4- LSSP-PCR em amostras de pacientes do grupo transplantado (TX), transplantado com reativação (TX/RE) e agudo (AG), em gel de agarose 1,6% corado com brometo de etídio. Parte superior do gel amostras de sangue e inferior isolados; Coluna 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de mistura reativa; 3. Cepa Y; 4. Cepa Tulahuen; 5-6. Amostras de 2 pacientes do grupo TX (todos transplantados do coração (TXC)); 7. Amostras de 1 paciente do grupo TX/RE transplantado do coração (TXC/RE); 8-16. Amostras de 9 pacientes AG.

Podemos observar entre amostras de sangue, parte superior, amostras com 1, 2 ou 3 bandas com peso molecular variando de ~130pb a 300pb e isolados dos mesmos pacientes, parte inferior, muitas amostras com 1 banda e menos com 2 e 3 bandas variando de ~150 a 250 pb. Diferenças sutis em número de banda (coluna 6, 7 e 8 superiores e 8 inferior) ou diferenças entre tamanho de banda em relação ao peso molecular (amostras da parte inferior mais próximas a marcação de 100 pb), demonstrando, portanto, maiores diferenças em tamanho e número perfis de banda nas amostras superiores provenientes de sangue. Ressaltamos que não foram consideradas bandas acima de 330 pb, uma vez que o DNA alvo purificado no ensaio de LSSP-PCR corresponde a 330 pb.

Na **Figura 5**, estão representadas amostras pareadas de 6 pacientes do grupo coinfectados com HIV/*T.cruzi* (CO) e pacientes 6 pacientes do grupo crônico (CR).

Figura 5- LSSP-PCR em amostras de pacientes do grupo coinfectado HIV/*T.cruzi* (CO) e do grupo crônico (CR), em gel de agarose 1,6% corado com brometo de etídio. Parte superior do gel amostras de sangue e inferior isolados de *T. cruzi*; Coluna 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de mistura reativa; 3.Cepa Y; 4.Cepa Tulahuen; 5-10. Amostras de 6 pacientes do grupo CO; 11-16. Amostras de 6 pacientes do grupo CR.

Nesse gel de eletroforese, pode-se notar a grande variação de perfil de bandas entre amostras provenientes de sangue, parte superior, com maior quantidade de amostras com 2 ou 3 bandas com tamanhos variando entre ~100 a 300 pb. Por outro lado, na parte inferior, em amostras de isolados, observamos menor número de bandas.

Na **Figura 6**, são apresentados 3 pacientes do grupo crônico (CR), 4 pacientes do grupo crônico com imunodepressão (CRI) e 5 pacientes do grupo (TX).

Figura 6- LSSP-PCR em amostras de pacientes do grupo crônico (CR), do grupo crônico com imunodepressão (CRI) e do grupo (TX), em gel de agarose 1,6% corado com brometo de etídio. Parte superior do gel amostras de sangue e inferior isolados de *T. cruzi*; Coluna 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de mistura reativa; 3. Cepa Y; 4. Cepa Tulahuen; 5-7. Amostras de 3 pacientes CR; 8-10. Amostras de 3 pacientes CRI; 11-12. Amostras de 2 pacientes TX, transplantados renais (TXR); 13. Amostra de 1 paciente CRI; 14-16. Amostras de 3 pacientes TX, sendo o primeiro transplantado de rim (TXR), segundo e terceiro transplantados de fígado (TXH).

Observa-se nessa figura, alta variabilidade de perfis de bandas em amostras provenientes de sangue, parte superior, com muitas amostras com 2 e 3 bandas e tamanhos variando entre ~120 a 320 pb. Por outro lado, na parte inferior com as amostras de isolados, são verificadas muitas amostras com 1 ou 2 bandas e em menor número, 3 bandas, com variação em tamanho de ~100 a 250 pb.

A **Figura 7** apresenta amostras de 6 pacientes pertencentes ao grupo coinfetados com HIV/*T. cruzi* e reativação (CO/RE).

Figura 7- LSSP-PCR em amostras de pacientes do grupo coinfetados com HIV/*T. cruzi* e reativação (CO/RE), em gel de agarose 1,6% corado com brometo de etídio. Parte superior do gel amostras de sangue e inferior isolados de *T. cruzi*; Coluna 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo de sala de mistura reativa; 3. Cepa Y; 4. Cepa Tulahuen; 5-10. Amostras de 6 pacientes CO/RE no momento da reativação da doença de Chagas; 11. Padrão de Peso Molecular gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas).

Podemos observar, assim como nos demais géis apresentados, a parte superior desse gel, amostras provenientes de sangue, com a maioria das amostras apresentando 2 bandas com tamanhos que variam de ~200 a 300 pares de bases,

enquanto que na parte inferior, em amostras de isolados, temos também a maioria apresentando 2 bandas com tamanho variando de ~150 a 250 pb, sugerindo diferenças sutis na reativação observadas no sangue e não nos isolados.

5.5.1.1 Dendrograma em Amostras Pareadas

Na tentativa de agrupar os diferentes perfis eletroforéticos encontrados nos resultados obtidos por LSSP-PCR, nos diferentes grupos de pacientes com doença de Chagas, foi realizada uma análise de agrupamento ou dendrograma.

O dendrograma foi gerado pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), representando uma amostra por paciente, segundo critérios estabelecidos na seção de materiais e métodos. Na **Figura 8** foram selecionadas 170 amostras pareadas (85 amostras sanguíneas e 85 isolados de *T. cruzi* do mesmo paciente e mesma data de coleta) de 85 pacientes dos grupos: agudo (AG): N=9, crônico (CR): N=22, crônico imunodeprimidos (CRI): N=8, coinfectado com HIV/*T. cruzi* (CO): N=18, coinfectado com HIV/*T. cruzi* e Reativado (CO/RE): N=6, transplantado (TX) N=20: cardíaco (TXC) N=11, hepático (TXH) N=2, medula óssea (TXMO) N=2, renal (TXR) N=5 e por fim transplantado reativado (TX/RE) N=2: cardíaco (TXC/RE) N=1 e renal (TXR/RE) N=1.

Pode-se observar que, os resultados obtidos por LSSP-PCR em amostras extraídas diretamente do sangue do paciente, colunas destacadas na cor azul, exibem padrões com 1 a 4 bandas, sendo 38 amostras com 1 banda, 31 amostras com 2 bandas, 15 amostras com 3 bandas e 1 amostra com 4 bandas, enquanto que nas colunas destacadas em amarelo, isolados de *T. cruzi*, exibem padrões de 1 a 3 bandas, sendo 31 amostras com banda única, 51 amostras com 2 bandas e 3 amostras com 3 bandas. Portanto, os padrões de bandas exibidos por amostras de DNA extraídas diretamente do sangue do paciente são mais exuberantes do que amostras exibidas por isolados a partir de métodos parasitológicos de enriquecimento indireto para *T. cruzi*. Além disso, cerca de 20 amostras provenientes de sangue, coluna azul, apresentaram similaridade de perfil de banda com cepa de referência Tulahuen, agrupados em único ramo. Enquanto que, nos isolados, treze isolados TcII se agruparam no ramo da cepa Y, também TcII, e quinze isolados apresentaram similaridade com a cepa Tulahuen.

No dendrograma relativo às amostras de sangue, identificam-se dois grandes ramos, um superior subdividido em três partes e um inferior em duas partes. Pode-se observar que as amostras de casos agudos distribuíram-se mais homogeneamente em dois grupos, sendo cinco no ramo superior e quatro no ramo inferior. As outras amostras de pacientes crônicos imunodeprimidos, distribuíram-se mais no ramo superior, no qual predominou a forma cardíaca e a região Nordeste. Já os pacientes crônicos sem imunossupressão, distribuíram-se em dois ramos superiores junto com os imunodeprimidos e inferior este também com predominância da forma cardíaca e procedência da região Sudeste.

A distribuição do dendrograma nos isolados repete o padrão homogêneo dos casos agudos, localizados em um ramo superior e em um ramo inferior, com relação nítida a procedência da região norte e DTU TcI. Como foi possível analisar o perfil do gene ND7 e a identificação em DTU nesses isolados, observa-se a concentração de casos crônicos em um dos ramos superiores, juntamente aos pacientes imunodeprimidos, com predominância da forma cardíaca e DTU TcII, origem tanto do Nordeste como Sudeste e uma distribuição similar das bandas de ~400 e ~900 bp pela sequência do gene ND7. Em ramos inferiores em que também a distribuição dos perfis ND7 foi similar, houve distribuição tanto de pacientes crônicos como

imunodeprimidos, distribuídos igualmente pelas regiões Nordeste e Sudeste e predominância de DTU TcII. Em um dos ramos inferiores houve tendência de agrupamento de pacientes transplantados da forma cardíaca, com padrões similares ao anterior, DTU e sequências do gene ND7 predominante: TcII e ~900 pb.

5.5.1.2 Dendrograma em Amostras Não Pareadas

As amostras de DNA extraídas diretamente do sangue do paciente e isolados de *T. cruzi*, que não tinham o mesmo dia de coleta, denominamos de amostras “não pareadas”, sendo elas 151 de sangue e 102 isolados de 21 pacientes.

Gerado por resultados de LSSP-PCR, seis dendrogramas, foram realizados em seis pacientes que possuíam amostras seriadas de sangue e isolados. Desta forma, foi possível analisar variáveis como: amostras pré e pós tratamento antiparasitário, amostras provenientes de distintos sítios biológicos (sangue e líquido cefalorraquidiano -LCR) e amostras pré e pós transplante de órgão.

Na **Figura 9** está representado o dendrograma realizado com 8 amostras seriadas de sangue e isolados de um paciente com co-infecção HIV/*T. cruzi* (CO), antes e após tratamento antiparasitário.

Figura 9- Dendrograma gerado por LSSP-PCR de 8 amostras (sangue e isolados) de um paciente coinfectado HIV/*T. cruzi* (CO), utilizando método UPGMA e coeficiente de Pearson; NA^a : não se aplica ao critério definido; SA^b sem amplificação da sequência do gene ND7 (Cepa Tulahuen TcI).

Podemos observar, através de LSSP-PCR, um perfil inicial com 2 bandas na amostra sanguínea no D0 (dia zero), início do tratamento antiparasitário, modificando-se um pouco após 11 meses de tratamento. Após 16 meses da terapia, podemos notar um perfil de banda única, porém diferente em tamanho molecular das demais amostras agrupadas no ramo da cepa Tulahuen.

Podemos observar também, que nos isolados, o perfil de banda verificado pelo gene ND7, de ~900 pb e tipagem molecular tradicional, DTU TcII, exibem os mesmos resultados, portanto, pelo método tradicional de tipagem não verificamos variabilidade genética.

Está representado na **Figura 10**, dendrograma com 6 amostras seriadas de um paciente com doença de Chagas coinfectado HIV/*T. cruzi* e reativado (CO/RE), que recebeu terapia antiparasitária, exibindo perfis de banda verificado por LSSP-PCR em amostras com distintos sítios biológicos como sangue e LCR, no momento da reativação, no dia 2 (D2) e dia 6 (D6) do tratamento.

Figura 10- Dendrograma gerado por LSSP-PCR de 6 amostras (sangue, LCR e isolados) de paciente com doença de Chagas coinfectado HIV/*T. cruzi* e reativação (CO/RE), utilizando método UPGMA e coeficiente Pearson; NA^a : não se aplica ao critério definido; SA^b sem amplificação da sequência do gene ND7 (Cepa Tulahuen TcI).

Observamos no dia 2 de tratamento (D2), na amostra de sangue um perfil de 2 bandas e no mesmo dia de coleta, isolado com apenas 1 banda por LSSP-PCR. No dia 6 (D6) de tratamento, temos amostras de sangue, LCR, um isolado de cultura a partir de LCR e um isolado de cultura no sangue, dessas, exibem 2 bandas idênticas amostra de sangue e isolado do sangue, enquanto que, amostra de LCR exibe banda única e o isolado a partir de LCR exibe 2 bandas. Desta forma, notam-se, pequenas diferenças de perfil de banda nos diferentes sítios biológicos, não verificado pela classificação em DTU.

Ainda analisando perfis de banda verificado por LSSP-PCR em amostras com distintos sítios biológicos como sangue e LCR, no momento da reativação, em paciente coinfestado HIV/*T.cruzi* reativado (CO/RE) no início da terapia (D0), temos a **Figura 11**.

Figura 11- Dendrograma gerado por LSSP-PCR de 4 amostras (sangue, LCR e isolados) de paciente com doença de Chagas coinfectado HIV/*T. cruzi* e reativação (CO/RE), utilizando método UPGMA e coeficiente Pearson; NA^a : não se aplica ao critério definido; SA^b sem amplificação da sequência do gene ND7 (Cepa Tulahuen TcI).

Desta vez, não foi verificada diferenças no perfil genético do parasito nas diferentes amostras desse paciente, mesmo em sítios biológicos distintos. Porém, as diferentes amostras analisadas, foram coletas no início do tratamento antiparasitário e não tiveram seguimento, pois paciente foi a óbito.

Nota-se que os resultados da tipagem (DTU TcII) também permaneceram iguais entre os isolados, mesmo em isolado a partir de cultura do LCR.

Diferentes desses resultados, a **Figura 12** representa um dendrograma de um paciente coinfestado HIV/*T.cruzi* reativado (CO/RE) durante a terapia antiparasitária, em amostras de sangue, LCR e um isolado de *T. cruzi*.

Figura 12- Dendrograma gerado por LSSP-PCR de 9 amostras (sangue, LCR e isolados) de paciente com doença de Chagas coinfectado HIV/*T. cruzi* e reativação (CO/RE), utilizando método UPGMA e coeficiente Pearson; NA^a: não se aplica ao critério definido.

De modo geral, nota-se um perfil de banda única agrupados em único ramo em amostras de LCR e um isolado, em diferentes dias de tratamento (D0, D8, D11 e D13), diferente das amostras de sangue, que apresentaram um padrão com 2 bandas, também em diferentes dias de tratamento antiparasitário, conferindo um padrão de banda com maior variabilidade genética nessas amostras. É importante ressaltar que as amostras do sangue e do LCR após 15 dias de tratamento apresentam uma banda distinta do perfil observado anteriormente, além disso, não tiveram seguimento pois paciente foi a óbito.

A **Figura 13** representa um dendrograma com amostras seriadas de sangue e isolados de um paciente chagásico do grupo transplantado renal (TXR), com amostras pré e pós-transplante de órgão e ainda antes e depois da terapia antiparasitária.

Figura 13- Dendrograma gerado por LSSP-PCR de 7 amostras (sangue e isolados) de paciente com doença de Chagas do grupo transplantado renal (TXR), utilizando método UPGMA e coeficiente Pearson; NA^a: não se aplica ao critério definido; SA^b sem amplificação da sequência do gene ND7 (Cepa Tulahuen TcI).

Pode-se observar que as amostras da Figura 13, pré transplante e pré terapia, tanto de sangue quanto de isolados, exibem perfis de bandas variados com até 4 bandas, maior variabilidade de perfil verificada por LSSP. No início e durante terapia, foram verificados padrões com apenas 2 bandas (D0 e D11), embora perfis diversificados tenham sido detectados antes do transplante e tratamento em momentos diversos (Lane 32 e 35), persiste a observação de que após o tratamento houve aparecimento de perfis pré-existentes antes do transplante (Lane 37 e 38). Além disso, destaca-se novamente, que os resultados obtidos pela tipagem molecular tradicional, DTU TcV, permaneceu semelhante nos isolados.

Por fim, na **Figura 14**, está representado o dendrograma de um paciente com doença de Chagas transplantado de medula óssea (TXMO) com maior número de amostras seriadas de sangue e isolados (23) pré e pós transplante e terapia antiparasitária.

Figura 14- Dendrograma gerado por LSSP-PCR a partir de 23 amostras (sangue e isolados) de paciente com doença de Chagas do grupo transplantado de medula óssea (TXMO), utilizando método UPGMA e coeficiente Pearson; NA^a: não se aplica ao critério definido.

Na Figura 14 nota-se que o padrão verificado por LSSP-PCR foi heterogêneo, com uma a três bandas entre as amostras. Grande parte das amostras de sangue e isolados se agruparam em único ramo, demonstrando similaridade de perfil genético, com um perfil de 2 bandas, mesmo em amostras pós transplante, pré e pós terapia, com treze e dezesseis meses após tratamento antiparasitário específico. Enfatiza-se que antes do tratamento, paciente apresentou diferentes padrões no sangue e após vários meses de tratamento com recidiva e reisolamento do parasito por hemocultura, os padrões apresentados tanto no isolado como diretamente no sangue foram coincidentes e diferentes daqueles visualizados previamente ao tratamento.

Como já demonstrado, a genotipagem tradicional em amostras de isolados do parasito, nesse caso, tipadas como DTU TcII, permaneceram idênticas ao longo do período, reforçando ainda mais que esse método não permite a detecção de possível variabilidade genética do parasito, quando as amostras são obtidas através da cultura de formas epimastigotas, provenientes de exames de hemocultura e/ou xenodiagnóstico.

5.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *T. CRUZI*

5.6.1 Amplificação do gene ND7 de *T. cruzi*

Em relação ao estudo da subunidade 7 do gene NADH desidrogenase, observa-se a distribuição das bandas de ~900 pb e ~400 pb nos diferentes grupos de pacientes com doença de Chagas na **Tabela 4**.

Tabela 4- Distribuição de 106 isolados de *T. cruzi* de 106 pacientes dos grupos CR, CRI, CO, CO/RE, TX e TX/RE em relação à amplificação da sequência do gene ND7 (pares de bases (pb)).

ND7	Grupos							Total
	AG	CR	CRI	CO	CO/RE	TX ^a	TX/RE ^a	
	N=9	N=27	N=15	N=27	N=6	N=20	N=2	
N (%)								
~400pb	0 (0)	11 (10,4)	5 (4,7)	7 (6,6)	2 (1,9)	9 (8,5)	1 (0,9)	35 (33)
~900pb	2 (1,9)	16 (15,1)	10 (9,4)	19 (17,9)	3 (2,8)	11 (10,4)	1 (0,9)	62 (58,5)
SA ^b	7 (6,6)	0 (0)	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	9 (8,5)
Total	9 (8,5)	27 (25,5)	15 (14,2)	27 (25,5)	6 (5,7)	20 (18,9)	2 (1,9)	106 (100)

a- Grupos: (TX) composto por 11 transplantados do coração (TXC), 2 de fígado (TXH), 2 de (TXH), 2 de medula óssea (TXMO), 5 de rim (TXR); TX/RE: Transplantados com reativação: 1 de coração (TXC/RE) e 1 de rim (TXR/RE);

b-SA: amostras sem amplificação de banda.

Entre os pacientes, 58,5 % apresentaram um produto de ~900pb e 33,0% produto de ~400pb. Observa-se um predomínio do produto de ~900pb no grupo CO, em relação ao grupo CR e especialmente em relação aos pacientes com reativação nos quais a distribuição é similar para ambos padrões.

Para fins estatísticos, foram desconsiderados 9 isolados sem amplificação para esse ensaio e 2 isolados dos pacientes do grupo (AG). Os grupos de pacientes foram reagrupados em dois grupos principais: sem imunodepressão (grupo crônico (CR)) e outro com imunodepressão (crônico imunodeprimido (CRI), coinfectados HIV /*T. cruzi* (CO), transplantados (TX) e por último os coinfectados HIV/*T. cruzi* reativados (CO/RE) com transplantados reativados (TX/RE), como representado na **Tabela 5**.

Tabela 5- Distribuição de 95 isolados de *T. cruzi* de 95 pacientes sem e com imunodepressão e reativação em relação à amplificação da sequência do gene ND7 (pares de bases (pb)).

ND7	Grupos		Total N=95
	Sem imunodepressão	Com imunodepressão e Reativação	
	CR N=27	CRI+CO+TX+CO/RE+TX/RE N=68	
N (%)			
~400pb	11 (11,6)	24 (25,3)	35 (36,8)
~900pb	16 (16,8)	44 (46,3)	60 (63,2)
Total	27 (28,4)	68 (71,6)	95 (100,0)

Dessa maneira, com o ajuste de grupos, não foi observada diferença estatisticamente significante (Teste Exato de Fisher $P=0,643$), porém novamente um aparente predomínio da banda de ~900 bp no grupo imunodeprimido com reativação.

Nove isolados de nove pacientes, previamente tipados, pertencentes ao tipo DTU TcI, não apresentaram amplificação neste ensaio, bem como a cepa de referência Tulahuen (também TcI), usada como controle positivo de reação em todos os ensaios. Acreditamos que o gene ND7 pode apresentar deleção em cepas e isolados DTU TcI, porém essa hipótese só poderia ser confirmada através do sequenciamento dessas amostras.

Ressaltamos que todos os 187 isolados dos 106 pacientes foram analisados e, entre isolados obtidos de um mesmo paciente em vários momentos e/ou de sítios diferentes (sangue e LCR), não apresentaram diferença de perfil de banda entre si.

5.6.1.1 Associação do gene ND7 e a Naturalidade

Na **Tabela 6** está representada a distribuição geográfica dos isolados de *T. cruzi* de 97 pacientes com doença de Chagas de acordo com a naturalidade em relação aos produtos amplificados pela sequência do gene ND7 (PCR-ND7).

Tabela 6- Distribuição de 97 isolados de 97 pacientes com doença de Chagas em relação à PCR-ND7 e naturalidade, considerando “Regiões 1 e 2”.

Naturalidade	ND7 (pb)		Total
	~ 400	~ 900	
	N=35	N=62	N=97
N (%)			
Região 1 ^a	8 (8,2)	39 (40,2)	47 (48,5)
Região 2 ^a	27 (27,8)	23 (23,7)	50 (51,5)
Total	35 (36,1)	62 (63,9)	97 (100)

^a-Região 1: norte, nordeste, centro-oeste brasileiro e Bolívia; Região 2: sudeste e sul brasileiro.

Para fins de análise estatística, a variável naturalidade foi reagrupada em Região 1: constituída pelas regiões geográficas brasileiras norte, nordeste, centro-oeste e o país Bolívia e a Região 2: sudeste e sul brasileiro. A análise estatística revelou pelo teste de Qui-quadrado diferença estatisticamente significativa (valor Qui-quadrado=14,354; graus de liberdade (df=1); $P<0,001$).

Observou-se que o padrão de banda de aproximadamente de 900 bp foi predominante na região 1 em 83,0% das amostras e o de 400pb foi encontrado na Região 2 em 54,0% das amostras.

5.6.1.2 Associação do gene ND7 e a Forma Clínica

A **Tabela 7** representa a relação entre a PCR-ND7 e a forma clínica de 93 isolados de 93 pacientes. Para essa análise, foram desconsideradas todos os 9 isolados de 9 pacientes TcI (não amplificaram para PCR-ND7), 2 isolados que apresentam doença de Chagas aguda (não se aplica relação com forma clínica) e 2 isolados sem dados definidos quanto à forma clínica (falta de informações no prontuário e perda do seguimento clínico do paciente). Além disso, as formas clínicas foram reagrupadas em três grupos: 1º forma cardíaca (CA) com cardíaca atípica (CAT), 2º forma cardíaca/digestiva (CA/DIG) com forma cardíaca atípica/digestiva (CAT/DIG) e digestiva (DIG) e 3º forma indeterminada (IND).

Tabela 7- Distribuição de 93 pacientes com doença de Chagas em relação à PCR-ND7 e formas clínicas.

ND7 (pb)	Formas Clínicas			Total
	CA+CAT ^a	CA/DIG+CAT/DIG+DIG ^a	IND ^a	
	N=50	N=21	N=22	N=93
N (%)				
~400pb	23 (24,7)	4 (4,3)	7 (7,5)	34 (36,6)
~900pb	27 (29,0)	17 (18,3)	15 (16,1)	59 (63,4)
Total	50 (53,8)	21 (22,6)	22 (23,7)	93 (100,0)

a-1ª coluna: forma cardíaca (CA) com cardíaca atípica (CAT), **2ª** forma cardíaca/digestiva (CA/DIG) com forma cardíaca atípica/digestiva (CAT/DIG) e digestiva (DIG) e **3ª** forma indeterminada (IND).

Observa-se que perfil de ~900pb é predominante em relação à banda de ~400 bp da sequência estudada do gene ND7 em todos os grupos, sendo mais marcante nos grupos com forma digestiva (com ou sem cardiopatia) e forma indeterminada. A análise estatística não revelou diferença estatisticamente significativa (valor Qui-quadrado=4,911; graus de liberdade (df=2); $P=0,086$).

A **Figura 15** exemplifica os produtos amplificados na PCR-ND7 de pacientes com doença de Chagas crônica (CR).

Figura 15- Eletroforese da PCR-ND7 em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, de pacientes com doença de Chagas crônica (CR). Colunas: 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de mistura reativa; 3. Cepa Y 5×10^{-10} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 4-9. Isolados de 6 pacientes CR com a forma clínica cardíaca; 10-11. Isolados de 2 pacientes crônicos com a forma cardíaca/digestiva; 12. Isolado de 1 paciente crônico com a forma digestiva; 13-14. Isolados de 2 pacientes crônicos com a forma indeterminada da doença de Chagas.

Nas colunas 4, 5, 6, 7, 8 e 9 estão representadas amostras de 6 pacientes com a forma clínica cardíaca da doença de Chagas; nas colunas 10 e 11, pacientes com a forma cardíaca/digestiva, na coluna 12, paciente com a forma digestiva e nas colunas 13 e 14 pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas.

Os resultados relativos à PCR-ND7 no grupo coinfestado HIV/*T. cruzi* (CO) sem reativação da doença estão representados na **Figura 16**.

Figura 16- Eletroforese da PCR-ND7 em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, de pacientes coinfestados HIV/ *T. cruzi* sem reativação (CO). Colunas: 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de aplicação de DNA; 3. $2 \times 10^{-10} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA da cepa Y; 4-5. Isolados de 2 pacientes com a forma clínica cardíaca; 6-9. Isolados de 4 pacientes com a forma cardíaca/digestiva; 10. Isolados de 1 paciente com a forma digestiva; 11-14. Isolados de 4 pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas.

Nas colunas 4 e 5 estão representadas amostras de 2 pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas, nas colunas 6, 7, 8 e 9, quatro pacientes com a forma cardíaca/ digestiva, na coluna 10, paciente com a forma digestiva, colunas 11, 12, 13 e 14, quatro pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas.

Observa-se na **Figura 17**, colunas 4 e 5, destacadas pelas setas na cor verde, amostras de único paciente com co-infecção e reativação (CO/RE).

Figura 17- Eletroforese da PCR-ND7 de paciente coinfetados HIV/*T. cruzi* com reativação da doença de Chagas (CO/RE), em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Amostras: 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de mistura reativa; 3. $5 \times 10^{-10} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA da cepa Y; 4-5. Isolados de um paciente com reativação da doença no SNC e forma clínica cardíaca (setas cor verde); 6. Isolado de um paciente com reativação no sangue e forma clínica cardíaca; 7-8. Isolados de dois pacientes com reativação da doença no SNC e forma clínica cardíaca; 9. Isolado de um paciente com reativação no sangue e forma clínica indeterminada.

Na coluna 4, o DNA foi extraído de cultura epimastigota proveniente de sangue periférico e na coluna 5, o DNA foi extraído também de cultura epimastigota, porém, proveniente do LCR, ambos com a mesma data de coleta.

Ressalta-se que houve reativação da doença de Chagas no SNC, confirmada por exame parasitológico direto (exame direto) no LCR. Este paciente é natural do estado da Bahia, na região nordeste brasileira e apresentava também acometimento cardíaco. Não houve diferença no padrão de banda de aproximadamente 400 pb em distintos sítios biológicos.

Na **Figura 18**, estão representados os produtos amplificados das amostras de um paciente do grupo com co-infecção HIV/*T. cruzi* sem reativação (CO), com coletas pré e pós-terapia da doença de Chagas.

Figura 18- Eletroforese da PCR-ND7 em diferentes isolados de um mesmo paciente do grupo CO sem reativação da doença de Chagas, em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Amostras: 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de aplicação de DNA; 3. $2 \times 10^{-10} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA da cepa Y; 4-7. Isolados de um paciente pré terapia, com forma clínica cardíaca atípica (CAT) da doença de Chagas coletadas em períodos diferentes; 8. Isolado do mesmo paciente, pós terapia da doença de Chagas (seta na cor azul).

Observou-se que o padrão de banda de aproximadamente 900 pb detectado pela PCR-ND7 foi similar em amostras coletas pré-terapia (colunas 4 a 7) e pós terapia da doença (coluna 8, seta na cor azul). Destaca-se que o paciente é natural do estado de São Paulo, região sudeste, e apresentava a forma cardíaca atípica (CAT) da doença de Chagas.

5.6.2 Tipagem Molecular Tradicional de isolados de *T. cruzi*

Cento e oitenta e sete isolados *T. cruzi* de 106 pacientes, obtidas a partir de exames de hemocultura e/ou xenodiagnóstico foram analisados. Entre os pacientes, trinta e quatro apresentam mais de um isolado, porém para os resultados apresentados, foi considerado um isolado por paciente.

Salienta-se que a tipagem molecular dos 187 isolados de *T. cruzi* em DTU TcI a TcVI foi realizada através da combinação dos resultados dos quatro ensaios moleculares demonstrados por PCR-SL (mini-exon), PCR- 24Sα rDNA (LSU rDNA), PCR-RFLP HSP60/EcoRV e PCR-RFLP GPI/*HhaI*, como apresentado na figura 2 na seção de materiais e métodos. Nenhum desses ensaios moleculares realizado isoladamente é capaz de determinar resultados suficientes para a classificação completa DTU TcI-VI.

5.6.2.1 PCR-SL (Mini-exon)

Amostras de formas epimastigotas de 106 pacientes foram tipadas pela reação de PCR na região intergênica do gene “spliced-leader” (SL) ou de mini-exon, a qual apresenta um claro dimorfismo: 300 pb ou 350 pb, como verificado na **Tabela 8**.

Tabela 8- Distribuição de 106 isolados de *T. cruzi* de 106 pacientes com doença de Chagas dos grupos: agudo (AG), crônico (CR), crônico com imunodepressão (CRI), coinfestado HIV/ *T. cruzi* (CO) e reativado (CO/RE), transplantado (TX) e reativado (TX/RE) em relação PCR da região SL (mini-exon).

PCR-SL (Mini-exon)	Grupos							Total
	AG	CR	CRI	CO	CO/RE	TX ^a	TX/RE ^a	
	N=9	N=27	N=15	N=27	N=6	N=20	N=2	
N (%)								
300 pb	1 (0,9)	27 (25,5)	15 (14,2)	26 (24,5)	5 (4,7)	20 (18,9)	2 (1,9)	96 (90,6)
350 pb	8 (7,5)	0 (0)	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	10 (9,4)
Total	9 (8,5)	27 (25,5)	15 (14,2)	27 (25,5)	6 (5,7)	20 (18,9)	2 (1,9)	106 (100)

a- Grupos: (TX) composto por 11 transplantados do coração (TXC), 2 de fígado (TXH), 2 de medula óssea (TXMO), 5 de rim (TXR); TX/RE: Transplantados com reativação: 1 de coração (TXC/RE) e 1 de rim (TXR/RE).

Observa-se predomínio de 300 pb na amostra total com 90,6%. Salienta-se também que entre isolados de um mesmo paciente e em diferentes períodos não houve diferença (34 pacientes com mais de isolado de *T. cruzi*), sendo observado o mesmo padrão de produto amplificado em todas as amostras. Destaca-se que as amostras isoladas de sítios diferentes (LCR e sangue) de um mesmo paciente (3 pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi* com reativação da doença de Chagas) não apresentaram diferenças quanto aos perfis moleculares.

Na **Figura 19**, a eletroforese em gel de agarose a 2% apresenta nove isolados de nove pacientes com co-infecção HIV/ *T. cruzi* sem reativação (CO).

Figura 19- Ensaio de PCR para a região SL (mini-exon) em amostras de epimastigotas isoladas de pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi* (CO). Amostras: 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de mistura reativa; 3. Cepa Y, 300 pb; 4. Cepa Tulahuen, 350 pb; 5-13: Isolados de 9 pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi*, 300 pb.

Observa-se que a banda de 300 pb foi prevalente nesta amostra representativa, sendo a cepa Y controle positivo de 300 pb. A cepa Tulahuen, também usada como controle positivo exemplifica o produto de 350 pb.

5.6.2.2 PCR-24S α rDNA (LSU rDNA)

Neste ensaio, foram tipadas pela PCR do gene 24S α rDNA da subunidade maior do DNA ribossomal (LSU rDNA), que apresenta produtos amplificados de 110 e 125 pb, em amostras de epimastigotas de 106 pacientes. A **Tabela 9** representa apenas um isolado por paciente.

Tabela 9- Distribuição de 106 isolados de *T. cruzi* de 106 pacientes com doença de Chagas quanto aos grupos, em relação ao padrão de banda da amplificação da sequência 24S α rDNA (LSU rDNA) de *T. cruzi*.

PCR-24S α rDNA (LSU rDNA)	Grupos							Total N=106
	AG	CR	CRI	CO	CO/RE	TX ^a	TX/RE ^a	
	N=9	N=27	N=15	N=27	N=6	N=20	N=2	
N (%)								
110 pb	7 (6,6)	2 (1,9)	1 (0,9)	2 (1,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0)	14 (13,2)
125 pb	2 (1,9)	25 (23,6)	14 (13,2)	25 (23,6)	5 (4,7)	19 (17,9)	2 (1,9)	92 (86,8)
Total	9 (8,5)	27 (25,5)	15 (14,2)	27 (25,5)	6 (5,7)	20 (18,9)	2 (1,9)	106 (100)

a-Grupos: (TX) composto por 11 transplantados do coração (TXC), 2 de fígado (TXH), 2 de medula óssea (TXMO), 5 de rim (TXR); TX/RE: Transplantados com reativação: 1 de coração (TXC/RE) e 1 de rim (TXR/RE).

Observa-se que o produto de 125 pb está em maior porcentagem total (86,8%), tendência para DTU TcII. As amostras isoladas de sítios diferentes de um mesmo paciente não apresentaram diferenças entre si, o mesmo ocorreu para os 34 pacientes que apresentavam mais de um isolado de *T. cruzi*.

A **Figura 20** representa a eletroforese em gel de agarose 3% com alguns isolados de pacientes crônicos (CR), com co-infecção HIV/ *T. cruzi* (CO) e reativação (CO/RE).

Figura 20- Ensaio de PCR para a região 24Sα rDNA, utilizando amostras de epimastigotas isoladas de pacientes com doença de Chagas crônica (CR) e com co-infecção HIV/*T. cruzi* (CO) e reativação (CO/RE). Amostras: 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Controle negativo da sala de mistura reativa; 3. Cepa Tulahuen, 110 pb; 4. Cepa Y, 125 pb; 5. Isolado de paciente com reativação no sangue: 125 pb; 6–10. Isolados de 5 pacientes com doença de Chagas crônica: isolados 6,7,8 e 10 -125 pb, isolado 9, 110 pb; 11–14. Isolados de 4 pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi*, 125 pb.

O produto observado predominantemente foi de 125 pb. A cepa Tulahuen, que foi usada como controle positivo exemplifica o produto de 110 pb.

5.6.2.3 PCR-RFLP HSP60/*EcoRV*

A **Tabela 10** representa a distribuição de 106 isolados de 106 pacientes quanto aos grupos definidos e o perfil de banda verificado pela PCR-RFLP HSP60 (sequência do gene da proteína de choque térmico de *T. cruzi*) seguida de digestão com a enzima *EcoRV*. Os tamanhos de fragmentos apresentados após reação de digestão foram: 1 banda < 500pb ou 3 bandas com fragmentos <500 pb + ≤300 pb+<200 pb.

Tabela 10- Perfil da PCR-RFLP HSP60/*EcoRV* após reação de digestão em 106 isolados de *T. cruzi* de 106 pacientes com doença de Chagas.

PCR-RFLP HSP60/ <i>EcoRV</i>	Grupos							Total N=106
	AG	CR	CRI	CO	CO/RE	TX ^a	TX/RE ^a	
	N=9	N=27	N=15	N=27	N=6	N=20	N=2	
N (%)								
1 banda (<500 pb)	8 (7,5)	23 (21,7)	14 (13,2)	25 (23,6)	5 (4,7)	19 (17,9)	2 (1,9)	96 (90,6)
3 bandas (<500 pb+ ≤300pb + <200pb)	1 (0,9)	4 (3,8)	1 (0,9)	2 (1,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0)	10 (9,4)
Total	9 (8,5)	27 (25,5)	15 (14,2)	27 (25,5)	6 (5,7)	20 (18,9)	2 (1,9)	106 (100)

a-Grupos: (TX) composto por 11 transplantados do coração (TXC), 2 de fígado (TXH), 2 de medula óssea (TXMO), 5 de rim (TXR); TX/RE:Transplantados com reativação: 1 de coração (TXC/RE) e 1 de rim (TXR/RE).

Observa-se que o fragmento único <500 pb foi predominante entre os grupos de pacientes analisados e o padrão de 3 fragmentos verificado em menor número. As amostras isoladas de sítios diferentes de um mesmo paciente não apresentaram diferenças entre si, o mesmo ocorreu para os 34 pacientes que apresentavam mais de um isolado de *T. cruzi*.

A **Figura 21** representa um gel de eletroforese em gel de agarose 3% pós reação de digestão com 8 isolados de pacientes do grupo agudo (AG), 2 do grupo crônico (CR), 2 do grupo crônico com imunodepressão (CRI) e 1 do grupo coinfectado HIV/*T. cruzi* (CO).

Figura 21- Perfil de fragmentos pós digestão da PCR-RFLP HSP60/*EcoRV* em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio, utilizando amostras de epimastigotas isoladas de pacientes com doença de Chagas aguda (AG), crônica (CR), crônica com imunodepressão (CRI) e com co-infecção HIV/*T. cruzi* (CO). Colunas: 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2-9. Isolados de 8 pacientes AG com 1 banda <500 pb; 10. Isolado de paciente CR: 1 banda <500 pb; 11-12. 2 isolados do mesmo paciente do grupo CRI: 3 bandas <500 pb + ≤ 300 pb + <200 pb; 13. Isolado de 1 paciente do grupo CO com 1 banda <500 pb; 14. Isolado de 1 paciente do grupo CR com 1 banda <500 pb; 15. Isolado de 1 paciente do grupo CRI com 1 banda <500 pb; 16. Padrão de peso molecular gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas).

Nessa figura, observa-se que a maioria das amostras analisadas exibem um fragmento de aproximadamente 500 pb após reação enzimática e duas com três fragmentos (<500 pb + ≤ 300 pb + <200).

5.6.2.4 PCR-RFLP GPI/HhaI

A **Tabela 11** representa distribuição de 106 isolados de 106 pacientes quanto aos grupos de pacientes definidos e o perfil de banda verificado pela PCR-RFLP GPI (amplificação da sequência do gene da enzima glucose-6-fosfato isomerase (GPI) de *T. cruzi*) seguida de digestão com a enzima de restrição *HhaI*. Os tamanhos de fragmentos apresentados após reação de digestão foram: 2 fragmentos ~800 pb+<500 pb ou 3 bandas com 2 fragmentos <500 pb + <300 pb ou 4 bandas com 1 fragmento de ~800 pb+ 2<500 pb+<300pb.

Tabela 11- Perfil dos produtos de PCR-RFLP GPI/*HhaI* após reação de digestão em 106 isolados de *T. cruzi* de 106 pacientes com doença de Chagas.

PCR-RFLP GPI/ <i>HhaI</i>	Grupos							Total
	AG	CR	CRI	CO	CO/RE	TX ^a	TX/RE ^a	
	N=9	N=27	N=15	N=27	N=6	N=20	N=2	
N (%)								
2 bandas (~800 pb+<500 pb)	7 (6,6)	0 (0)	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	9 (8,5)
3 bandas (2<500 pb+<300pb)	1 (0,9)	23 (21,7)	14 (13,2)	24 (22,6)	4 (3,8)	19 (17,9)	2 (1,9)	87 (82,1)
4 bandas (~800 pb+2<500 pb+ <300pb)	1 (0,9)	4 (3,8)	1 (0,9)	2 (1,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0)	10 (9,4)
Total	9 (8,5)	27 (25,5)	15 (14,2)	27 (25,5)	6 (5,7)	20 (18,9)	2 (1,9)	106 (100)

a-Grupos: (TX) composto por 11 transplantados do coração (TXC), 2 de fígado (TXH), 2 de medula óssea (TXMO), 5 de rim (TXR); TX/RE: Transplantados com reativação: 1 de coração (TXC/RE) e 1 de rim (TXR/RE).

Observa-se que o perfil genético com 3 bandas (2 fragmentos <500 pb + <300 pb) foi predominante com 82,1 % e o padrão com 2 bandas em menor número no total geral. As amostras isoladas de sítios diferentes de um mesmo paciente não apresentaram diferenças entre si, o mesmo ocorreu para os 34 pacientes que apresentavam mais de um isolado de *T. cruzi*.

A **Figura 22** representa um gel de eletroforese em gel de agarose 3% após reação de digestão com 8 isolados de pacientes do grupo agudo (AG), 2 do grupo crônico (CR), 2 do grupo crônico com imunodepressão (CRI) e 1 do grupo coinfestado HIV/*T. cruzi* (CO).

Figura 22- Perfil de fragmentos pós digestão PCR-RFLP GPI/*HhaI* em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio, utilizando amostras de epimastigotas isoladas de pacientes com doença de Chagas aguda (AG), crônica (CR), crônica com imunodepressão (CRI) e com co-infecção HIV/*T. cruzi* (CO). Colunas: 1. Padrão de Peso Molecular gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas); 2. Isolado de 1 paciente AG com 3 bandas: 2<500 pb + <300 pb; 3-9. Isolados de 7 pacientes AG com 2 bandas: ~800 pb + <500 pb; 10. Isolado de paciente CR: 3 bandas: 2<500 pb + <300 pb; 11-12. 2 isolados do mesmo paciente do grupo CRI: 4 bandas ~800 pb + 2<500 pb + <300 pb; 13. Isolado de 1 paciente do grupo CO com 3 bandas: 2<500 pb + <300 pb; 14. Isolado de 1 paciente do grupo CR com 3 bandas: 2<500 pb + <300 pb; 15. Isolado de 1 paciente do grupo CRI com 3 bandas: 2<500 pb + <300 pb; 16. Padrão de peso molecular gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas).

Observaram-se nas amostras analisadas, fragmentos pós digestão enzimática, com perfis genéticos de *T. cruzi* de duas a quatro bandas, sendo mais frequente, nesse caso, padrão com dois fragmentos.

5.6.3 Classificação de *T. cruzi* em *Discrete Typing Unit* (DTU)

A **Tabela 12** representa a distribuição geral dos isolados quanto à classificação em DTU através da combinação dos resultados dos quatro ensaios moleculares demonstrados por PCR-SL (mini-exon), PCR-24Sα rDNA (LSU rDNA), PCR-RFLP HSP60/EcoRV e PCR-RFLP GPI/*HhaI*, como apresentado na **Figura 2** em materiais e métodos. Salienta-se que a tipagem molecular por esses ensaios foi realizada para os 187 isolados de *T. cruzi* dos 106 pacientes.

Tabela 12- Distribuição de 106 isolados de 106 pacientes dos grupos: agudo (AG), crônico (CR), crônico com imunodepressão (CRI), coinfectado HIV/*T. cruzi* (CO) e reativado (CO/RE), transplantado (TX) e reativado (TX/RE) quanto à classificação dos isolados em DTU.

DTU	Grupos							Total
	AG	CR	CRI	CO	CO/RE	TX ^a	TX/RE ^a	
	N=9	N=27	N=15	N=27	N=6	N=20	N=2	
N (%)								
TcI	7 (6,6)	0 (0)	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	9 (8,5)
TcII	1 (0,9)	23 (21,7)	14 (13,2)	24 (22,6)	4 (3,8)	19 (17,9)	2 (1,9)	87 (82,1)
TcV	0 (0)	2 (1,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0)	1 (0,9)	0 (0)	5 (4,7)
TcVI	1 (0,9)	2 (1,9)	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	5 (4,7)
Total	9 (8,5)	27 (25,5)	15 (14,2)	27 (25,5)	6 (5,7)	20 (18,9)	2 (1,9)	106 (100)

a-Grupos: (TX) composto por 11 transplantados do coração (TXC), 2 de fígado (TXH), 2 de medula óssea (TXMO), 5 de rim (TXR); TX/RE: Transplantados com reativação: 1 de coração (TXC/RE) e 1 de rim (TXR/RE).

Não foram observadas diferenças entre isolados de um mesmo paciente ou de diferentes sítios de isolamento (sangue ou LCR). Pode-se notar a predominância dos isolados DTU TcII nos grupos de pacientes analisados com uma porcentagem geral de 82,1%, com exceção do grupo agudo em que 7/9 isolados são DTU TcI.

Enfatiza-se a presença de 5 isolados DTU TcV nos grupos CR, CRI, CO e TX, além de 5 isolados DTU TcVI, sendo um paciente com a forma aguda e os outros quatro, pacientes crônicos com ou sem imunossupressão.

A **Tabela 13** representa a distribuição de 106 isolados quanto à classificação em DTU em relação à naturalidade (origem) dos pacientes com doença de Chagas.

Tabela 13- Distribuição de 106 isolados de 106 pacientes com doença de Chagas segundo a classificação em DTU e naturalidade.

Naturalidade	DTU				Total
	TcI	TcII	TcV	TcVI	
	N=9	N=87	N=5	N=5	
N (%)					
Região 1 ^a	9 (8,4)	44 (41,5)	2 (1,9)	1 (1,0)	56 (52,8)
Região 2 ^a	0 (0,0)	43 (40,6)	3 (2,8)	4 (3,8)	50 (47,2)
Total	9 (8,5)	87 (82,1)	5 (4,7)	5 (4,7)	106 (100)

a.Região 1: norte, nordeste, centro-oeste brasileiro e Bolívia; Região 2: sudeste e sul brasileiro.

Observa-se que isolados DTU TcII estão concentrados principalmente nas nordeste e sudeste, revelando diferença estatisticamente significativa com valor de Qui-quadrado=10,706; graus de liberdade (df=3); $P=0,013$.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, 236 amostras sanguíneas e 187 isolados de *T. cruzi* de 106 pacientes com doença de Chagas aguda, crônica e com imunodepressão (co-infecção HIV/ *T. cruzi* e transplantados com e sem reativação) foram estudadas, sendo analisados, pela primeira vez, por técnicas de tipagem molecular e perfis de kDNA de amostras extraídas diretamente do sangue, em comparação aos observados em isolados obtidos por métodos parasitológicos de enriquecimento através.

A inclusão de pacientes com co-infecção HIV/*T. cruzi* e submetidos a transplantes possibilitou o estudo dos pacientes que apresentaram reativação da doença de Chagas, com coletas seriadas de amostras de sangue e eventualmente de LCR. Uma possível influência da terapêutica antiparasitária no perfil genético de paciente com falha terapêutica foi também avaliada pela primeira vez por tais técnicas de maneira seriada em diferentes períodos do transplante e do tratamento.

Pôde-se demonstrar maior variabilidade genética do perfil de kDNA de *T. cruzi* de amostras extraídas diretamente do sangue, em comparação aos isolados obtidos por métodos parasitológicos indiretos, por meio da técnica de LSSP-PCR, sugerindo que durante o processo de crescimento haja seleção de subpopulações. Adicionalmente, o estudo de amostras dos mesmos sujeitos em diferentes momentos permitiu verificar presença de perfis variados mesmo antes de transplantes ou da terapêutica específica com seleção de alguns perfis após a introdução do tratamento.

Com objetivo de unificar as abordagens referentes à classificação dos isolados do *T. cruzi*, em 2009 foi reconhecida oficialmente a divisão da espécie em seis DTU's (*Discrete Typing Unit*) como proposto por Zingales et al. (2009). Entretanto, para acessar a identificação genética dos isolados de *T. cruzi* nas suas respectivas DTUs foi necessário o emprego de diferentes marcadores moleculares para realizar com confiabilidade a genotipagem. Nesse contexto, foram utilizados os marcadores propostos por Lewis et al. (2009), fundamentados em um tripé de análise de associação do perfil de bandas apresentado após a amplificação do gene 24S α

rDNA (LSU rDNA) juntamente com os perfis de fragmentos amplificados dos genes HSP60 e GPI submetidos a RFLP-PCR com enzimas de restrição específicas. No presente trabalho, além desses três marcadores, associou-se a análise do gene da região intergênica de mini-exon (SL-IR), permitindo a identificação das seis DTUs. Entre os pacientes de nossa casuística, houve predomínio de DTU TcII tanto em pacientes coinfectados HIV/*T. cruzi* quanto nos pacientes crônicos e transplantados (Tabela 12), resultados similares aos observados na literatura, afirmando que DTU TcII está mais associada à infecção humana e reservatórios naturais com distribuição geográfica entre os eixos norte e sul do Brasil (Souto et al., 1996; Fernandes et al., 1998; Zingales et al., 1998; Añez et al., 2004 e Freitas et al., 2005).

Em uma recente revisão englobando a ecoepidemiologia das diferentes DTUs de *T. cruzi*, Zingales et al. (2012) reafirmam que a DTU TcII é encontrada predominantemente nas regiões sul e central da América do Sul. Essa DTU foi encontrada tanto ao ciclo silvestre como ao doméstico da doença de Chagas (Fernandes et al., 1999; Zingales et al., 1999) e parece estar intimamente relacionada às manifestações clínicas cardíacas e digestivas (megacólon e megaesôfago) nos casos de infecção humana (Freitas et al., 2005; Yeo et al., 2005; Lages-Silva et al., 2006). No presente trabalho, dois pacientes classificados como DTU Tc I, são oriundos do nordeste brasileiro. Brito et al. (2008), também demonstraram a circulação de DTU TcI e o possível risco da transmissão da doença de Chagas no nordeste brasileiro. Além disso, no presente estudo, sete pacientes com doença de Chagas aguda, provenientes da região norte do Brasil, também foram classificados como DTU TcI, conforme descrito nas formas de transmissão oral nesta região (Valente et al., 2009). Em geral, na região da Colômbia, assim como em vários países da bacia Amazônica, ocorre o predomínio da infecção humana pelo DTU TcI e, essa linhagem, está mais relacionada com a infecção aguda assintomática e/ou com raríssimas manifestações clínicas crônicas (Miles et al., 1981; Zingales et al., 1999; Coura et al., 2002). A diferença estatisticamente significativa verificada na distribuição das DTUs, poderia ser atribuída à ocorrência de TcI nas regiões norte e nordeste e ausência nas regiões sul e sudeste.

A presença de DTU TcII, em cerca de 82,1% dos isolados da presente casuística, confirma os registros dessa DTU na doença crônica humana, porém não

era conhecida a distribuição de outras DTU em populações de pacientes imunodeprimidos. Assim, o segundo tipo encontrado com 8,5% foi a DTU TcI, detectada em sete pacientes agudos, encontrada principalmente na Amazônia e Nordeste do Brasil (Valente et al., 2009). Foi, no entanto, também registrada em pacientes crônicos imunodeprimidos (CO e CO/RE). As outras DTUs, TcV e TcVI foram observadas em 4,7% dos casos, respectivamente em pacientes dos grupos AG, CR, CO e CO/RE.

Como consequência do presente achado de DTUs diversas, circulando em nossos pacientes, embora 17,9% não representam DTU TcII, torna-se fundamental a necessidade de estabelecer em nosso meio, limiares de reatividade para análise de parasitemia por PCR quantitativa, uma vez que foram registrados na literatura limiares diferentes de reatividade conforme a DTU observada (Qvarnstrom et al., 2012).

A análise de DTUs não mostrou infecção mista em pacientes com doença de Chagas e imunodepressão, dos quais foram analisados diversos isolados de um mesmo paciente obtidos em períodos diferentes. Com efeito, em algumas amostras coletadas pré e pós-terapia de três pacientes do grupo CO/RE, e isolados de sítios biológicos diferentes (LCR e sangue) foi registrado o mesmo padrão para classificação em DTU. Por ser necessária uma maior concentração de DNA para esta análise, usualmente realizada em parasitos isolados por métodos de enriquecimento indiretos, tais exames (xenodiagnóstico e hemocultura) podem atuar como filtros biológicos selecionando populações específicas de protozoários ou o próprio sistema imune do hospedeiro pode ser responsável por esta seleção (Breniere et al., 1998; Fernandes et al., 1998). Diferentemente dos dados presentes, Burgos et al. (2005) detectaram em um paciente com aids e reativação da doença de Chagas no SNC, diferentes isolados observados no sangue e cérebro através de PCR para a sequência do mini-exon e 24Sα rDNA. Em 2008, este mesmo grupo demonstrou em outro paciente com aids e reativação da doença no SNC, uma mistura de duas populações de TcI e TcII/VI demonstrando uma predominância de TcI no LCR. Como será discutido posteriormente, apesar de não haver diferença nas DTU analisadas em amostras repetidas e de diferentes sítios, registrou-se no presente trabalho diferenças nos perfis observados por LSSP-PCR.

Em relação aos padrões de bandas observados pela PCR- ND7, os pacientes com doença de Chagas do grupo coinfestado (CO) apresentaram predomínio do produto de ~900 pb (Tabela 4), porém mesmo com o reagrupamento dos pacientes, esse predomínio, não foi estatisticamente significativo (Tabela 5). Deve-se salientar que o estudo desse gene em diferentes grupos de pacientes com e sem imunodepressão não foi descrita na literatura. Além disso, não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas, porém a similaridade da distribuição das bandas em 93 isolados de pacientes das formas cardíaca, indeterminada, digestiva/cardíaca e digestiva no presente trabalho, está de acordo com a descrição de Carranza et al. (2009) do mesmo grupo de Baptista et al. (2006), em que avaliaram 84 isolados de pacientes com as formas indeterminada e cardíaca da doença.

Em relação à associação observada entre os padrões de bandas detectados pela PCR-ND7 e a naturalidade dos pacientes, onde provavelmente adquiriram a doença de Chagas, mostrou-se diferença estatisticamente significativa, tendo sido o padrão de aproximadamente 900 pb predominante nos indivíduos das regiões norte, nordeste, centro-oeste e no país Bolívia. Essa associação não foi descrita nos trabalhos de Baptista et al. (2006) e Carranza et al. (2009), visto que os pacientes por eles avaliados eram somente do estado de Minas Gerais, Brasil. Nos pacientes provenientes das regiões sul e sudeste, houve leve predominância do padrão de aproximadamente 400 bp. Considerando amostras coletadas em diferentes períodos incluindo amostras pré e pós-terapia e diferentes sítios biológicos (sangue e LCR) do mesmo paciente, não foram observadas diferenças em relação ao gene ND7.

Por minimizar possíveis efeitos da seleção de parasitos no processo de isolamento por métodos indiretos, o ensaio de LSSP-PCR permitiu analisar amostras diretamente do sangue periférico, sem processos de enriquecimento prévio, com menor possibilidade de seleção clonal. Pôde-se demonstrar por LSSP-PCR, no presente trabalho, diferenças entre amostras de DNA extraídas diretamente de material biológico do paciente em diferentes períodos, mostrando-se uma técnica com melhor poder discriminatório do que a análise por DTU. Enfatiza-se inclusive a variabilidade de bandas em amostras analisadas antes e após a falha terapêutica,

pelo ensaio de LSSP-PCR em amostras extraídas diretamente do sangue, sugerindo seleção de subpopulações durante o tratamento.

Os resultados do ensaio de LSSP-PCR, revelaram uma alta variabilidade intraespecífica nos padrões eletroforéticos entre as amostras de sangue e de isolados de *T. cruzi*, porém sem aparente relação com as manifestações clínicas da doença, tipagem molecular, dimorfismo do gene ND7 e grupo nos quais foram classificados esses pacientes. Segundo Lages-Silva et al. (2006) a variabilidade intraespecífica pode ser devida à interação hospedeiro-parasito, dependente da pressão do sistema imune do hospedeiro. Além disso, devido a um alto número de cópias selecionáveis e altas taxas de mutações nas regiões hipervariáveis do kDNA, em função da pressão seletiva do hospedeiro, podem ocorrer perdas de cópias de kDNA transformando-se em um outro clone. Diferenças foram demonstradas nos perfis moleculares em amostras coletadas de um mesmo paciente em períodos distintos, podendo ser ocasionada pela alta taxa de mutação nas regiões hipervariáveis do kDNA de *T. cruzi* (Shapiro e Englund, 1995).

Dados evolutivos da análise por LSSP-PCR de cada paciente sugerem variações dos perfis apresentados durante o período de reativação ou recidiva da doença de Chagas. Deve ser comentado que a técnica de LSSP-PCR, por ser aplicada diretamente às amostras de pacientes (previamente à aplicação do método de enriquecimento indireto), favorece a detecção de diferentes perfis apresentados pelos pacientes em amostras de sangue em comparação com perfis apresentados por isolados do parasito. Além disso, foi capaz de mostrar variabilidade genética não detectada pela tipagem tradicional para classificação de *T. cruzi* em DTU. É importante enfatizar que, os perfis eletroforéticos verificados por LSSP-PCR, foram reproduzíveis, quando realizados em duplicata, além de exibirem os mesmos padrões nas cepas Y e Tulahuen, usadas com controles positivos de reação em todos os ensaios moleculares.

Em relação às amostras coletadas de sítios diferentes (LCR e sangue), observou-se por LSSP-PCR diferenças entre padrões eletroforéticos, como registrado por Burgos et al. (2005, 2010), Cura et al. (2012) e também demonstrado por Andrade et al. (2002) em estudo experimental.

Os grupos principais determinados pelos dendrogramas em amostras pareadas, mostram concentração dos casos agudos homogeneamente em dois grupos, relação com a região norte e DTU TcI. Não há aparentemente diferença na distribuição dos pacientes crônicos e crônicos imunodeprimidos, em geral com predominância da forma cardíaca (em maior número nesta casuística) tanto na região nordeste como sudeste, predominância de DTU TcII e padrão de ND7 tanto de bandas ~400 pb quanto ~900 pb, embora em geral o último seja mais frequente.

Os dados demonstrados pelos dendrogramas realizados em amostras de sangue e isolados de *T. cruzi*, em pacientes sob influência do tratamento etiológico da doença de Chagas, parecem indicar seleção genética do parasito em amostras pós terapia. Os perfis observados comparativamente entre isolados do parasito por métodos de enriquecimento e amostras extraídas diretamente do sangue sugerem que estudos realizados após cultivo do parasito possam refletir subpopulações já selecionadas, sugerindo que informações mais fidedignas possam advir da utilização de DNA do parasito extraído diretamente de amostras biológicas sem cultivo prévio.

Pôde-se também verificar que a técnica de LSSP PCR foi mais útil do que as análises tradicionalmente empregadas para mostrar diferenças tanto de amostras pareadas (sangue/isolados obtidos por método parasitológico indireto) como de amostras repetidamente coletadas de um mesmo paciente no mesmo sítios ou em sítios biológicos diferentes. O encontro de padrões distintos na análise por LSSP-PCR em diferentes períodos no mesmo paciente, na vigência de imunodepressão e mesmo em pacientes sem imunodepressão, reveste-se de importância pela possível influência no monitoramento de pacientes sob terapêutica e paralelamente com recidiva.

Por não necessitar de grande massa parasitária a técnica de LSSP-PCR prestou-se para analisar possíveis perfis de kDNA que ocorrem durante a terapêutica, com contribuição em pacientes que apresentaram recidiva com reaparecimento de diferentes perfis durante o tratamento. Essas informações podem ser confirmadas com seguimento de número maior de pacientes e podem ser úteis em pacientes que não respondam à terapêutica, pois por essa técnica, pode-se verificar se exibem

novos perfis genéticos de kDNA ou se permanecem como previamente ao tratamento, ajudando na decisão quanto ao manejo mais adequado do paciente.

Adicionalmente, os dados observados por LSSP-PCR, acrescentam informações adicionais não revelados pelos outros métodos utilizados na tipagem molecular tradicional, representando novos desafios para o entendimento da relação hospedeiro-parasito em pacientes com doença de Chagas sem e com imunossupressão, ao lado de fatores como nível de parasitemia e pressão seletiva de medicamentos antiparasitários e imunossupressores.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho realizado com 106 pacientes com doença de Chagas com e sem imunodepressão, empregando 423 amostras (187 isolados de *T. cruzi* e 236 amostras sanguíneas) permitiu as seguintes conclusões:

1. A análise de DTU de *T. cruzi* em 187 isolados de pacientes com doença de Chagas com e sem imunodepressão, obtidos a partir de métodos parasitológicos de enriquecimento indireto, mostrou predominância de DTU TcII, ressaltando-se a presença de TcI nos grupos AG, CO e CO/RE, de DTU TcV em CR, CRI, CO e TX e de DTU TcVI nos grupos AG, CR, CO/RE;
2. A distribuição de DTUs segundo a naturalidade (origem) dos pacientes agrupados em duas grandes regiões (Região 1: norte, nordeste, centro-oeste brasileiro e Bolívia; Região 2: sudeste e sul brasileiro) mostrou diferença estatisticamente significativa ($P=0,013$);
3. Não houve diferença entre os padrões de bandas observados para determinação das diferentes DTUs em amostras repetidas de um mesmo paciente, em diferentes períodos, no mesmo sítio ou em distintos sítios biológicos de mesmo paciente;
4. A análise da distribuição das bandas de aproximadamente 400 pb e 900 bp, segundo os diferentes grupos estudados (crônicos sem imunodepressão CR vs imunodeprimidos CRI+CO+TX+CO/RE+TX/RE) não mostrou diferença estatisticamente significativa, apesar da banda de ~900 pb ter ocorrido mais frequentemente nos grupos CO e TX;
5. Não se confirmaram registros na literatura de predominância da banda de aproximadamente 900 bp do gene ND7, em pacientes da forma cardíaca, em contraste ela foi predominante em pacientes da forma indeterminada ou forma digestiva (com ou sem cardiopatia), embora sem diferença estatisticamente significativa com as diferentes formas clínicas;

6. Em relação à sequência do gene ND7, mostrou-se que o padrão de ~900 bp foi observado em 83,0% das amostras da região 1 (norte, nordeste, centro-oeste e Bolívia) em comparação à presença da banda de aproximadamente 400 pb presente em 54,0% amostras de pacientes da região 2 (sudeste e sul do Brasil) ($P<0,001$);
7. Observou-se por LSSP-PCR maior variabilidade da sequência do kDNA de *T. cruzi* analisadas diretamente de amostras biológicas em comparação a isolados obtidos em cultura de pacientes com doença de Chagas com e sem imunodepressão, confirmado por análise de dendrograma de amostras pareadas (sangue/isolado), sugerindo que populações selecionadas sejam derivadas dos isolados em cultura;
8. Foram observados padrões polimórficos de kDNA por LSSP-PCR, em amostras repetidas de um mesmo paciente ou sítio biológico com grande variabilidade tanto no pré e no pós-transplante como antes e após terapia, sugerindo a influência do tratamento na seleção de perfis observados em pacientes com falha terapêutica. Esses dados sugerem que esta técnica seja útil no monitoramento da resposta terapêutica, particularmente mediante falha na terapia;
9. Registrou-se também por LSSP-PCR, a presença de diferentes perfis de kDNA em sítios biológicos diversos (LCR e sangue), do mesmo paciente, no mesmo período durante processo de reativação da doença de Chagas;
10. Os dados observados por LSSP-PCR acrescentam informações adicionais não revelados por tipagem molecular (DTU), representando novos desafios para o entendimento da relação hospedeiro-parasito em pacientes com doença de Chagas sem e com imunossupressão.

8 Referências

- Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, Bocchi EA, Teixeira HC, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. J Autoimmun. 2001;17(1):99-107.
- Almeida EA, Ramos Júnior AN, Correia D, Shikanai-Yasuda MA. Co-infection *Trypanosoma cruzi*/HIV: systematic review (1980-2010). Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44(6):762-70.
- Amato-Neto V, Lopes MH, De Marchi CR, Silva, MFS. Tentativa de evidenciar o *Trypanosoma cruzi* no sangue periférico de pacientes com doença de Chagas, em fase crônica por meio de quantitative buffy coat (QBC). Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31:231-3.
- Andrade LO, Machado CRS, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. Mol Biochem Parasitol. 1999; 100: 163-72.
- Andrade LO, Machado CRS, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. Mol Biochem Parasitol. 2002; 100: 269-75.
- Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). Rev Pat Trop. 1974; 3: 65-121.
- Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983; 77(6): 796-9.

- Añez N, Crisante G, da Silva FM, Rojas A, Carrasco H, Umezawa ES, Stolf AM, Ramírez JL, Teixeira MM. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop Med Int Health*. 2004; 9(12): 1319-26.
- Ávila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1991; 48:211-22.
- Baptista CS, Vêncio RZ, Abdala S, Carranza JC, Westenberger SJ, Silva MN, Pereira CAB, Galvão LMC, Gontijo ED, Chiari E, Sturm NR, Zingales B. Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of chagas disease: maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. *Mol. Biochem. Parasitol*. 2006;150: 236-48.
- Benvenuti L A, Rogério A, Sambiase N V, Fiorelli A, Higuchi M L. Polymerase chain reaction in endomyocardial biopsies for monitoring reactivation of Chagas' disease in heart transplantation: a case report and review of the literature. *Cardiovasc Pathol*. 2005; 14: 265-8.
- Bestetti RB, Cury PM, Theodoropoulos TA, Villafanha D. *Trypanosoma cruzi* myocardial infection reactivation presenting as complete atrioventricular block in a Chagas' heart transplant recipient. *Cardiovasc Pathol*. 2004; 13: 323-6.
- Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J, Bastrenta B, Yacsik N, Noireau F, Alcazar JL, Barnabe C, Wincker P, Tibayrenc M. Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. *Exp Parasitol*. 1998; 89(3):285-95.

- Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* 2000; 30(1): 35-44.
- 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. *Int J Parasitol.* 2001; 31(11): 1218-26.
- Brito CMM, Lima MM, Sarquis O, Pires MQ, Coutinho CFS, Duarte R, Pacheco RS. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* I isolated from brazilian northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer-polymerase chain reaction. *Parasitol Res.* 2008; 103: 1111-17.
- Brito CMM, Pires MQ, Pacheco RS. Chagas disease and HIV co-infection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2003; 2(1):17.
- Burgos JM, Begher S, Silva HM, Bisio M, Duffy T, Levin MJ, Macedo AM, Schijman AG. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78(2): 294-297.
- Burgos JM, Begher SB, Freitas JM, Bisio M, Duffy T, Altcheh J, Teijeiro R, Lopez Alcoba H, Deccarlani F, Freilij H, Levin MJ, Levalle J, Macedo AM, Schijman AG. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(6): 1016-8.
- Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, Cura C, Brusses B, Favaloro L, Leguizamon MS, Lucero RH, Laguens R, Levin MJ, Favaloro R, Schijman AG.. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 485–495.

- Camargo ME, Takeda GKF. Diagnóstico de Laboratório. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979; cap. 5, p.175-198.
- Carneiro M, Chiari E, Gonçalves AM, da Silva Pereira AA, Morel CM, Romanha AJ. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop.* 1990; 47(1):35-45.
- Carranza JC, Valadares HM, D'Avila DA, Baptista RP, Moreno M, Galvão LM, Chiari E, Sturm NR, Gontijo ED, Macedo AM, Zingales B. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol.* 2009; 39(9): 963-73.
- Chapman MD, Baggaley RC, Godfrey-Fausset PF, Malpas TJ, White G, Canese J, Miles MA. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *J Protozool.* 1984; 31(3):482-6.
- Chiari E, Brener Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da Doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev. Inst. Med. Trop.* 1966; 8:134-8.
- Corti M. AIDS and Chagas' disease. *AIDS Patient Care STDS.* 2000;14(11):581-8.
- Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, Gollob KJ, Dutra WO. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2009;199(3):451-4.
- Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002 Apr;18(4):171-6.
- Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenutti L, Higuchi ML, Koyama NS, Silva JS, Kalil J, Liew CC. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 2005; 167(2):305-13.

- Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 Suppl 1:252-8.
- Cura CI, Lucero RH, Bisio M, Oshiro E, Formichelli LB, Burgos JM, Lejona S, Brusés BL, Hernández DO, Severini GV, Velazquez E, Duffy T, Anchart E, Lattes R, Altcheh J, Freilij H, Diez M, Nagel C, Vigliano C, Favaloro L, Favaloro RR, Merino DE, Sosa-Estani S, Schijman AG. *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology* 2012; 139: 516–521.
- D'Ávila SC, D'Ávila AM, Pagliari C, Gonçalves VM, Duarte MI. Erythema nodoso in reactivation of Chagas' disease after cardiac transplantation. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38: 61-3.
- de Freitas VL, da Silva SC, Sartori AM, Bezerra RC, Westphalen EV, Molina TD, Teixeira AR, Ibrahim KY, Shikanai-Yasuda MA. Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4 level. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Aug;5(8):e1277.
- Degrave W, Fragoso SP, Britto C, Heurvrrswyn GZ, Kidane AB, Cardoso U, Mueller L, Simpson L, Morel CM. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1988; 27:63-70.
- Del Castillo M, Mendoza G, Oviedo J, Perez-Bianco RP, Anselmo AE, Silva M. AIDS and Chagas' disease with central nervous system tumor-like lesion. *Am J Med*. 1990; 88 (6): 693-4.
- Dias JCP, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2008; 41(2):193-196.

- Dias JCP. Doença de Chagas. In: Cimerman B, Cimerman S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2008. p.81-111.
- Dias JCP. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. Cad. Saúde Pública. 2007; 1:13-22.
- Diez M, Favaloro L, Bertolotti A, Burgos JM, Vigliano C, Lastra MP, Levin MJ, Arnedo A, Nagel C, Schijman AG, Favaloro RR. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. Am J Transplant. 2007; 7: 1633-40.
- Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. Parasitology. 1999 Feb;118 (Pt 2):161-6.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degrove W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. Am J Trop Med Hyg. 1998; 58(6): 807-11.
- Ferreira AW, Ávila SLM. Doença de Chagas. In: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes. 2ª Ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 22; p. 241-249.
- Ferreira MS, Lopes ER, Silva AM, Rocha A, Dias JCP, Luquetti, AO. Doença de Chagas. In: Veronesi R, Focaccia R. Tratado de Infectologia. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005. Cap. 93; p. 1485-1529.
- Ferreira MS, Nishioka Sde A, Silvestre MT, Borges AS, Nunes-Araújo FR, Rocha A. Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. Clin. Infect. Dis. 1997; 25(6): 1397-400.

- Fiorelli AI, Stolf NA, Honorato R, Bocchi E, Bacal F, Uip D, Strabelli T, Issa V, Amato VA, Fiorelli LR, Oliveira SA. Later evolution after cardiac transplantation in Chagas' disease. *Transplant Proc.* 2005; 37: 2793-8.
- Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol.* 2005; 35(4):411-7.
- Gallerano V, Consigli J, Pereyra S, Gómez Zanni S, Danielo C, Gallerano RH, Guidi A. Chagas' disease reactivation with skin symptoms in a patient with kidney transplant. *Int J Dermatol.* 2007; 46: 607-10.
- Garraud O, Andreu G, Elghouzzi MH, Laperche S, Lefrère JJ. Measures to prevent transfusion-associated protozoal infections in non-endemic countries. *Travel Med Infect Dis.* 2007 Mar;5(2):110-2.
- Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2010;115(1-2):22-7.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GA, Acosta N, de Arias AR, Miles MA. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature.* 2003 Feb 27;421(6926):936-9.
- International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. Recommendations from a satellite meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1999; vol.94, suppl.1, 429-432.
- Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL, Crema E, Cunha-Galvão LM, Junho Pena SD, Macedo AM, Chiari E. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(6):2167-71.

- Lages-Silva E, Ramírez LE, Silva-Vergara ML, Chiari E. Chagasic meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: diagnosis, follow-up, and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*. Clin Infect Dis. 2002; 34(1):118-23.
- Lescure FX, Canestri A, Melliez H, Jauréguiberry S, Develoux M, Dorent R, Guiard-Schmid JB, Bonnard P, Ajana F, Rolla V, Carlier Y, Gay F, Elghouzzi MH, Danis M, Pialoux G. Chagas disease, France. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 644-6.
- Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. Am J Trop Med Hyg. 2009 Dec;81(6):1041-9.
- Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brenner, Z; Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan. 2ª ed. p. 334-78. 2000.
- Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AU. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da Doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1994; 27:143-8.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(1):1-12.
- Macedo AM, Pimenta JR, Aguiar RS, Melo AI, Chiari E, Zingales B, Pena SD, Oliveira RP. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96(3):407-13.

- Marchiori PE, Alexandre PL, Britto N, Patzina RA, Fiorelli AA, Lucato LT, Rosenberg S, Pereira ALA, Stolf NG, Scaff M. Late Reactivation of Chagas' Disease Presenting in a Recipient as an Expansive Mass Lesion in the Brain after Heart Transplantation of Chagasic Myocardiopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2007; 26: 1091–6.
- Medrado-Faria MA, Shikanai-Yasuda MA, Araújo MJO, Lancarotte I, Catapano EA, Ruiz-Neto PP. Formas Clínicas da doença de Chagas na Grande São Paulo. *Arq. Bras. Cardiol*. 1982; 38(2): 99-109.
- Miles MA, Cedillos RA, Póvoa MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease?. *Lancet*. 1981;1(8234):1338-40.
- Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Tóye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978; 272 (5656):819-21.
- Miles MA, Tóye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1977; 71(3):217-25.
- Ministério da Saúde. Conselho Nacional da Saúde. Resolução Nº 347 de 13 de janeiro de 2005. Centésima Quinquagésima Reunião Ordinária. Ministério da Saúde. 2005c; Disponível em:<http://www.portalsbc.com.br/pdfs_legislacao/Resolu%C3%A7%C3%A3o%20CNS%20N%C2%BA%20347-2005.pdf> Acesso em: 01 fev. 2011.

- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico. II Reunião Anual de Avaliação do Programa de Controle da doença de Chagas. Minas Gerais: Ministério da Saúde. 2003; Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_04_ano03.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2008.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2005b; vol.38(Supl. III).
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 4. ed. ampl. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2004; p.332.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde. 6. ed. Brasília : Ministério da Saúde; 2005a; p.816.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção: *Trypanosoma cruzi*: vírus da imunodeficiência Humana/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília : Ministério da Saúde; 2007; p.52.
- Morgado MG, Barcellos C, Pina Mde F, Bastos FI. Human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome and tropical diseases: a Brazilian perspective. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000; 95(1): 145-151.
- Perez-Ramirez L, Barnabé C, Sartori AMC, Ferreira MS, Tolezano JE, Nunes EV, Burgarelli MK, Silva AC, Shikanai-Yasuda MA, Lima JN, Da-Cruz AM, Oliveira OC, Guilherme C, Bastrenta B, Tibayrenc M. Clinical analysis and parasite genetic diversity in human immunodeficiency virus/Chagas' disease coinfections in Brazil. Am J. Trop. Med. Hyg. 1999; 61(2): 198-206.

- Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(7):e1689.
- Ramos Júnior AN, Correia D, Almeida EA, Shikanai-Yasuda MA. History, current issues and future of the brazilian network for attending and studying *Trypanosoma cruzi*/HIV coinfection. J Infect Dev Ctries. 2010;4(11):682-8.
- Requena-Méndez A, Albajar-Viñas P, Angheben A, Chiodini P, Gascón J, Muñoz J; Chagas Disease COHEMI Working Group. Health policies to control Chagas disease transmission in European countries. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Oct 30;8(10):e3245
- Rodrigues DB, Correia D, Marra MD, Giraldo LE, Lages-Silva E, Silva-Vergara ML, Barata CH, Rodrigues Junior V. Cytokine serum levels in patients infected by human immunodeficiency virus with and without *Trypanosoma cruzi* coinfection. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38(6):483-7.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sartori AM, Ibrahim KY, Nunes Westphalen EV, Braz LM, Oliveira OC Jr, Gakiya E, Lopes MH, Shikanai-Yasuda MA. Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 2007; 101(1): 31-50.
- Sartori AM, Sotto MN, Braz LM, Oliveira Júnior Oda C, Patzina RA, Barone AA, Shikanai-Yasuda MA. Reactivation of Chagas disease manifested by skin lesions in a patient with AIDS. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999; 93(6): 631-2.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(1): 75-86.

- Segatto M, Rodrigues CM, Machado CR, Franco GR, Pena SD, Macedo AM. LSSP-PCR of *Trypanosoma cruzi*: how the single primer sequence affects the kDNA signature. BMC Res Notes. 2013 May 2;6:174
- Senior K. Chagas disease moving towards global elimination. Lancet Infectious Diseases. 2007; 7(9): 572.
- Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. Annu Rev Microbiol. 1995; 49:117-43.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. Clin Infect Dis. 2012 Mar;54(6):845-52.
- Silva JS, Barral-Netto M, Reed SG. Aggravation of both *Trypanosoma cruzi* and murine leukemia virus by concomitant infections. Am J Trop Med Hyg. 1993;49(5):589-97.
- Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. Annu Rev Microbiol. 1987;41:363-82.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 1996; 83: 141-152.
- Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. Mol Biochem Parasitol. 1993; 62(1):45-52.
- Stuart K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. Mol Biochem Parasitol. 1983 Oct;9(2):93-104

- Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2003 Mar;33(3):269-79.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper-JR N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 2143-7.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Stolf AM. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001 Mar;39(3):169-76.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 2000; 156(5):1805-9.
- Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvão LMC, Reis DA, Pereira MES, Simpson AJG, Tostes S, Pena SDJ. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol*. 1996; 149 (6): 2153-9.
- Valente SA, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, Barbosa César MJ, Santos MP, Miranda COS, Cuervo P, Fernandes O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103:291-297.
- Weekly epidemiological record. Relevé épidémiologique hebdomadaire. 2007; No. 28/29 82:245-60.

- Wendel S. Transfusion-transmitted Chagas' disease. *Curr Opin Hematol*. 1998; 5(6): 406-11.
- Westenberger SJ, Cerqueira GC, El-Sayed NM, Zingales B, Campbell DA, Sturm NR. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. *BMC Genomics*. 2006 Mar 22;7:60.
- Wincker P , Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 1994 Dec;51(6):7717.
- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol*. 2005 Feb;35(2):225-33.
- Zafra G, Morillo C, Martín J, González A, González CI. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes Infect*. 2007; 9(9):1049-52.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(7): 1051-4.

- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012 Mar;12(2):240-53.
- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol.* 1998;28(1):10.
- Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:159-64.

Anexo 1 -- Distribuição de Amostras (sangue e isolados de *T. cruzi*) de 106 pacientes com doença de Chagas sem e com imunodepressão

Grupo de Pacientes	Sub Grupo de Pacientes	Numeração do paciente	Tipo de amostra		Diferença de tempo entre amostras
			Isolado de <i>T.cruzi</i>	Sanguínea	
Grupo Agudo (AG) N=9		AG1	1	1	Mesma data de coleta
		AG2	1	1	Mesma data de coleta
		AG3	1	1	Mesma data de coleta
		AG4	1	1	Mesma data de coleta
		AG5	1	1	Mesma data de coleta
		AG6	1	1	Mesma data de coleta
		AG7	1	1	Mesma data de coleta
		AG8	1	1	Mesma data de coleta
		AG9	1	1	Mesma data de coleta
Grupo Crônico (CR) N=27		CR1	1	1	Mesma data de coleta
		CR2	1	1	Mesma data de coleta
		CR3	1	1	Mesma data de coleta
		CR4	1	2	4 meses, 26 dias
		CR5	1	1	Mesma data de coleta
		CR6	1	2	3 anos, 4 meses, 21 dias
		CR7	1	1	Mesma data de coleta
		CR8	1	1	Mesma data de coleta
		CR9	1	3	1 ano, 2 meses, 27 dias

	CR10	1	1	Mesma data de coleta
	CR11	1	2	8 anos, 4 meses, 1 dia
	CR12	1	1	Mesma data de coleta
	CR13	1	0	Não se aplica
	CR14	1	1	Mesma data de coleta
	CR15	1	1	Mesma data de coleta
	CR16	2	2	8 meses, 5 dias
	CR17	1	2	1 ano, 3 meses, 19 dias
	CR18	1	1	Mesma data de coleta
	CR19	2	2	6 meses, 26 dias
	CR20	1	1	Mesma data de coleta
	CR21	1	1	Mesma data de coleta
	CR22	1	1	Mesma data de coleta
	CR23	1	1	Mesma data de coleta
	CR24	1	1	Mesma data de coleta
	CR25	1	1	Mesma data de coleta
	CR26	1	0	Não se aplica
	CR27	1	1	Mesma data de coleta
Grupo Crônico com imunodepressão (CRI) N=15	CRI1	1	1	Mesma data de coleta
	CRI2	1	1	Mesma data de coleta
	CRI3	1	1	Mesma data de coleta
	CRI4	1	0	Não se aplica
	CRI5	1	1	Mesma data de coleta
	CRI6	1	1	Mesma data de coleta
	CRI7	2	3	3 anos, 4 meses

	CRI8	3	2	5 anos, 11 meses, 2 dias
	CRI9	3	2	5 meses
	CRI10	1	0	Não se aplica
	CRI11	4	4	1 ano, 5 meses, 21 dias
	CRI12	1	0	Não se aplica
	CRI13	1	0	Não se aplica
	CRI14	1	1	Mesma data de coleta
	CRI15	2	2	5 meses, 22 dias
Grupo Coinfectados HIV/ <i>T.cruzi</i> (CO) N=27	CO1	2	3	13 anos, 1 mês, 20 dias
	CO2	2	1	11 meses, 16 dias
	CO3	1	3	2 anos, 4 meses, 25 dias
	CO4	1	1	Mesma data de coleta
	CO5	1	1	Mesma data de coleta
	CO6	3	2	13 anos, 4 meses, 10 dias
	CO7	2	0	9 meses, 18 dias
	CO8	8	3	10 anos, 10 meses, 23 dias
	CO9	2	2	8 anos, 10 meses, 21 dias
	CO10	2	2	2 anos, 5 meses, 11 dias
	CO11	1	1	Mesma data de coleta
	CO12	1	0	Não se aplica
	CO13	1	1	Mesma data de coleta
	CO14	2	9	17 anos, 2 meses, 28 dias
	CO15	2	9	5 anos, 5 meses
	CO16	1	4	8 meses, 3 dias
	CO17	5	3	7 anos, 2 meses, 21 dias

		CO18	5	2	2 anos, 4 meses, 1 dia
		CO19	3	2	6 anos, 9 meses, 8 dias
		CO20	2	2	9 anos, 8 meses, 4 dias
		CO21	7	4	12 anos, 4 meses, 6 dias
		CO22	1	1	Mesma data de coleta
		CO23	7	9	10 anos, 9 dias
		CO24	4	7	7 anos, 9 meses, 2 dias
		CO25	1	10	14 anos, 2 meses, 4 dias
		CO26	1	5	4 anos, 11 meses, 23 dias
		CO27	2	1	3 anos, 6 meses, 11 dias
Grupo Coinfectados HIV/ <i>T.cruzi</i> com reativação (CO/RE) N=6		CORE1	1	5	2 anos, 3 meses, 27 dias
		CORE2	1	1	Mesma data de coleta
		CORE3	1	1	Mesma data de coleta
		CORE4	3	3	4 dias
		CORE5	2	2	Mesma data de coleta
		CORE6	1	8	15 dias
Grupo Transplantado (TX) N=20	Grupo Transplantado Cardíacos (TXC) N=11	TXC1	1	1	Mesma data de coleta
		TXC2	1	1	Mesma data de coleta
		TXC3	2	2	1 mês, 1 dia
		TXC4	1	1	Mesma data de coleta
		TXC5	1	1	Mesma data de coleta
		TXC6	3	3	1 mês, 27 dias
		TXC7	1	1	Mesma data de coleta
		TXC8	1	1	Mesma data de coleta

		TXC9	1	1	Mesma data de coleta
		TXC10	1	1	Mesma data de coleta
		TXC11	1	1	Mesma data de coleta
	Grupo Transplantado Hepático (TXH) N=2	TXH1	3	2	2 anos, 9 meses, 25 dias
		TXH2	1	1	Mesma data de coleta
	Grupo Transplantado Renal (TXR) N=5	TXR1	3	6	1 ano, 8 meses, 29 dias
		TXR2	1	1	Mesma data de coleta
		TXR3	2	2	4 meses, 11 dias
		TXR4	1	1	Mesma data de coleta
		TXR5	1	3	1 ano, 2 meses, 20 dias
	Grupo Transplantado Medula Óssea (TXMO) N=2	TXMO1	11	20	4 anos, 11 meses, 7 dias
		TXMO2	5	13	8 anos, 7 meses, 8 dias
Grupo Transplantado com reativação (TX/RE) N=2	Grupo Transplantado Cardíaco com reativação (TXC/RE) N=1	TXC/RE1	3	3	3 meses, 13 dias
	Grupo Transplantado renal com reativação (TXR/RE) N=1	TXR/RE1	1	1	Mesma data de coleta
Total Geral de Amostras			187	236	

Anexo 3 - Dendrograma gerado por LSSP-PCR de 58 amostras (sangue e isolados) de 6 pacientes com doença de Chagas dos grupos CO N=1, CO/RE N=3, TXR N=1 e TXMO N=1, utilizando método UPGMA e coeficiente de Pearson; NAa: não se aplica ao critério definido; SAb: sem amplificação da sequência do gene ND7 (Cepa Tulahuen e isolado TcI).