JAQUELINE DE JESUS PEREIRA

**Agentes infecciosos no coração de pacientes com
cardiomiopatia dilatada idiopática: possível relação
com rejeição pós-transplante cardíaco**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Jaqueline de Jesus

Agentes infecciosos no coração de pacientes com
cardiomiopatia dilatada idiopática : possível relação
com rejeição pós-transplante cardíaco / Jaqueline de
Jesus Pereira. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Maria de Lourdes Higuchi.

Descritores: 1. Cardiomiopatia dilatada
2. Transplante de coração 3. Inflamação 4. Agentes
infecciosos 5. Rejeição pós-transplante

USP/FM/DBD-478/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por estar sempre ao meu lado e me conceder saúde, sabedoria, paciência e perseverança. Por trilhar e iluminar meus caminhos e não me deixar desistir dos meus propósitos.

À profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi agradeço pela orientação, confiança, pelos conselhos, ensinamentos proporcionados ao longo dessa trajetória. Admiro a pessoa e pesquisadora que a senhora é.

À minha mãe. Obrigada por ser meu porto seguro, minha fonte inspiradora, por sempre me apoiar e acreditar na minha capacidade, por seu amor incondicional.

Aos meus avós, que contribuíram com a minha educação e cuidaram de mim, me ensinaram a ter respeito pelo próximo, a ser persistente e responsável.

A toda minha família, em especial a minha tia Ilza e meu irmão André. Agradeço pela força, pelos conselhos, carinho e companheirismo, foram indispensáveis nessa trajetória.

Ao meu namorado Leonardo pela paciência, cumplicidade, por me incentivar e me apoiar sempre, sem você tudo teria sido mais difícil.

À banca de qualificação, Prof. Dr. Félix José Alvarez Ramires, Profa. Dra. Flávia Rossi e Dr. Sandrigo Mangini. Obrigada pelas sugestões e críticas, pois melhoraram muito a qualidade do trabalho.

Aos meus professores, Michel Sant'Anna de Pinho e Diogo Correa Maldonado que me apresentaram a pesquisa e conduziram meus primeiros passos, jamais me esquecerei da amizade e apoio, sem os quais eu jamais chegaria onde estou.

As minhas amigas Joyce, Renata e Sherrira, agradeço imensamente a amizade, conselhos, broncas quando necessário, sem o amor e ajuda de vocês com certeza nada disso seria possível. Vocês são pessoas iluminadas e sempre terão um espaço especial no meu coração.

As amigas de trabalho Camila, Julliana, Marcia e Suefy. Agradeço imensamente pelos ensinamentos, pela paciência, pela indispensável ajuda e por estarem sempre dispostas a me aconselharem. Obrigada pela amizade de todas.

A toda equipe do Laboratório de Patologia, por me concederem os materiais para a realização da minha dissertação, pelo companheirismo e trabalho em equipe.

À equipe do Laboratório de Miocardiopatias, por toda ajuda, pela disponibilidade e carinho.

A CAPES e FAPESP, por acreditar no projeto e possibilitar o suporte financeiro.

Ao departamento de Fisiopatologia Experimental pela oportunidade de ser aluna da pós-graduação.

Epigrafe

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta 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 F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de figuras/tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1. <i>Cardiomiopatia Dilatada e Inflamação</i>	<i>2</i>
1.2. <i>Evidências de agentes infecciosos em doenças cardíacas</i>	<i>3</i>
2. Objetivos	7
3. Métodos	9
3.1 <i>Casuística</i>	<i>10</i>
3.2. <i>Técnica de Imunohistoquímica.....</i>	<i>11</i>
3.3. <i>Hibridação in situ (HIS)</i>	<i>13</i>
3.4. <i>Microtomia dos fragmentos para Biologia Molecular</i>	<i>14</i>
3.5. <i>Extração de DNA e padronização do PCR convencional</i>	<i>14</i>
3.6. <i>Clonagem do produto de PCR</i>	<i>16</i>
3.7. <i>Transformação por choque térmico.....</i>	<i>16</i>
3.8. <i>Extração e quantificação do DNA do plasmídeo</i>	<i>17</i>
3.8.1. <i>Quantificação absoluta das cópias de DNA de agentes infecciosos por PCR em tempo real (qRT-PCR).....</i>	<i>17</i>
3.9. <i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	<i>18</i>
3.10. <i>Análise estatística dos dados.....</i>	<i>19</i>
4. Resultados	20
4.1. <i>Estudo da inflamação por imunohistoquímica CD3.....</i>	<i>21</i>
4.2. <i>Pesquisa de microrganismos por imunohistoquímica.....</i>	<i>24</i>
4.3. <i>Pesquisa de M. pneumoniae por HIS.....</i>	<i>28</i>
4.4. <i>Pesquisa de microrganismos por PCR real time</i>	<i>28</i>

4.5. Análises de correlação.....	29
4.6. Microscopia eletrônica de transmissão	31
5. Discussão.....	32
6. Conclusão	39
7. Anexos.....	41
7.1. Dados das biópsias de segmento dos pacientes dos grupos RMP, RM e SR	42
7.2. Parecer da CaPPesq	45
8. Referências	46

Lista de figuras/tabelas

Figura 1: Sequência dos iniciadores e condições para amplificação dos genes utilizados na qRT-PCR.....	18
Figura 2: Número médio de células CD3 positivas/mm ² nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.....	21
Figura 3: Número médio de células CD20 positivas/mm ² nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.....	21
Figura 4: Número médio de células CD45 positivas/mm ² nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.....	22
Figura 5: Número médio de células CD68 positivas/mm ² nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.....	22
Figura 6: Quantificação da porcentagem de área positiva de HLA classe II nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.....	23
Figura 7: Imunomarcacão das células inflamatórias em fragmentos de miocárdio de pacientes com CMD: A- CD3, B- CD45, C- CD68 e D- HLA classe II.....	24
Figura 8: Quantificação da porcentagem de área positiva de <i>M. pneumoniae</i> , HBC, HHV6 e HCV nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.....	26
Figura 9: Quantificação da porcentagem de área positiva de <i>Borrelia burgdorferi</i> , PVB19, Enterovírus e HCS nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.....	27

Figura 10: Imunomarcção de agentes infecciosos em fragmentos de miocárdio com CMD: A- <i>M. pneumoniae</i> , B- <i>Borrelia burgdorferi</i> , C- PVB19, D- Enterovírus, E- HHV6 e F- HBC.....	28
Figura 11: Hibridação para <i>M. pneumoniae</i> em fragmento de miocárdio de caso do grupo RMP (40x). Porcentagem de área positiva para hibridação de <i>M. pneumoniae</i> nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.....	29
Figura 12: Quantificação absoluta dos genes de <i>M. pneumoniae</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> , PVB19 e HHV6, expressos em cópias/ml.....	30
Figura 13: Características morfológicas de possíveis microrganismos (setas). A- micoplasma, B- enterovírus (seta vermelha) e borrelia (seta azul), C- HHV6 e D- parvovírus. Barra de 0,5µm em A e B, barra de 0,2µm em C e D.....	32
Tabela 1: Anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica.....	13
Tabela 2: Pesquisa de agentes infecciosos por imunohistoquímica. Dados apresentados como mediana (p25, p75); Bb: <i>Borrelia burgdorferi</i> , HBC: vírus da Hepatite B Core, HBS: vírus da Hepatite B Superfície, HCV: vírus da hepatite C, HHV6: Herpes vírus 6, Enterovírus, <i>M. pneumoniae</i> : <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , PVB19: Parvovírus B19.....	25

Resumo

Pereira JJ. *Agentes infecciosos no coração de pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática: possível relação com rejeição pós-transplante cardíaco* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A cardiomiopatia dilatada (CMD) é caracterizada pela dilatação progressiva com redução da função contrátil do ventrículo esquerdo ou de ambos os ventrículos, podendo ser de origem viral e/ou imune, genética ou idiopática. Devido às inúmeras variáveis envolvidas na patogênese da CMD, atualmente não existe uma opção terapêutica definitiva para seu tratamento, sendo o transplante cardíaco o tratamento de escolha para a insuficiência cardíaca refratária. Trabalho anterior aventou a hipótese de simbiose entre microrganismos interferindo na resposta imune no tecido miocárdico. Assim, o presente estudo teve como objetivo verificar se a presença de antígenos ou DNA de agentes infecciosos associados à inflamação em corações explantados de pacientes com CMD Idiopática está relacionada com o desenvolvimento de rejeição moderada/grave no coração do doador após o transplante cardíaco. Foram estudadas amostras de miocárdio de pacientes transplantados por CMD Idiopática, agrupadas em: RMP (N = 6), rejeição moderada persistente, RM (n = 7) rejeição resolvida após pulsoterapia e SR (n = 5) sem rejeição. A inflamação foi quantificada por imunohistoquímica e os agentes infecciosos por imunohistoquímica, biologia molecular, hibridação *in situ* e microscopia eletrônica de transmissão. Houve maior número de macrófagos no grupo RMP, e mais células B e maior expressão de HLA classe II no grupo SR. A imunohistoquímica mostrou maior quantidade de *M. pneumoniae* e de HBC nos grupos RMP e RM. O grupo SR mostrou correlação positiva entre quantidade de gene Bb e antígeno de enterovírus. A biologia molecular demonstrou a presença dos genes *M. pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, HHV6 e PVB19 em todos os grupos de estudo. A microscopia eletrônica revelou a presença de estruturas compatíveis com microrganismos que apresentam características de micoplasma, borrelia, enterovírus, HHV6 e parvovírus. Agentes infecciosos podem ser o fator causal e/ou perpetuador da lesão miocárdica em pacientes com CMD idiopática, uma vez que esses achados iniciais sugerem que a presença de microrganismos em simbiose no miocárdio está associada com pior prognóstico pós-transplante.

Descritores: cardiomiopatia dilatada; transplante de coração; inflamação; agentes infecciosos; rejeição pós-transplante.

Abstract

Pereira JJ. *Infectious agents in heart of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: potential relation with rejection of cardiac transplantation* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Dilated cardiomyopathy (DCM) is characterized by progressive dilation with reduction of contractile function of the left ventricle or both ventricles, which may be viral and/or immune, genetic or idiopathic. Because of countless variables involved in the DCM, currently there is no definitive therapeutic option for its treatment, being heart transplant the treatment for choice of refractory heart failure. A previous study hypothesized that symbiosis between microorganisms may interfere in immune system in myocardial tissue. Thus, the present study had the objective to determine if presence of antigens or DNA of infectious agents associated with inflammation in explanted hearts of patients with idiopathic DCM is related to the development of moderated/severe rejection in donor's heart after cardiac transplantation. Myocardial samples from patients transplanted by Idiopathic DCM were studied, grouped in: PMR (n=6) persistent moderate rejection, MR (n=7) rejection resolved after pulse therapy and NR (n=5) no rejection, without moderate rejection, in which inflammation was quantified by immunohistochemistry and infectious agents by immunohistochemistry, molecular biology, *in situ* hybridization technique and transmission electron microscopy. There was higher amount of macrophages in PMR group, and more B cells ($p=0.0001$) and higher HLA class II expression ($p= <0.0001$) in NR group. Immunohistochemistry showed *M. pneumoniae* ($p=0.003$) and HBc ($p=0.0009$) antigens in PMR and MR groups. NR showed positive correlation between amount of Bb genes and enterovirus antigens. Molecular biology demonstrated the presence of *M. pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, HHV6 and PVB19 genes in all studied groups. Electron microscopy revealed the presence of structures compatible with mycoplasma, borrelia, enterovirus, herpesvirus 6 and parvovirus. Infectious agents may be the causal and/or perpetuating factor of myocardial injury in patients with Idiopathic DCM, since these initial findings suggest that the microorganisms in symbiosis in the myocardium of these patients is associated with worst prognosis after transplantation.

Descriptors: dilated cardiomyopathy; heart transplantation; inflammation; infection agents; post-transplant rejection.

1. Introdução

1.1. Cardiomiopatia Dilatada e Inflamação

A cardiomiopatia dilatada (CMD), uma das principais causas de insuficiência cardíaca e transplante cardíaco, caracteriza-se pelo aumento da câmara ventricular e disfunção sistólica, podendo ser de origem viral e/ou imune, genética ou idiopática¹.

Devido às inúmeras variáveis envolvidas na patogênese da CMD, atualmente não existe uma opção terapêutica definitiva para seu tratamento, sendo o transplante cardíaco o tratamento de escolha para a insuficiência cardíaca refratária².

O Brasil tem ocupado cada vez mais espaço no campo dos transplantes, com destaque na América Latina e acima de tudo como país referência no transplante cardíaco na doença de Chagas, guiando condutas que são incorporadas no mundo todo³.

Atualmente, a teoria imune infecciosa tem sido a principal hipótese abordada na patogênese da CMD idiopática. Acredita-se que inflamações excessivas no miocárdio provocadas por fatores externos, como infecções virais e/ou anticorpos autoimunes continuam atuando insidiosamente e, levando assim ao processo de remodelação cardíaca promovendo CMD⁴.

Desta forma, a avaliação de uma possível miocardite se faz inicialmente através da suspeita clínica, juntamente com métodos diagnósticos não invasivos. A confirmação só é possível pela análise histológica da biópsia endomiocárdica, quando detectada agressão inflamatória⁵.

Contudo, a avaliação diagnóstica da miocardite pela imunohistoquímica oferece maior acurácia na detecção da presença de processo inflamatório miocárdico, pois realiza a marcação das células mononucleares (linfócitos T e B) e de leucócitos, o que permite melhor identificação e contagem das células inflamatórias⁴.

Evidências crescentes sugerem que a miocardite e a CMD estão intimamente ligadas e os agentes infecciosos, especialmente os agentes virais, são as causas mais importantes^{6,7}. Dentre os agentes virais, os enterovírus e os vírus coxsackie B3 e B4 são os mais amplamente relacionados com a miocardite⁸, mas agentes não virais também podem estar envolvidos na patogênese da CMD, como vamos discutir a seguir.

1.2. Evidências de agentes infecciosos em doenças cardíacas

Vários são os estudos que inferem a participação de agentes infecciosos no desenvolvimento da CMD, no entanto, não há um consenso devido aos resultados serem muito diversos na literatura. A explicação para esta falta de homogeneidade nos resultados está, em grande parte, relacionada à incidência e tipos de vírus pesquisados que pode ser decorrente de diferenças nas técnicas utilizadas.

Em trabalho recente, foi detectada a presença de antígenos virais cardiotrópicos e bacterianos, como da *Borrelia burgdorferi* (Bb) e do *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) em biópsias endomiocárdicas de pacientes com CMD⁹.

Apesar de a Bb não ser um agente etiológico endêmico do Brasil, pesquisadores brasileiros acreditam que o agente da borreliose brasileira pode ser uma espécie diferente de Bb *sensu stricto* geneticamente modificado, não pertencente ao complexo *Ixodesricinus* e diante da impossibilidade de identificação do agente etiológico, esses casos passaram a ser denominados borreliose-símile (Borrelia-like)¹⁰.

A borreliose é uma doença infecciosa não contagiosa e seu quadro clínico apresenta amplo espectro, afetando inicialmente a pele, mas pode se espalhar para o sistema nervoso, articulações e coração, podendo apresentar manifestações cardíacas incluindo endocardite, miocardite e pericardite. A detecção laboratorial se dá por meio de anticorpos específicos contra a espiroqueta ou pesquisa de DNA pela técnica de PCR. Em estudo realizado na República Checa, o genoma da Bb foi detectado em amostras de biópsias endomiocárdicas de pacientes com CMD inexplicada de início recente, pela análise de PCR, porém, o teste sorológico não revelou anticorpos IgM positivos para Bb em qualquer um dos pacientes e anticorpos IgG positivos foram detectados em apenas 36% dos casos, demonstrando as limitações da sorologia no diagnóstico da doença de Lyme^{11,12}.

Outra bactéria presente no estudo descrito acima⁹ foi o *M. pneumoniae*, o principal agente infeccioso responsável pela pneumonia atípica, podendo resultar em manifestações extrapulmonares como artrite, hepatite, e entre as cardíacas, as mais comuns são as arritmias, o bloqueio atrioventricular e a miocardite^{13,14}.

Vários são os vírus cardiotrópicos implicados no desenvolvimento da miocardite e da CMD. Os enterovírus, mais comumente coxsackie vírus foram os primeiros a serem descritos, seguidos pelos adenovírus e mais recentemente, os eritrovírus humano, conhecido como parvovírus B19 (PVB19)¹⁵. O PVB19 invade e se replica nas células endoteliais, e a biópsia endomiocárdica (EMB) com imunohistologia é o principal meio diagnóstico para definir inflamação e padrões moleculares¹⁶.

Recentemente, a participação do vírus da hepatite C (HCV) foi associada a numerosas manifestações extra-hepáticas, nas quais doenças cardiovasculares constituem um aspecto importante, incluindo miocardite e cardiomiopatias^{17,18}.

A infecção por HHV6 é frequentemente detectada em pacientes transplantados e imunossuprimidos¹⁹, embora as infecções causadas nos receptores de transplante sejam atribuídas principalmente às reativações assintomáticas do vírus. Após a infecção primária, o HHV6 persiste no estado de latência no hospedeiro, onde o genoma viral é abrigado como DNA circular em várias células, podendo ser reativado posteriormente, principalmente durante períodos de imunossupressão^{20,21}.

Estudos buscam apenas um agente infeccioso, e não quadros de coinfeção, visto que Bb²² e alguns vírus já foram relatados. Como a soma da incidência desses diferentes agentes infecciosos ultrapassa em muito os 100%, possivelmente em muitos casos há coinfeção.

Assim, a pesquisa de agentes infecciosos e a caracterização da inflamação podem melhorar a orientação da conduta terapêutica²³.No

presente trabalho, buscando superar limitações dos resultados de literatura, nos concentramos no estudo dos agentes infecciosos no coração explantado de pacientes submetidos ao transplante cardíaco (TC) por Cardiomiopatia Dilatada Idiopática (CMDI), por múltiplas técnicas de diagnóstico como microscopia eletrônica de transmissão, detecção de antígeno pela imunohistoquímica e o DNA pela PCR real time ou hibridação *in situ* (HIS), procurando detectar a presença de um ou mais agentes infecciosos em biópsias endomiocárdicas.

2. Objetivos

- a) Avaliar se no coração explantado dos pacientes submetidos ao TC por CMDI existem diferentes coinfeções entre os agentes bacterianos, Mp, Bb e os agentes virais HHV6, HCV, vírus da Hepatite B Core (HBC) e Surface (HBS), PVB19 e Enterovírus;
- b) Verificar se há relação desses agentes com a inflamação, observando se a quantidade dos mesmos se correlaciona com reação inflamatória por células T (CD3 e CD45) células B (CD20), macrófagos (CD68) e expressão HLA-DR/DP/DQ (classe II).
- c) Verificar se há diferenças na evolução pós-transplante cardíaco quanto ao surgimento de rejeição aguda moderada persistente e presença de coinfeções simbióticas.

3.1 Casuística

Estudou-se retrospectivamente fragmentos de miocárdio de 18 pacientes transplantados por CMDI no Instituto do Coração do Estado de São Paulo (InCor), cujas informações e diagnóstico das biópsias de seguimento foram tabulados (Anexo 1). As amostras dos corações explantados foram fixadas em formaldeído e emblocadas em parafina, provenientes dos materiais de arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor-HCFMUSP.

Os pacientes incluídos nesse estudo foram agrupados conforme o grau de rejeição, de acordo com o laudo das biópsias de seguimento, onde estipulamos um período de até 60 dias pós TC para o primeiro episódio de rejeição moderada (2R ou 3R) de acordo com o critério²⁴, sendo separados em:

- **Grupo RMP (Rejeição moderada persistente):** composto por 6 pacientes que apresentaram rejeição 2R ou 3R, submetidos à pulsoterapia e persistiram com rejeição.
- **Grupo RM (Rejeição moderada):** composto por 7 pacientes que apresentaram rejeição 2R ou 3R, submetidos à pulsoterapia e evoluíram para rejeição aguda leve (1R) ou não apresentou rejeição (SR).
- **Grupo SR (Sem rejeição):** composto por 5 pacientes que apresentaram rejeição 1R ou não apresentou rejeição (SR).

3.2. Técnica de Imunohistoquímica

Foram realizados cortes histológicos subsequentes às lâminas coradas por H&E para estudos morfo-moleculares pela técnica de imunohistoquímica.

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em álcool de diferentes concentrações (100%, 95%, 70%) e água.

Quando necessária, a recuperação antigênica foi realizada com tampões (TRIS-EDTA 10mM pH 9.0, Citrato 10mM pH6.0 ou Trilogy™) em panela de pressão elétrica (Dako Cytomation- California, Ref. S2800).

Após a lavagem do material em água, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com Peróxido de Hidrogênio 6%, com 2 banhos de 8 minutos a temperatura ambiente.

O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com CAS Block (Invitrogen, Ref. 008120) por 10 minutos à temperatura ambiente.

De acordo com a padronização e orientação do fabricante, o anticorpo primário foi diluído em Antibody Diluent (Invitrogen Ref. 3218) e cada corte incubado durante 60 minutos a temperatura ambiente.

A seguir, após lavagem em PBS pH 7.4, foi realizada a detecção do antígeno/anticorpo utilizando polímero Picture Max (Invitrogen, Ref 87-8983) ou HiDef Detection System™ (Cell Marque, Ref. 954D-31/954D-32).

Na revelação das reações utilizamos o substrato cromógeno DAB, (Dako Cytomation- California, Ref. K3468) e a contra coloração foi feita com Hematoxilina de Harris (Easy Path, Ref. K3468).

As lâminas com as reações foram desidratadas em álcool de diferentes concentrações (70%, 95% e 100%), diafanizadas com xilol e montadas com lamínulas e resina sintética (Easy Path, Ref. 51-05041).

A quantificação das células inflamatórias (CD3, CD20, CD45 e CD68), foi realizada no microscópio óptico pela contagem do número de células imunomarcadas na objetiva de 40x (em média 20 campos), sendo os resultados expressos em células/mm² e para isso foi dividido o número médio de células pelo valor de conversão 0,159mm² que representa a área do campo da objetiva de 40x.

Para o estudo de antígenos virais, bacterianos e HLA de classe II foi feita digitalização das lâminas utilizando o aparelho ScanScope CS System® (Aperio Technologies, Inc. CA, USA) com uma objetiva Olympus UPlanSApo 40x. A análise da porcentagem de área positiva foi realizada com o programa Aperio ImageScope Software® (Aperio Technologies, Inc. CA, USA).

Foram quantificadas apenas regiões de miocárdio, sendo excluídas as áreas de cortes que apresentavam dobras e/ou rasgos e coágulos. Clones e fabricantes dos anticorpos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Anticorpo	Clone	Fabricante/ Código
CD3	7.2.38	DAKO/ M7254
CD20	L26	DAKO/ M0755
CD45	VCHL	DAKO/ M0742
CD68	KP1	DAKO/ M0814
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Coelho	Abcam
Enterovirus	5-D8/1	DAKO/ M7064
Hepatite B core	Coelho	DAKO/ B0586
Hepatite B surface	Coelho	Doação Inst.Adolfo Lutz
Hepatite C	MMM33	ABCAM /AB49486
Herpes 6	H-JG-20	Virostat/ 2001
HLA-DP/ DQ/ DR	CR3/43	DAKO/ M0775
Parvovírus	R92F6	Monosan/ MONX 11017
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Coelho	FITZGERALD/20MR54

Tabela 1. Anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica.

3.3. Hibridação *in situ* (HIS)

Foi realizada HIS para detecção do DNA do *M. pneumoniae* com a utilização da sonda biotinilada CGTAAGCTATCAGCTACATGGAGG.

Para a permeabilização celular dos cortes histológicos, utilizou-se tampão Trilogy™, seguido por bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 6% e redução das proteínas não específicas com CAS Block (Invitrogen Ref. 008120). A dupla fita de DNA foi denaturada em estufa a 95°C e a hibridação a 60°C, por 19 horas (concentração da sonda de 50ng/μl). O sinal foi amplificado utilizando-se o Kit Genpoint (Dako, CA, Estados Unidos) e para a revelação das reações utilizamos o substrato cromógeno DAB (Dako Cytomation-California/ Ref. K3468) e contra coloração com Hematoxilina de Harris (Easy Path- Ref. K3468). Como controle positivo, foi utilizado um corte histológico previamente diagnosticado positivo para *M. pneumoniae*.

As lâminas com as reações foram desidratadas em álcool de diferentes concentrações (70%, 95% e 100%), diafanizadas com xilol e montadas com lamínulas e resina sintética (Easy Path- Ref. 51-05041).

Para análise das reações de HIS, foi feita digitalização das lâminas utilizando o aparelho ScanScope CS System® (Aperio Technologies, Inc. CA, USA) com uma objetiva Olympus UPlanSApo 40x. Para análise da porcentagem de área positiva foi utilizando o programa Aperio ImageScope Software®.

3.4. Microtomia dos fragmentos para Biologia Molecular

O DNA foi extraído a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina. Antes da realização dos cortes, foi borrifada solução de RNase AWAY™ Decontamination Reagent (Invitrogen, Ref. 10328011) nas bancadas e instrumentos de uso. Todo o procedimento foi realizado com luvas descartáveis e os materiais utilizados foram previamente autoclavados, estando livres de DNase e RNase. Os blocos foram cortados em micrótomo convencional Leica e a partir de cada bloco, foram obtidos cortes histológicos com 5µm de espessura coletados em microtubos, utilizando uma navalha para cada bloco, com o intuito de evitar contaminação entre as amostras.

3.5. Extração de DNA e padronização do PCR convencional

A extração do DNA das amostras iniciou-se com a desparafinização do tecido em banho de xilol com 30 minutos de incubação a 65°C, após centrifugação em 14000rpm por 5 minutos, seguido de desidratação e re-hidratação em etanol com incubações de 1 minuto a temperatura ambiente seguido por centrifugações de 14000rpm por 5 minutos.

Após a obtenção do pellet, seguimos com o protocolo descrito por Bettstetter e cols²⁵, com modificações. As amostras foram incubadas com tampão de lise (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, SDS e Triton X-100 na concentração final de 0.8% e 0.06%) + 20mg/ml de proteinase K à 60°C por aproximadamente 24 horas. Após a incubação, nas amostras que não estavam totalmente digeridas, foram adicionados 20µl de Proteinase K 10mg/ml. O DNA foi extraído e purificado seguindo as especificações do fabricante, utilizando o Kit Purelink® Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Ref. 12280050).

As concentrações das amostras foram determinadas por meio da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 260/280 nm, utilizando-se o aparelho NanoDrop (*Thermo Scientific*) e os valores foram expressos em ng/µl.

Os primers foram otimizados antes de serem testados na plataforma de PCR com a realização de gradiente de temperatura entre 45° e 68°C. Foram utilizadas amostras de tecido ou de cultura sabidamente positiva como controle positivo para os agentes estudados e como controle negativo foi utilizado água ultrapura.

Para confirmação da amplificação do DNA, realizamos o nested-PCR para aumentar a quantidade de produto final amplificado, facilitando a visualização na corrida eletroforética.

Após as amplificações, os produtos foram aplicados em gel de agarose 2%, corado por brometo de etidium e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

3.6. Clonagem do produto de PCR

Foi realizada clonagem do gene da Bb utilizando kit comercial “TOPO TA Cloning” (Invitrogen), apropriado para clonagem de produtos de PCR. Esse kit utiliza como vetor o plasmídeo comercial PCR 2.1 TOPO que possui uma topoisomerase ligada covalentemente. Este vetor linearizado expõe resíduos de timina, que são complementares aos resíduos de adenina, adicionados ao produto de PCR pela enzima Taq polimerase.

3.7. Transformação por choque térmico

Os vetores contendo os insertos foram transformados em uma *E. coli* quimicamente competente por choque térmico.

Foram adicionados 2µl do plasmídeo em 50µl de células competentes (One Shot Chemically Competent *E. coli*), seguido por incubação em banho de gelo por 30 minutos. Após, foi realizada incubação a 42°C por 2 minutos, para dar o choque térmico.

A seguir, as bactérias foram colocadas novamente no gelo por 5 minutos e incubadas em 300µl de meio SOC a 37°C com agitação por 1 hora. Em seguida, todo o conteúdo do crescimento bacteriano foi plaqueado em meio LB ágar contendo ampicilina/X-gal, para selecionar as bactérias que continham os plasmídeos. As placas foram incubadas por 16 horas a 37°C.

Após incubação, 10 colônias brancas (demonstrando a inserção de um fragmento no sítio múltiplo de clonagem do vetor) foram coletadas com o auxílio de uma ponteira estéril e homogeneizadas em 10µl de água estéril. 5µl desse volume foram utilizados para inocular no meio LB + ampicilina e os 5µl restantes foram utilizados como template para PCR, selecionando as colônias

que continham os insertos correspondentes. Os produtos amplificados foram aplicados em um gel de agarose 1%

3.8. Extração e quantificação do DNA do plasmídeo

A extração da plasmídeo foi realizada utilizando o kit comercial “Rapid Plasmid Purification System” (Invitrogen). O DNA plasmidial foi visualizado em gel de agarose 1%.

Em seguida, o plasmídeo foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop (ThermoScientific 2000) nos comprimentos 260nm e 280nm. A concentração encontrada foi utilizada no cálculo de moléculas/μl conforme a fórmula descrita:

$$X \text{ g/}\mu\text{l DNA [n}^\circ \text{ pares de base do plasmídeo} \times 660] \times 6,022 \times 10^{23} = Y \text{ moléculas/}\mu\text{l}$$

3.8.1. Quantificação absoluta das cópias de DNA de agentes infecciosos por PCR em tempo real (qRT-PCR)

As reações de qRT-PCR foram feitas em placas de 96 poços, usando reagente Power SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems – EUA), conforme descrito pelo fabricante e o equipamento utilizado foi o Step One Plus Real- Time PCR Systems (Applied Biosystems).

Para determinar o limite de detecção da reação de qRT-PCR, foram utilizadas curvas padrões com diluições seriadas de DNA extraído, a partir de amostras sabidamente positivas para os genes de interesse.

Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de dissociação “melting”, para verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de primers ou qualquer outro produto inespecífico.

Para análise da amplificação genômica foi feita quantificação absoluta e todas as amostras foram testadas em duplicata.

Genes	Primers	Ciclo
Bb	(F) ggc aac cct aag gtg aag gc	95°C-10' (1x)
	(R) ggt gag cca ggc cat cac ta	95°C- 45'' ; 60°C 45'' ; 72°C 45'' (40x)
HHV6	(F) caa tgc ttt tct agc cgc ctc ttc	95°C-10' (1x)
	(R) aca tct ata att tta gac gat ccc	95°C- 10'' ; 60°C 1' ; 72°C 1' (40x)
M. pneumoniae	(F) att acc atc ctt gtt gta ag	95°C-10' (1x)
	(R) gaa gct tat ggt aca ggt tgg	95°C- 10'' ; 60°C 1' ; 72°C 1' (50x)
PVB19	(F) ttt caa agt cat gga cag tta tct ga	95°C-10' (1x)
	(R) ttg tgt aag tct tca cta gat aat act gca tt	95°C- 45'' ; 60°C 45'' ; 72°C 45'' (40x)

Figura 1- Sequência dos iniciadores e condições para amplificação dos genes utilizados na qRT-PCR.

3.9. Microscopia eletrônica de transmissão

A inclusão do material em resina foi realizada seguindo o procedimento descrito por Duarte e cols.²⁶, com modificações. Os fragmentos foram fixados em glutaraldeído a 3% a 4°C por 3 horas e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% a 4°C por 2 horas. A seguir, foram lavados em três sessões de solução salina e mantidos até o dia seguinte em acetato de uranila 0,5% a 4°C. Os fragmentos foram desidratados em três sessões de etanol 70% por 10 minutos, 2,2 dimetoxi-propano, e a seguir fixados em acetona com sulfato de cobre anidro 4% por 2 minutos. A infiltração foi feita com uma mistura contendo resina epon EMbed 812 com resina araldite 502 (1:1) e polimerização a 100°C por 1 hora.

Foram realizados corte semi-finos de 0,5 µm, corados com azul de metileno a 1% contendo bórax a 1% e azur II a 1%. Após seleção dos melhores blocos, cortes de 60-70nm de espessura foram realizados com ultra-micrótomo e colocados em telas de cobre de 200 mesh revestidas com parlodium

(reagentes e telas da EMS Electron Microscopy Sciences - Hatfield, PA, EUA). As telas foram contrastadas com citrato de chumbo para análise no microscópio eletrônico de transmissão.

3.10. Análise estatística dos dados

O software utilizado para os cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism

6. Os dados de cada variável foram inicialmente comparados com a curva normal pelo teste de distância Kolmogorov-Smirnov, sendo classificados em paramétricos e não paramétricos.

Os dados paramétricos foram representados por média e desvio padrão e os grupos comparados pela análise de variância (ANOVA).

Os dados não paramétricos foram representados por mediana e intervalos interquartis. Os grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis.

Nas análises de correlação foi utilizado o método de Spearman.

4. Resultados

4.1. Estudo da inflamação por imunohistoquímica

CD3

O grupo RMP mostrou maior número médio de células CD3 positivas/mm² sem diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos ($p=0,5$), conforme figura 2.

Figura 2. Número médio de células CD3 positivas/mm² nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.

CD20

Houve maior número de células CD20 positivas/mm² no grupo SR (figura 3), estatisticamente significativa em relação aos grupos RMP e RM ($p=0,0001$).

Figura 3. Número médio de células CD20 positivas/mm² nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.

CD45

Houve um maior número de células CD45 positivas/mm² no grupo RMP, sem significância estatística entre os grupos ($p= 0,3$), conforme figura 4.

Figura 4. Número médio de células CD45 positivas/mm² nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.

CD68

Houve maior número de células CD68/mm² no grupo RMP, com diferença estatisticamente significativa em relação ao SR ($p= 0,005$), conforme demonstrado na figura 5.

Figura 5. Número médio de células CD68 positivas/mm² nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.

Expressão HLA classe II

Houve maior expressão de porcentagem de área para HLA no grupo SR, com diferença estatisticamente significativa do grupo SR em relação aos grupos RMP e RM ($p = <0,0001$) pela análise de comparação múltipla (figura 6).

Figura 6. Quantificação da porcentagem de área positiva de HLA classe II nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.

Figura 7- Imunomarcacão das células inflamatórias em fragmentos de miocárdio de pacientes com CMD: A- CD3, B- CD45, C- CD68 e D- HLA classe II.

4.2. Pesquisa de microrganismos por imunohistoquímica

Na comparação múltipla, houve predomínio de antígenos de *M. pneumoniae* ($p=0,003$) e HBC ($p= 0,0009$) nos grupos RMP e RM em relação ao grupo SR.

Em SR encontramos aumento dos antígenos de HHV6 ($p= 0,01$) e PVB19 ($p= 0,001$). Na comparação múltipla para antígenos de HCV não houve significância estatística ($p=0,08$). Acreditamos que o resultado pode ser significativo com aumento da casuística, pois há um p menor que 0,10. Para os demais antígenos estudados não encontramos diferença estatisticamente significativa. Na tabela 2 estão os dados obtidos pela quantificação dos agentes infecciosos através da técnica de imunohistoquímica.

	RMP	RM	SR	p
Bb	10,1 (7 - 15,3)	12,2 (5,6 - 15,2)	14 (6,6 - 23,4)	0,8
HBC	31,6 (20,8 - 44,2)	21,7 (18,8 - 30)	0,8 (0,3 - 0,8)	0,0009
HBS	1,15 (0,4 - 5,7)	1,7 (0,8 - 2)	1,5 (0,7 - 4,6)	0,9
HCV	14 (11,8 - 20,7)	13 (10,8 - 20,8)	32 (17,2 - 47,5)	0,08
HHV6	10,2 (6,1 - 12,5)	8,8 (4,3 - 10,8)	30 (16,2 - 50,2)	0,01
Enterovírus	32,6 (24,2 - 37,2)	25,03 (18,7 - 31,4)	33,2 (18,9 - 36,3)	0,3
<i>M. pneumoniae</i>	29,9 (24,1 - 31,8)	33,1 (13,6 - 35)	3,3 (1,6 - 8,6)	0,003
PVB19	3,2 (1,5 - 5,8)	2,3 (0,8 - 5,5)	18,2 (9,1 - 30,1)	0,001

Tabela 2. Pesquisa de agentes infecciosos por imunohistoquímica. Dados apresentados como mediana (p25, p75); Bb: *Borrelia burgdorferi*, HBC: vírus da Hepatite B Core, HBS: vírus da Hepatite B Surfase, HCV: vírus da hepatite C, HHV6: Herpes vírus 6, Enterovírus, *M. pneumoniae*: *Mycoplasma pneumoniae*, PVB19: Parvovírus B19.

Figura 8. Quantificação da porcentagem de área positiva de *M. pneumoniae*, HBC, HHV6 e HCV nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.

Figura 9. Quantificação da porcentagem de área positiva de *Borrelia burgdorferi*, PVB19, Enterovírus e HCS nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.

Figura 10. Imunomarcação de agentes infecciosos em fragmentos de miocárdio com CMD: A- *M. pneumoniae*, B- *Borrelia burgdorferi*, C- PVB19, D- Enterovírus, E- HHV6 e F- HBC.

4.3. Pesquisa de *M. pneumoniae* por HIS

Pesquisamos o DNA da bactéria *M. pneumoniae* utilizando a técnica de hibridação *in situ*. Não houve diferença estatística quando comparamos os grupos (Figura 11).

Figura 11. Hibridação para *M. pneumoniae* em fragmento de miocárdio de caso do grupo RMP (40x). Porcentagem de área positiva para hibridação de *M. pneumoniae* nos fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI.

4.4. Pesquisa de microrganismos por PCR real time

A presença do genoma das bactérias *M. pneumoniae* e Bb, assim como os genomas virais do HHV6 e do PVB19 foram evidenciados em todos os pacientes (Figura 12). Na análise de comparação múltipla, houve diferença estatisticamente significativa a favor do grupo SR em relação ao grupo RM para o gene do HHV6 ($p=0,05$). Para os demais microrganismos propostos no estudo não foi possível realizar a quantificação absoluta dos genes porque não houve amostra suficiente.

Figura 12. Quantificação absoluta dos genes de *M. pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, PVB19 e HHV6, expressos em cópias/ml.

4.5. Análises de correlação

Buscando avaliar possível simbiose entre os agentes infecciosos, fizemos análises de correlação que mostrou:

No grupo RMP, houve tendência a correlação negativa entre HIS de *M. pneumoniae* vs antígenos de PVB19 ($r = -0,7$ $p = 0,06$) e HIS de *M. pneumoniae* vs antígenos de HBS ($r = -0,7$ $p = 0,06$).

Houve tendência a correlação negativa entre cópias/ml de *M. pneumoniae* vs antígenos de borrelia ($r = -0,9$ $p = 0,06$) e cópias/ml de *M.*

pneumoniae vs antígenos de HCV ($r = -0,9$ $p = 0,08$). O p desses casos que quase alcançaram significância, possivelmente pelo baixo número de casos, pode se tornar significativo com o aumento da casuística.

As mesmas análises de correlação foram feitas no grupo SR, apresentando tendência a correlação negativa entre HIS de *M. pneumoniae* vs antígenos de HBS ($r = -0,9$ $p = 0,08$) e correlação positiva entre cópias/ml de borrelia vs enterovírus ($r = 1$ $p = 0,01$).

4.6. Microscopia eletrônica de transmissão

A análise de ultraestrutura revelou morfologias compatíveis com microrganismos, favorecendo os dados obtidos pela imunohistoquímica (Figura 13).

Figura 13. Características morfológicas de possíveis microrganismos (setas). A- micoplasma, B- enterovírus (seta vermelha) e borrelia (seta azul), C- HHV6 e D- parvovírus. Barra de 0,5μm em A e B, barra de 0,2μm em C e D.

5. Discussão

A perda de massa cardíaca pelo aumento da câmara ventricular e o adelgaçamento das paredes ventriculares estão altamente relacionados com insuficiência cardíaca e mortalidade²⁷.

Embora o coração possa tolerar funcionalmente uma variedade de insultos patológicos, as respostas adaptativas que visam manter sua função eventualmente falham, resultando em uma ampla gama de déficits funcionais ou cardiomiopatia²⁶.

No presente estudo, foi identificada a presença não apenas de antígenos, mas também dos genes de *M. pneumoniae*, Bb, HHV6 e PVB19 nos corações explantados dos pacientes com CMDI. Isto corrobora achados de Mangini e cols, que detectaram alta incidência de antígenos da Bb, HHV6 e hepatite B, em pacientes com CMDI, sugerindo uma relação causal desses microrganismos na patogênese da doença, uma vez que a presença de inflamação e microrganismos no miocárdio de pacientes com CMDI é frequente e relaciona-se com as doenças cardiovasculares⁹.

Em trabalho prévio do grupo, foi aventada a hipótese de simbiose entre microrganismos e alteração do sistema imune no tecido miocárdico, com base na presença de formas simbióticas envolvendo elementos de micoplasma, clamídia e arqueia o que teria relação com o aumento da resposta imunológica pela deposição de complemento e ativação de linfócitos, levando ao desenvolvimento de miocardite²⁸.

Nosso trabalho traz avanços em relação aos achados de literatura, pois realizamos a quantificação dos genes através da PCR real time, possibilitando melhor entendimento de simbiose entre agentes infecciosos.

A simbiose entre microrganismos contribui para adaptação e sobrevivência dos mesmos, levando a maior patogenicidade e pior prognóstico da doença, no qual as comunidades microbianas que adotam uma relação patogênica podem ativar o sistema imune inato e adaptativo promovendo inflamação e doenças, como por exemplo, o câncer^{29,30}.

Notamos que no grupo RMP houve alta expressão para antígenos de *M. pneumoniae* e quantidade elevada de macrófagos. Nakayama e cols demonstraram que a ativação imunológica excessiva no miocárdio mediada por linfócitos T e macrófagos está associada a pior prognóstico em pacientes com CMD³¹. Assim, confrontando com nossos achados, esta inflamação excessiva pode estar ligada à presença de micoplasmas em simbiose com outros agentes, como vamos discutir a seguir.

Classicamente, os micoplasmas atuam como parasitas extracelulares, e a patogenicidade é dependente dos pontos de fixação e do início da lesão à membrana da célula hospedeira³². Sua presença pode estimular macrófagos hiperativos, induzir ativação de células natural killer, além de estimulação de proliferação de células T e B. Podem ainda induzir expressão de moléculas de classes I e II do complexo principal de histocompatibilidade, induzindo apoptose de fibroblastos^{33,34}.

Nas análises de correlação, foi demonstrado que o grupo RMP apresentou correlações negativas entre *M. pneumoniae* vs Bb, *M. pneumoniae* vs PVB19 e *M. pneumoniae* vs vírus das hepatites (B e C), sugerindo uma íntima associação entre bactérias e vírus, ou seja, uma simbiose. Acreditamos que a simbiose entre o *M. pneumoniae* e a Bb está

relacionada com má evolução pós transplante cardíaco, já que essa associação ocorre apenas no grupo RMP. Estes resultados foram comprovados pelo uso simultâneo de várias técnicas de diagnóstico em cortes sequenciais de tecido.

A coinfeção com *M. pneumoniae* pode exacerbar a doença de Lyme por meio da modulação do sistema imunológico e isso pode ser uma das causas de resistência à terapia, pelo mecanismo sinérgico-patológico³⁵. A prevalência da Bb no envolvimento cardíaco tem sido cada vez mais evidenciada, sendo detectada em amostras endomiocárdicas de pacientes com suspeita de doença cardíaca inflamatória³⁶. Além disso, achados semelhantes sugeriram que a Europa Central representa uma área endêmica com frequência relativamente alta de CMD relacionada à Bb³⁷.

Embora o *M. pneumoniae* seja classicamente considerado um patógeno extracelular, em certas circunstâncias, como baixa resistência do sistema imune ou aumento da patogenicidade do agente infeccioso, essa bactéria pode viver e se replicar intracelularmente nas células humanas^{38,39}. A residência em um reservatório intracelular poderia explicar a habilidade em estabelecer infecção crônica, como ocorre nos pacientes asmáticos, talvez por estar ao abrigo da resposta imunológica do hospedeiro e da ação dos antibióticos, o que permite a sobrevivência bacteriana por longos períodos e a dificuldade em erradicar a infecção^{40,41,42}.

Ainda, como vimos nos resultados, o grupo RM não apresentou correlação entre microrganismos, aventando a possibilidade de que quando há coinfeção sem íntima simbiose entre os agentes infecciosos, estes são

mais susceptíveis ao tratamento de imunossupressão, o que corrobora com os dados de evolução desse grupo, apresentados no anexo 1.

Notamos que no grupo SR houve quantidade elevada de antígenos e gene HHV6, alta porcentagem dos antígenos do PVB19 e baixa porcentagem de antígenos de *M. pneumoniae*. Além disso, houve aumento do número médio de células B e maior expressão HLA classe II, sugerindo que este grupo tenha o sistema imune mais eficaz, resultando em melhor controle de microrganismos.

Estudos da literatura sugerem que a CMD pode resultar da miocardite viral, pela persistência de vírus nos cardiomiócitos. Lotze e cols⁴³ demonstraram a prevalência de 42% do genoma parvoviral em fragmentos miocárdicos de pacientes com CMDI. Outros pesquisadores especulam o papel patogênico do PVB19 no processo inflamatório da CMD, possivelmente pela presença do vírus nas células infiltrantes^{44,45}. Entretanto, esses achados são controversos, já que este vírus também pode ser encontrado no coração de indivíduos saudáveis⁴⁶.

Nossos achados mostram a presença do genoma do PVB19 em todos os grupos de estudo e alta porcentagem de antígenos nos corações dos pacientes sem rejeição (SR). Da mesma forma, foi visto frequências variáveis do genoma e antígenos de HHV6 nos grupos. Mas, apesar da alta prevalência de HHV6 e PVB19 no grupo SR, sua patogenicidade é dependente de coinfeção, visto que no grupo com pior prognóstico (RMP) houve tendência à associação do PVB19 com *M. pneumoniae*, nos dados de correlação. Sendo assim, acreditamos que sem a participação de outros microrganismos como a bactéria *M. pneumoniae*, a resposta

imune se torna mais eficaz fazendo com que o vírus seja menos virulento e conseqüentemente contribui para evitar o desenvolvimento de rejeição moderada, como no caso do HHV6 no grupo SR.

O HHV6 pode infectar tipos celulares, como os monócitos, macrófagos, fibroblastos e células de origem endotelial²⁰. Após a infecção primária, o HHV6 persiste no estado de latência no hospedeiro, onde o genoma viral é abrigado como DNA circular em várias células, podendo ser reativado posteriormente, principalmente durante períodos de imunossupressão¹⁹,
²⁰.

Além disso, o desenvolvimento de cardiomiopatia associada ao HCV pode ocorrer em pacientes suscetíveis, nos quais os mecanismos virais e imunológicos podem produzir dano miocárdico e cardiovascular, como aumento de placas nas artérias carótidas^{47,48}. Estudo recente mostrou que pacientes positivos para HCV apresentaram taxas de mortalidade mais altas para doenças cardiovasculares em comparação aos pacientes HCV negativos⁴⁹, evidenciando a importância desse vírus em doenças cardíacas.

Desta forma, entendemos que a presença de simbioses caracteriza um quadro mais grave da doença, e tem sido demonstrado que uma íntima interação entre diferentes espécies pode exacerbar seus efeitos simbióticos e imunológicos^{50,51}. Assim, nossos achados de mais infiltrado de macrófagos e associações de vírus com *M. pneumoniae* no grupo RMP reforçam essa tese de maior virulência de simbioses, onde se acredita que associação entre diferentes espécies de microrganismos leva ao

desenvolvimento de formas simbióticas mais resistentes e produtivas do que as formas isoladas⁵².

O presente estudo tem a limitação do número pequeno de pacientes, porém, dada a importância dos achados sobre coinfeção, e que são sustentados pelo uso concomitante de várias técnicas torna este trabalho inovador fortalecendo a tese de que agentes infecciosos em simbiose ou não causam diferentes intensidades de inflamação que poderiam estar influenciando na patogenia da CMD. Como proposta futura, pretendemos continuar este estudo avaliando biópsias endomiocárdicas de seguimento pós transplante para verificar se os agentes infecciosos presentes nos corações dos receptores como demonstramos, ressurge no coração do doador se associando a diferentes tipos de intensidade de rejeição.

6. Conclusão

Este trabalho estudou receptores de transplante cardíaco e mostrou que agentes infecciosos pode ser o fator causal e/ou perpetuador de lesão miocárdica de pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática, visto que:

1. Houve uma relação entre diferentes tipos de microrganismos e a evolução pós-transplante.
2. Houve microrganismos em simbiose nos miocárdios daqueles que evoluíram com rejeição moderada persistente.
3. Ausência de rejeição pós-transplante se associou a pacientes que tinham baixa quantidade de micoplasmas no coração explantado.
4. A utilização de múltiplas técnicas diagnósticas torna os resultados mais confiáveis quanto à da quantidade e interação entre diferentes agentes infecciosos.
5. A análise conjunta dos agentes infecciosos com a resposta inflamatória no miocárdio, juntamente com os dados clínicos e histológicos podem prever, em parte, a maior ou menor chance de surgimento da rejeição pós-transplante, e da resolução da rejeição pós pulsoterapia

7.1. Dados das biópsias de segmento dos pacientes dos grupos RMP, RM e SR.

RMP	Sexo	Tempo	Rejeição
Caso 1	M	1º dia TC	Coração TC - CMD
		7º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 3B (moderada, borderline intensa)
		18º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1A (leve multifocal)
		24º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada focal)
Caso 3	M	1º dia TC	Coração TC - CMD
		1º dia TC	Reatividade linfo-histiocitária intersticial; aspecto compatível com decorrencia de uso de drogas vasoativas
		9º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		21º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
Caso 4	M	1º dia TC	Coração TC - CMD
		8º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		15º pós TC	Ausência de rejeição
		49º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		59º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
Caso 5	M	1º dia TC	Coração TC - CMD
		2º pós TC	Áreas de fibrose intersticial; hipertrofia de miocardiócitos de grau leve
		7º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		14º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		26º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		43º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
Caso 9	F	1º dia TC	Coração TC - CMD
		2º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 3R (intensa, alto grau)
		6º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		19º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
Caso 15	F	1º dia TC	Coração TC - CMD
		7º pós TC	Ausência de rejeição- presença de áreas pequenas e esparsas de necrose isolada de cardiomiócitos que podem ser decorrentes de isquemia perioperatória.
		16º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		32º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		60º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)

RM	Sexo	Tempo	Rejeição
Caso 2	F	1º dia TC	Coração TC - CMD
		7º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 3A (intensa alto grau)
		26º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1A (leve baixo grau)
Caso 6	F	1º dia TC	Coração TC - CMD
		7º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		26º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		62º pós TC	Ausência de rejeição
Caso 7	M	1º dia TC	Coração TC - CMD
		4º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		61º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		108º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
Caso 10	M	1º dia TC	Coração TC - CMD
		3º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		14º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		22º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		95º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		142º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixograu)
Caso 12	F	1º dia TC	Coração TC - CMD
		5º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		21º pós TC	Ausência de rejeição
		71º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		84º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
Caso 13	M	1º dia TC	Coração TC - CMD
		14º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		22º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		29º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		45º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		58º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
Caso 16	M	1º dia TC	Coração TC - CMD
		32º pós TC	Ausência de rejeição
		48º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 2R (moderada, grau intermediário)
		63º pós TC	Ausência de rejeição
		144º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau).

SR	Sexo	Tempo	Rejeição
8	M	1º dia TC	Coração TC - CMD
		11º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		22º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		50º pós TC	Ausência de rejeição aguda celular
11	M	1º dia TC	Coração TC - CMD
		5º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		20º pós TC	Ausência de rejeição
		59º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
14	F	1º dia TC	Coração TC - CMD
		6º pós TC	Ausência de rejeição
		13º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		51º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
17	M	1º dia TC	Coração TC - CMD
		18º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		37º pós TC	Ausência de rejeição
18	M	1º dia TC	Coração TC - CMD
		8º pós TC	Ausência de rejeição
		15º pós TC	Rejeição aguda celular, grau 1R (leve baixo grau)
		24º pós TC	Ausência de rejeição

7.2. Parecer da CaPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

3703/11/121

PROJETO DE PESQUISA

Título: BIOMARCADORES INFECCIOSOS EM DIFERENTES CARDIOMIOPATIAS DILATADAS
Pesquisador Responsável: Prof. Dra. Maria de Lourdes Higuchi **Versão:** 3
Pesquisador Executante: Prof. Dra. Maria de Lourdes Higuchi **CAAE:** 04588712.2.0000.0068
Coautores: Edimar Alcides Bocchi, Victor Sarli Issa, Sandrigo Mangini
Instituição: HCFMUSP
Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 8157
Número do Parecer: 1.268.142
Data da Relatoria: 07/10/15
Apresentação do Projeto: Inclusão da aluna Jaqueline de Jesus Pereira e do subprojeto "Identificação de agentes infecciosos em biópsias endomiocárdicas pós-transplante cardíaco de pacientes com cardiopatia dilatada idiopática e miocardite linfocitária", como projeto de tese no Programa de Fisiopatologia Experimental, sob orientação de Profª. Drª. Maria de Lourdes Higuchi.
Objetivo da Pesquisa: Inclusão da aluna Jaqueline de Jesus Pereira e do subprojeto "Identificação de agentes infecciosos em biópsias endomiocárdicas pós-transplante cardíaco de pacientes com cardiopatia dilatada idiopática e miocardite linfocitária", como projeto de tese no Programa de Fisiopatologia Experimental, sob orientação de Profª. Drª. Maria de Lourdes Higuchi.
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Sem modificação em razão dessa iniciativa.
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Sem comentários adicionais.
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Sem considerações adicionais.
Recomendações: Sem recomendações adicionais.
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Cientes.
Situação do Parecer: Aprovado.
Necessita Apreciação da CONEP: Não.

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO

16/10/2015
Leandro Lucio

São Paulo, 07 de outubro de 2015

Prof. Dr. Joel Faintuch
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

8. Referências

-
- ¹ Caforio AL, Tona F, Bottaro S, Vinci A, Dequal G, Daliento L, et al. Clinical implications of anti-heart autoantibodies in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity*. 2008; 41(1): 35-45.
- ² Bacal F, Marcondes-Braga FG, Rohde LE, Júnior JL, RMito FS, Moura LA et al. 3ª Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. *Arq Bras Cardiol*. 2018; 111(2):230-289.
- ³ Bacal F, Neto JD, Fiorelli AI, Mejia J, Marcondes-RMaga FG, Mangini S, et al. II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. *Arq Bras Cardiol* 2010; 94(1): e16-e73.
- ⁴ Kawai C, Matsumori A. Dilated cardiomyopathy update: infectious-immune theory revisited. *Heart Fail*. 2013; 18(6):703–714.
- ⁵ Montera MW, Mesquita ET, Colafranceschi AS, Oliveira AM, Rabischoffsky A, Ianni BM, et al. I Diretriz Brasileira de Miocardites e Pericardites. *Arq Bras Cardiol*. 2013; 100(4 Supl. 1): 1-36.
- ⁶ Rose NR. Viral Myocarditis. *Curr Opin Rheumatol*. 2016; 28 (4):383-389.
- ⁷ Schultz JC, Hilliard AA, Cooper LT, Rihal CS. Diagnosis and Treatment of Viral Myocarditis. *Mayo Clin Proc*. 2009; 84 (11): 1001-1009.
- ⁸ Mattos BP. Mecanismos Celulares e Biomoleculares na Cardiomiopatia Dilatada. *Arq Bras Cardiol*. 1999; 72 (4): 507-511.

-
- ⁹ Mangini S, Higuchi ML, Kawakami JT, Reis MM, Ikegami RN, Palomino SA, *et al.* Infectious agents and inflammation in donated hearts and dilated cardiomyopathies related to cardiovascular diseases, Chagas' heart disease, primary and secondary dilated cardiomyopathies. *Int. J. Cardiol.* 2015; 178: 55–62.
- ¹⁰ Yoshinari NH, Mantovani E, Bonoldi VL, Marangoni RG, Gauditano G. Brazilian Lyme-like disease or Baggio-Yoshinari Syndrome: exotic and emerging Brazilian tick-borne zoonosis. *Rev Assoc Med Bras.* 2010; 56:363-369.
- ¹¹ Kuchynka P, Palecek T, Havranek S, Vitkova I, Nemecek E, Trckova R. Recent-onset dilated cardiomyopathy associated with *Borrelia burgdorferi* infection. *Herz.* 2015; 40 (6): 892–897.
- ¹² Santos M, Junior VD, Rodrigues RR, Talhari S. Borreliose de Lyme. *An Bras Dermatol.* 2010; 85:930-938.
- ¹³ Nagashima M, Higakib T, Satoha H, Nakanoc T. Cardiac thrombus associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010; 11: 849–851.
- ¹⁴ Koskiniemi M. CNS manifestations associated with *Mycoplasma pneumoniae* infections: summary of cases at the University of Helsinki and review. *Clin Infect Dis.* 1993; 17: S52-7.
- ¹⁵ Stewart GC, Lopez-Molina J, Gottumukkala RV, Rosner GF, Anello MS, Hecht JL, *et al.* Myocardial Parvovirus B19 Persistence: Lack of Association with Clinicopathologic Phenotype in Adults with Heart Failure. *Circ Heart Fail.* 2011; 4(1):71-78.

-
- ¹⁶ Bachelier K, Biehl S, Schwarz V, Schwarz V, Kindermann I, Kandolf R, et al. Parvovirus B19-induced vascular damage in the heart is associated with elevated circulating endothelial microparticles. PLoS One. 2017; 12(5): e0176311.
- ¹⁷ Sanchez MJ, Bergasa NV. Hepatitis C associated cardiomyopathy: potential pathogenic mechanisms and clinical implications. Med Sci Monit. 2008; 14(5):RA55-63.
- ¹⁸ Ilyas SZ, Tabassum R, Hamed H, Rehman SU, Qadri I. Hepatitis C Virus-Associated Extrahepatic Manifestations in Lung and Heart and Antiviral Therapy-Related Cardiopulmonary Toxicity. Viral Immunol. 2017; 30 (9): 633-641.
- ¹⁹ Ljungman P, Singh N. Human Herpesvirus-6 Infection in Solid Organ and Stem Cell Transplant Recipients. J Clin Virol. 2006; 37: S87-91.
- ²⁰ Lautenschlager I, Razonable RR. Human herpesvirus-6 infections in kidney, liver, lung, and heart transplantation: review. Transpl Int. 2012; 25 (5):493-502.
- ²¹ Flamand L, Komaroff AL, Arbuckle JH, Medveczky PG, Ablashi DV. Review, part 1: Human herpesvirus-6-basic biology, diagnostic testing, and antiviral efficacy. J Med Virol. 2010; 82 (9):1560-1568.
- ²² Palecek T, Kuchynka P, Hulinska D, Schramlova J, Hrbackova H, Vitkova I, et al. Presence of *Borrelia burgdorferi* in endomyocardial biopsies in patients

with new-onset unexplained dilated cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol*. 2010; 199 (2):139–143.

²³ Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, et al. Underlying Causes and Long-term Survival in Patients with Initially Unexplained Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2000; 342 (15):1077-1084.

²⁴ Stewart S, Winters GL, Fishbein MC et al (2005) Revision of the 1990 Working Formulation for the Standardization of Nomenclature in the Diagnosis of Heart Rejection. *J Heart Lung Transpl* 24:1710-1720.

²⁵ Bettstetter M, Peng X, Garrett RA, Prangishvili D. AFV1, a novel virus infecting hyperthermophilic archaea of the genus *acidianus*. *Virology*. 2003 Oct 10; 315(1):68-79.

²⁶ Duarte MIS, Mariano ON, Takakura CF, Everson D, Corbett CE. A Fast Method for Processing Biologic Material for Electron Microscopic Diagnosis in Infectious Disease. *Ultrastruct Pathol*. 1992; 16 (4):475-482.

²⁷ Harvey PA, Leinwand LA. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol*. 2011; 194 (3): 355-365.

²⁸ Higuchi M, Kawakami J, Ikegami R, Clementino MB, Kawamoto FM, Reis MM, et al. Do Archaea and bacteria co-infection have a role in the pathogenesis of chronic chagasic cardiopathy? *Men Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 199-207.

²⁹ Hansen SK, Rainey PB, Haagensen JA, Molin S. Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature*. 2007; 445 (7127):533-536.

³⁰ Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(11):800-812.

-
- ³¹ Nakayama T, Sugano Y, Yokokawa T, Nagai T, Matsuyama TA, Ohta-Ogo K et al. Clinical impact of the presence of macrophages in endomyocardial biopsies of patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2017; 19(4):490-498.
- ³² Collier AM, Clyde WA. Relationships between *Mycoplasma pneumoniae* and Human Respiratory Epithelium. *Infect Immun* 1971; 3 (5):694-701.
- ³³ Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62:1094-1156.
- ³⁴ Yang J, Hooper WC, Phillips DJ, et al. Regulation of Proinflammatory Cytokines in Human Lung Epithelial Cells Infected with *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* 2002; 70 (7):3649-3655.
- ³⁵ Berghoff W. Chronic Lyme Disease and Co-infections: Differential Diagnosis. *Open Neurol J.* 2012; 6:158-178.
- ³⁶ Karatolios K, Maisch B, Pankuweit. Suspected inflammatory cardiomyopathy: prevalence of *Borrelia burgdorferi* in endomyocardial biopsies with positive serological evidence. *Herz.* 2015; 40: 91-95.
- ³⁷ Kubánek M, Šramko M, Berenová D, Hulínská D, Hrbáčková H, Malušková J, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in endomyocardial biopsy specimens in individuals with recent-onset dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2012; 14 (6): 588-596.
- ³⁸ Yavlovich A, Tarshis M, Rottem S. Internalization and intracellular survival of *Mycoplasma pneumoniae* by non-phagocytic cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 233 (2): 241–246.

-
- ³⁹ Baseman J, Lange M, Criscimagna N, Giron J, Thomas C. Interplay between mycoplasmas and host target cells. 1995. *Microb. Pathog.* 19:105–116.
- ⁴⁰ Dessì D, Delogu G, Emonte E, Catania MR, Fiori PL, Rappelli P. Long-term survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* Cells: Potential Role of the Protozoon in Transmitting Bacterial Infection. *Infect Immun.* 2005; 73(2):1180-1186.
- ⁴¹ Hardy RD, Jafri HS, Olsen K, et al. *Mycoplasma pneumoniae* Induces Chronic Respiratory Infection, Airway Hyperreactivity, and Pulmonary Inflammation: a Murine Model of Infection-Associated Chronic Reactive Airway Disease. *Infect Immun* 2002; 70 (2):649-654.
- ⁴² Martin RJ, Kraft M, Chu HW, et al. A link between chronic asthma and chronic infection. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107 (4):595-601.
- ⁴³ Lotze U, Egerer R, Tresselt C, Glück B, Dannberg G, Stelzner A, et al. Frequent detection of parvovirus B19 genome in the myocardium of adult patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol.* 2004; 193: 75-82.
- ⁴⁴ Moimas S, Zacchigna S, Merlo M, Buiatti A, Anzini M, Dreaz L, et al. Idiopathic dilated cardiomyopathy and persistent viral infection: Lack of association in a controlled study using a quantitative assay. *Heart, Lung Circ.* 2012; 21: 787-793.
- ⁴⁵ Pankuweit S, Moll R, Baandrup U, Portig I, Hufnagel G, Maisch B. Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Hum Pathol.* 2003; 34 (5): 497-503.

- ⁴⁶ Verdonchot J, HazeRMoek M, Merken J, Debing Y, Dennert R, RMunner-La Rocca HP, et al. Relevance of cardiac parvovirus B19 in myocarditis and dilated cardiomyopathy: review of the literature. *Eur J Heart Fail*. 2016; 18(12):1430-1441.
- ⁴⁷ Sanchez MJ, Bergasa NV. Hepatitis C associated cardiomyopathy: potential pathogenic mechanisms and clinical implications. *Med Sci Monit*. 2008;14(5):RA55-63.
- ⁴⁸ Fukui M, Y Kitagawa, Nakamura N, Yoshikawa T. Hepatitis C Virus and Atherosclerosis in Patients with Type 2 Diabetes. *JAMA*. 2003; 289:1245-1246.
- ⁴⁹ Cacoub P, Comarmond C, Domont F, Savey L, Desbois AC, Saadoun D. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Ther Adv Infect Dis*. 2016; 3(1):3-14.
- ⁵⁰ Mideo N. Parasite adaptations to within-host competition. *Trends Parasitol*. 2009; 25(6):261-268.
- ⁵¹ Alizon S, van Baalen M. Multiple Infections, Immune Dynamics, and the Evolution of Virulence. *Am Nat*. 2008; 172(4): E150-68.
- ⁵² Hansen SK, Rainey PB, Haagensen JA, Molin S. Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature*. 2007; 445 (7127):533-536.