

Karla Deysiree Alcântara Silva

Genética e patogenia de megaesôfago chagásico: identificação de variantes patogênicas e investigação de seu impacto funcional

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha Neto

São Paulo

2021

Karla Deysiree Alcântara Silva

Genética e patogenia de megaesôfago chagásico: identificação de variantes patogênicas e investigação de seu impacto funcional

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha Neto

São Paulo

2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Alcântara Silva, Karla Deysiree  
Genética e patogenia de megaesôfago chagásico :  
identificação de variantes patogênicas e investigação  
de seu impacto funcional / Karla Deysiree Alcântara  
Silva. -- São Paulo, 2021.  
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Alergia e Imunopatologia.  
Orientador: Edecio Cunha Neto.

Descritores: 1.Megaesôfago chagásico  
2.Mitocôndrias 3.Mutação mitocondrial 4.Disfunção  
mitocondrial 5.Interferon-gamma 6.MRPS18B 7.Doença  
de Chagas 8.Trypanosoma cruzi

USP/FM/DBD-421/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

A todos que me incentivaram  
de alguma forma  
a continuar.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Prof. Dr. Edecio Cunha Neto por me receber com o maior carinho e paciência do mundo no grupo. Obrigada pela orientação e confiança depositada em mim e por todo apoio nesses anos.

Ao meu co-orientador Dr. João Paulo Silva Nunes, pelo apoio, conversas, incentivo, conselhos, por dividir seus conhecimentos e por me ajudar em diversas situações de bancada.

Ao professor Dr. Jorge Kalil pela oportunidade de realização do trabalho em seu laboratório.

Aos meus amigos da hora do chá Ricardo Zaniratto, Natalia Bueno e Andréia Kuramoto por me proporcionarem momentos únicos e divertidos nesse período. Vocês fizeram toda a diferença.

Ao pessoal do LIM19, Luri Sasahara, Giuliana Medeiros, Raquel Vieira, Rafael Almeida, Marilda, Simone Santos, Malu Marin, Samar Freschi, Janaina Alves, Sandra Maria, Elaine, Rai e Washington. Agradeço a vocês pelas risadas nos corredores, amizade, apoio e incentivo.

Ao Sr. Jair, Sônia e Ludmila, pela atenção, amizade e por toda ajuda administrativa.

Ao Dr. Christophe Chevillard e seu grupo, pelo apoio e realização do sequenciamento genético dos pacientes.

À Dra. Débora Levy, pelas conversas, conselhos, por compartilhar suas histórias únicas e me ajudar nos infinitos experimentos com o maior carinho do mundo.

Ao laboratório de Biologia Vascular por permitir o uso de seus equipamentos.

À toda a Equipe da Divisão de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, Dr. Francisco Seguro, Dr. Ivan Cecconello.

À Eleni Arruda, pela ajuda com as infinitas resoluções burocráticas.

Ao Anselmo Carlos por ser meu amigo, meu irmão e meu ombro nos momentos felizes e tristes. Minha vida não seria a mesma sem você. Obrigada por todo apoio durante todos esses anos.

À Yasmin, por ser a maior incentivadora da minha vida. Por ter me ajudado incontáveis vezes e me acalmado durante todo esse processo. A sua presença me iluminou. A sua presença faz diferença. Obrigada, você é minha pessoa.

À minha mãe Maria, obrigada pelo ano, por me aceitar, por me amar e não desistir. Obrigada por cada gesto e cada palavra de carinho, motivação e puxões de orelha.

Ao meu pai Antonio por sempre me aceitar e apoiar, mesmo que de “longe”.

Minha irmã Geissi, por me irritar, mas também me trazer alegria.

Ao meu psicólogo Fer, obrigada por me ajudar a conseguir me manter de “pé” nesse finalzinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo apoio financeiro.

" Se podes olhar, vê.  
Se podes ver, repara. "

José Saramago

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
1. Introdução .....	15
1.1. Aspectos gerais da Doença de Chagas .....	15
1.2. Doença digestiva – Megaesôfago Chagásico .....	16
1.3. Patogenia da cardiopatia chagásica e megaesôfago chagásico .....	17
1.4. Genética na doença de Chagas .....	18
1.5. Paralelos entre mitocondriopatias genéticas e a doença de Chagas ..	19
1.6. Dano mitocondrial na doença de Chagas: possível papel do IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ .....	20
1.7. Justificativa .....	21
2. Hipótese .....	23
3. Objetivos .....	24
3.1. Objetivo geral .....	24
3.2. Objetivos específicos .....	24
4. Método .....	25
4.1. Desenho experimental .....	25
4.2. Pacientes .....	25
4.3. Exoma dos pacientes com MEC e FI .....	27
4.4. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ..	28
4.5. Produção de sobrenadante rico em partículas virais do vírus Epstein-Barr provenientes da linhagem celular B95.8 .....	29
4.6. Imortalização de PBMCs com o vírus EBV para obtenção de EBV-LCLs de pacientes .....	30
4.7. Avaliação de mtROS em EBV-LCLs .....	31
4.8. Tratamento de EBV-LCLs de pacientes com IFN- $\gamma$ por 48 horas .....	32
4.9. Quantificação da produção de nitrito, ATP e proteínas nitradas .....	33
4.10. Quantificação do DNA mitocondrial no plasma e <i>buffy coat</i> .....	34



4.11.	Detecção de FGF-21 no plasma.....	35
4.12.	Análise estatística.....	36
5.	Resultados.....	37
5.1.	Sequenciamento do exoma em pacientes MEC e FI.....	37
5.2.	Sequenciamento de Sanger da variante MRPS18B.....	44
5.1.	Função mitocondrial de linhagens EBV-LCL de pacientes que apresentam ou não a variante MRPS18B.....	46
5.2.	IFN- $\gamma$ causa estresse nitro-oxidativo e dano mitocondrial em pacientes portadores da variação MRPS18B P260A.....	52
5.1.	Quantificação do DNA mitocondrial no plasma e <i>buffy coat</i> de pacientes MEC portadores ou não portadores de mutação do gene mitocondrial MRPS18B c.688C>G p.P230A.....	55
5.2.	Detecção de FGF-21 no plasma de pacientes MEC portadores ou não portadores de mutação do gene mitocondrial MRPS18B 688C>G P230A. ...	56
6.	Discussão.....	58
7.	Conclusão.....	64
8.	Anexos.....	65
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA**

**CCC** Cardiomiopatia chagásica crônica

**DC** Doença de Chagas

**DMSO** Dimetilsulfóxido

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**EBV** Vírus Epstein-Barr

**FBS** Soro fetal bovino

**FI** Forma indeterminada

**HBSS** Solução salina tamponada de Hank's

**HBSS++** Solução salina tamponada de Hank's com cálcio e magnésio

**IFN-  $\gamma$**  Interferon-gama

**LCL** Linhagem de células linfoblásticas

**MEC** Megaesôfago Chagásico

**mtROS** Espécies reativas de oxigênio mitocondrial

**PBMC** Células mononucleares do sangue periférico

**ROS** Espécies reativas de oxigênio

**RPMI** *Roswell Park Memorial Institute*

**TGI** Trato gastrointestinal

**NM** Não mutado

**RNS** espécies reativas de nitrogênio

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema da hipótese deste trabalho .....	23
Figura 2 Desenho experimental .....	25
Figura 3 Variantes selecionadas de pacientes MEC. ....	37
Figura 4 Fracionamento eletroforético do amplicon correspondente ao gene MRPS18B nos pacientes MEC.....	45
Figura 5 Cromatograma de Sanger de pacientes com a variante MRPS18B... 45	
Figura 6 Imagens representativas da marcação de ROS mitocondrial em EBV-LCLs usando MitoSox Red em EBV-LCL de paciente homozigoto. ....	46
Figura 7 mtROS citoplasmático em EBV-LCLs de pacientes MEC tratados por 24 horas com IFN- $\gamma$ .....	48
Figura 8 Produção de nitrito em pacientes com e sem mutação.....	49
Figura 9 Detecção de proteínas nitradas em pacientes com e sem mutação. .	50
Figura 10 Avaliação da síntese de ATP em pacientes com e sem mutação....	51
Figura 11 Produção de ATP e estresse nitro-oxidativo após tratamento com IFN- $\gamma$ em portadores ou não portadores de mutação do gene mitocondrial MRPS18B 688C>G MRPS18B P230A. ....	53
Figura 12 Viabilidade de células EBV-LCL após tratamento com IFN- $\gamma$ por 24 horas. ....	54
Figura 13 Quantificação do mtDNA no plasma dos pacientes MEC. ....	55
Figura 14 Quantificação do mtDNA no buffy coat dos pacientes MEC. ....	56
Figura 15 Níveis de FGF-21 no plasma de pacientes com MEC.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Informações dos pacientes que compõem os grupos estudados.....	26
Tabela 2 Sequências dos iniciadores para amplificação do DNA mitocondrial	35
Tabela 3 Variantes patogênicas missense associadas a MEC em comparação com pacientes FI. ....	38
Tabela 4 Variantes apresentadas por cada indivíduo dos pacientes MEC. ....	41
Tabela 5 Lista de pacientes e o genótipo correspondente para o gene MRPS18B .....	43
Tabela 6 Quantidade de pacientes MEC e FI com a variante MRPS18B. ....	44

## RESUMO

Alcântara Silva KD. *Genética e patogenia de megaesôfago chagásico: identificação de variantes patogênicas e investigação de seu impacto funcional* [dissertação]. São de Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta 5 a 8 milhões de pessoas em todo o mundo e cerca de 1/3 desenvolve a doença cardíaca crônica (CCC) ou digestiva (megaesôfago/megacólon), enquanto a maioria permanece assintomática, na chamada forma indeterminada da doença de Chagas (FI). A genética do hospedeiro e a produção local de citocinas como IFN- $\gamma$  parecem desempenhar um papel importante na progressão da doença, mas pouco se sabe sobre o papel da genética na suscetibilidade às formas digestivas da DC. Nosso grupo descobriu recentemente que a maioria dos casos de CCC em famílias com múltiplos pacientes com doença de Chagas carrega mutações prejudiciais em genes mitocondriais. Neste trabalho buscamos identificar mutações mitocondriais associadas à forma digestiva da doença de Chagas. Realizamos o sequenciamento completo do exoma de 13 pacientes megaesôfago chagásico (MEC) e 45 indivíduos FI. Encontramos a variante de um único nucleotídeo com dano *missense* MRPS18B 688C>G P230A, em 5 dos 13 pacientes MEC, enquanto a variante apareceu em um dos 45 pacientes FI [P = 0,015, OR = 11, IC de 95% (1,56- 128,6)]. Um dos 5 pacientes MEC é homocigoto, enquanto os outros quatro MEC e o portador FI são heterocigotos. Analisamos a função mitocondrial de linhagens de células linfoblastóides transformadas por EBV em resposta a IFN- $\gamma$ . Nossos achados demonstram que os portadores MEC da variante MRPS18B 688C>G P230A exibem níveis aumentados de nitrito e proteínas nitradas; e o paciente homocigoto (G/G) níveis reduzidos de produção de ATP e aumento de superóxido mitocondrial em comparação com pacientes MEC que não carregavam a variante. Os resultados sugerem que mutações em genes mitocondriais podem ser um fator de maior susceptibilidade à disfunções mitocondriais e estresse nitro-oxidativo induzidos por citocinas como IFN- $\gamma$ . Nossa hipótese é que em pacientes portadores de mutações mitocondriais homocigotas e heterocigotas, as citocinas produzidas localmente podem causar disfunção mitocondrial em neurônios no plexo mioentérico esofágico, levando à alteração da motilidade e megaesôfago.

**Descritores:** megaesôfago chagásico; mitocôndrias; mutação mitocondrial; disfunção mitocondrial; interferon-gamma; MRPS18B; doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

Alcântara Silva KD. *Genetics and pathogenesis of chagasic megaesophagus: identification of pathogenic variants and investigation of their functional impact* [dissertation]. São de Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Chagas disease (CD), caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affects 5-8 million people worldwide, and around 1/3 develop chronic cardiac (CCC) or digestive disease (megaesophagus/megacolon), while the majority remain asymptomatic, in the so-called indeterminate form of Chagas disease (ASY). Host genetics and local production of cytokines IFN- $\gamma$  seem to play an important role in disease progression, but little is known about the role of genetics in susceptibility to the digestive forms of CD. Our group has recently found that most CCC cases in families with multiple Chagas disease patients carry damaging mutations in mitochondrial genes. We here searched for mitochondrial mutations associated with the digestive form of Chagas disease. We performed whole exome sequencing of 13 chagasic megaesophagus (CME) and 45 ASY individuals. We found the missense damaging single nucleotide variant MRPS18B 688C>G P230A, in 5 out of the 13 CME patients, while the variant appeared in one out of 45 ASY patients [P=0.015, OR=11, 95% CI (1.56-128.6)]. One of 5 CME patients was homozygous while the other four CME and the ASY carrier were heterozygous. We analysed the mitochondrial function of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines in response to the inflammatory cytokine IFN- $\gamma$ . We found the CME carriers of MRPS18B 688C>G P230A displayed increased levels of nitrite and nitrated proteins; and the homozygous (G/G) patient showed reduced levels of ATP production and increased mitochondrial ROS production as compared with the not-carrying CME patients. These results suggest that mutations in mitochondrial genes may be a factor in increased susceptibility to mitochondrial dysfunction and nitro-oxidative stress induced by cytokines such as IFN- $\gamma$ . We hypothesize that in patients carrying homozygous and heterozygous mitochondrial mutations, locally produced cytokines may cause mitochondrial dysfunction in neurons in the esophageal myenteric plexus, leading to motility alteration and megaesophagus.

**Descriptors:** chagasic megaesophagus; mitochondria; mitochondrial mutation; mitochondrial dysfunction; interferon-gamma; MRPS18B; Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*.

## 1. Introdução

### 1.1. Aspectos gerais da Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a tripanossomíase é endêmica em 21 países da América do Sul e afeta 6-8 milhões de pessoas em todo mundo, registrando aproximadamente 28 mil casos com 12 mil mortes anualmente (Thakare *et al.*, 2018). A transmissão se dá pela picada de vetores triatomíneos (Almeida *et al.*, 2008), podendo também ocorrer por transfusão de sangue ou transplante de órgãos de doador infectado, transmissão vertical de mãe para filho e por via oral por ingestão de alimentos e bebidas contaminados (Roscoe *et al.*, 2018).

Os pacientes infectados com *T. cruzi* desenvolvem as formas aguda e crônica da doença. A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por alta parasitemia, com produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Cunha-Neto and Chevillard, 2014). O *T. cruzi* estimula a imunidade inata com produção de citocinas e quimiocinas, bem como uma resposta imune adaptativa, gerando respostas potentes de anticorpos, assim como de células T CD4+ Th1 e CD8+ Tc1 produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Tais citocinas ativam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) via NADPH oxidases (Gunawardena *et al.*, 2019) como também a produção de óxido nítrico (NO) via regulação positiva da óxido nítrico sintase 2 (NOS2) (Rakshit *et al.*, 2014). A combinação de NO com ROS gera peroxinitrito (ONOO-), um potente agente oxidante e microbicida importante para o controle parcial do parasita e da infecção crônica persistente de baixo grau na célula (Rakshit *et al.*, 2014).

Na fase crônica, a persistência do *T. cruzi* mantém o estímulo para a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, assim como de células Th1 e Tc1 produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , importantes para o controle do parasita (Rodrigues *et al.*, 1999). Entretanto, a produção continuada de citocinas

inflamatórias na fase crônica da doença pode provocar dano tecidual e morte celular, com consequências patológicas (Chevallard *et al.*, 2018).

## 1.2. Doença digestiva – Megaesôfago Chagásico

Na fase crônica da doença de Chagas, parte dos infectados permanece assintomática, sem lesão cardíaca ou digestiva - a chamada forma indeterminada (FI) da doença, enquanto 30% dos pacientes acabam desenvolvendo lesões graves no coração - a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), com mortalidade associada à insuficiência cardíaca, distúrbios de condução elétrica cardíaca e arritmias (Bocchi *et al.*, 2017).

Cerca de 10% dos pacientes desenvolvem distúrbios de motilidade do tubo digestivo, mais frequentemente dilatações no esôfago e cólon (megaesôfago e megacólon, respectivamente). Os sinais clínicos mais comuns do megaesôfago são disfagia, regurgitação, perda de peso, tosse e halitose, efeitos secundários à contração do esfíncter esofágico inferior, transtornos da peristalse e dilatação esofágica (Mace *et al.*, 2012).

O megacólon tem como característica a constipação intestinal severa, consequência de distensão e dilatação segmentar do cólon sigmoide e/ou reto. As formas digestivas da doença de Chagas acarretam grande queda de qualidade de vida, constantemente exigindo intervenção cirúrgica (Teixeira, Nascimento, *et al.*, 2006; Teixeira, Nitz, *et al.*, 2006). O distúrbio de motilidade pode ocorrer menos regularmente em outros segmentos do tubo digestivo, incluindo distúrbios do esvaziamento gástrico (Meneghelli *et al.*, 1982; Da Silveira *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2009; Gibbons *et al.*, 2016). Em todas as apresentações das formas digestivas, há degeneração dos plexos mioentéricos e destruição dos neurônios que controlam a motilidade daquele segmento (Matsuda *et al.*, 2009).

No caso do megaesôfago chagásico (MEC), que é uma das etiologias da acalasia clínica, ocorre a perda dos neurônios pós-ganglionares inibitórios necessários para o relaxamento do esfíncter esofágico inferior e peristalse do esôfago (Matsuda *et al.*, 2009). No MEC, observa-se também um desequilíbrio



do sistema nervoso autônomo, com destruição predominantemente do componente parassimpático e disautonomia, levando a alterações de mobilidade esofágica e progressão do megaesôfago (Meneghelli *et al.*, 1982; Meneghelli, 1985; De Oliveira *et al.*, 1998; Matsuda *et al.*, 2009).

### **1.3. Patogenia da cardiopatia chagásica e megaesôfago chagásico**

Independente da forma clínica, pacientes cronicamente infectados com *T. cruzi* apresentam produção periférica de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  mais alta do que soronegativos (Cunha-Neto and Chevillard, 2014) e os pacientes CCC e MEC apresentam produção ainda mais abundante dessas citocinas em comparação com os pacientes da FI (Ribeiro *et al.*, 2008; Cunha-Neto and Chevillard, 2014; Sousa *et al.*, 2014).

Um importante infiltrado inflamatório rico em células T e macrófagos pode ser observado tanto no coração de pacientes com CCC (Higuchi *et al.*, 1987; Cunha-Neto and Chevillard, 2014; Chevillard *et al.*, 2018) quanto ao redor dos plexos mioentéricos esofagianos em pacientes com MEC (Dutra *et al.*, 2009). A severidade e frequência do infiltrado inflamatório estão relacionadas com a gravidade do acometimento cardíaco na CCC (Higuchi *et al.*, 1987). Foi observado um acúmulo de células T do tipo Th1, produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no miocárdio de pacientes portadores de CCC (Reis *et al.*, 1997; Abel *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2012; Rocha Rodrigues *et al.*, 2012; Nogueira *et al.*, 2014).

O IFN- $\gamma$ , importante para o controle do parasitismo, também pode provocar dano tecidual (Abel *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2014; Chevillard *et al.*, 2018). Animais transgênicos que super-expressam o IFN- $\gamma$  desenvolvem uma cardiomiopatia dilatada inflamatória mediada por TNF- $\alpha$  (Torzewski *et al.*, 2012), sugerindo que o IFN- $\gamma$  seja um fator chave no desenvolvimento da CCC. Além disso, dados do nosso grupo evidenciaram redução importante de enzimas mitocondriais envolvidas na produção de energia no miocárdio de pacientes CCC, acarretando disfunção mitocondrial no miocárdio (Teixeira *et al.*, 2011), o que poderia explicar o pior prognóstico da CCC frente a outras cardiomiopatias

dilatadas (Bocchi *et al.*, 2017). De forma similar, a intensidade do infiltrado inflamatório é inversamente proporcional ao número de neurônios no MEC (Da Silveira *et al.*, 2005). Isto sugere que a inflamação mediada por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  tem papel chave na patogenia dessas duas formas da doença de Chagas. A patogenia da CCC tem sido estudada em maior detalhe que a do MEC.

#### 1.4. Genética na doença de Chagas

A suscetibilidade diferencial de 30% dos infectados por *T. cruzi* para evolução a CCC e 10% para doença digestiva, permanecendo a maioria dos pacientes na forma indeterminada, sugere a participação da genética do hospedeiro. Esta possibilidade foi reforçada pelo achado de agregação familiar de casos de CCC (Zicker *et al.*, 1990).

Até hoje, foram publicados mais de 150 estudos de caso-controle na doença de Chagas, que apontam polimorfismos genéticos comuns em 76 genes candidatos, principalmente relacionados à resposta imune (Chevillard *et al.*, 2018). Entretanto, os estudos caso-controle, de associação com polimorfismos comuns, só identificam contribuições genéticas que são tipicamente pequenas, explicando menos de 5-10% do fenótipo de doenças complexas, como é o caso da CCC. Apenas dois desses estudos avaliaram polimorfismos genéticos associados às formas digestivas da doença de Chagas, nos genes Ficolin-2 (Luz *et al.*, 2013) e HLA-G (Dias *et al.*, 2015).

A escassez de dados evidencia a importância de se estudar os aspectos genéticos da forma digestiva da doença de Chagas. Resultados recentes do nosso grupo utilizou de forma pioneira a metodologia do sequenciamento do exoma (WES) para investigar variantes genéticas raras associadas à CCC, em famílias com múltiplos casos de doença de Chagas (Ouarhache *et al.*, 2021). Observamos que, em cada família, pacientes portadores de CCC compartilhavam entre si variantes raras heterozigotas, não sinônimas e patogênicas. Tais variantes genéticas estavam ausentes nos familiares portadores da FI, sem acometimento cardíaco. Das 25 variantes patogênicas

específicas para os pacientes CCC observadas, 11 ocorreram em genes mitocondriais e 14 em genes inflamatórios.

### **1.5. Paralelos entre mitocondriopatias genéticas e a doença de Chagas**

As mitocôndrias têm um papel central no fornecimento de energia, regulação metabólica e morte celular em resposta a estímulos nocivos (Rossignol *et al.*, 1999). As mitocondriopatias, causadas por variantes patogênicas homozigotas em genes mitocondriais codificados no núcleo e DNA mitocondrial, são as síndromes monogênicas mais comuns. Elas prejudicam gravemente o metabolismo energético e causam disfunção mitocondrial e deterioração funcional em tecidos com alta demanda metabólica, como músculo cardíaco, esquelético, tecido nervoso e fígado. Taís síndromes podem acometer órgãos ou tecidos individuais ou em combinações, e cada síndrome clínica é associada ao gene específico que porta a variante; a apresentação clínica pode ocorrer desde a infância até a idade adulta. Variantes em 250 dos cerca de 1500 genes mitocondriais diferentes já foram identificadas como causadoras das diversas síndromes (Finsterer, 2004; Kohda *et al.*, 2016). É interessante observar que 40% dos casos de mitocondriopatias apresentam evolução para cardiomiopatia, distúrbios de condução cardíaca e arritmias graves (Scaglia *et al.*, 2004; El-Hattab and Scaglia, 2016), e 15% para distúrbios de motilidade digestiva, inclusive megacólon e megaesôfago com denervação do plexo nervoso mioentérico, e distúrbios do sistema nervoso autônomo (Chelimsky *et al.*, 2005; Finsterer and Frank, 2017). Chama a atenção a semelhança da natureza e prevalência do acometimento cardíaco, digestivo e do sistema nervoso autônomo nas mitocondriopatias e na evolução da doença de Chagas, sugerindo que variantes genéticas patogênicas heterozigotas, que causem redução parcial da função mitocondrial, podem ter um papel na evolução diferencial da doença de Chagas, tanto para a CCC quanto para as formas digestivas.

### **1.6. Dano mitocondrial na doença de Chagas: possível papel do IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$**

Dados do nosso grupo indicam disfunção mitocondrial importante no miocárdio de pacientes CCC, com redução na expressão e atividade de diversas enzimas mitocondriais envolvidas na produção de energia, quando comparados a pacientes com cardiopatia dilatada idiopática não inflamatória ou isquêmica (Teixeira *et al.*, 2011; e Teixeira *et al.*, 2021). A disfunção mitocondrial é hoje descrita como um dos principais mecanismos patogênicos de doenças crônicas, como cardiopatias e doenças neurodegenerativas (Nicolson, 2014).

Em estudos de proteômica e transcriptoma do miocárdio de pacientes CCC, nosso grupo observou comprometimento de processos de manutenção e função das mitocôndrias, como biogênese mitocondrial, tradução e controle de qualidade mitocondrial e beta-oxidação lipídica mais intensa do que em cardiomiopatias não inflamatórias (Teixeira *et al.*, 2011).

Outros estudos mostraram que citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  provocam dano mitocondrial em diversos tipos celulares (Lewis *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2010; Silva Nunes *et al.*, 2021). O IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , abundantemente produzidos na doença de Chagas em resposta ao estímulo perene do *T. cruzi*, causam redução no metabolismo oxidativo, na expressão de enzimas do metabolismo energético, na atividade da beta-oxidação lipídica, na produção de ATP (adenosina trifosfato) mitocondrial e no potencial de ação de membrana mitocondrial (MMP) por uma via de sinalização dependente de NF- $\kappa$ B (Kalovidouris *et al.*, 1993; Luss *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2007; Mariappan *et al.*, 2010; Bocchi *et al.*, 2017; Meyer *et al.*, 2017; Ni *et al.*, 2019). IFN- $\gamma$  induz a geração de superóxido aumentando a expressão de NADPH oxidases (Rada and Leto, 2008) e induzindo a geração de NO por regulação positiva do óxido nítrico sintase (NOS2) (Geng *et al.*, 1992). O superóxido reage com o NO para produzir peroxinitrito, espécie nitogênica altamente reativa, que pode destruir o *T. cruzi*, mas também pode causar danos às células hospedeiras e às mitocôndrias.

Existem poucos trabalhos na literatura que possam explicar a genética do paciente com MEC e o porquê somente uma parte de cerca de 10% vem a desenvolver a forma clínica da doença. Como citado anteriormente, pacientes com CCC possuem variantes raras heterozigotas patogênicas associadas a genes mitocondriais e sabe-se que existem doenças patogênicas associadas a mutações homozigotas no DNA mitocondrial que levam a doenças como distúrbios de motilidade digestiva, cardíaca e neurológicas. Entender a patologia por trás do megaesôfago e o possível envolvimento das mitocôndrias na evolução do MEC é de extrema importância para possíveis tratamentos e melhoria na qualidade de vida destes pacientes.

### **1.7. Justificativa**

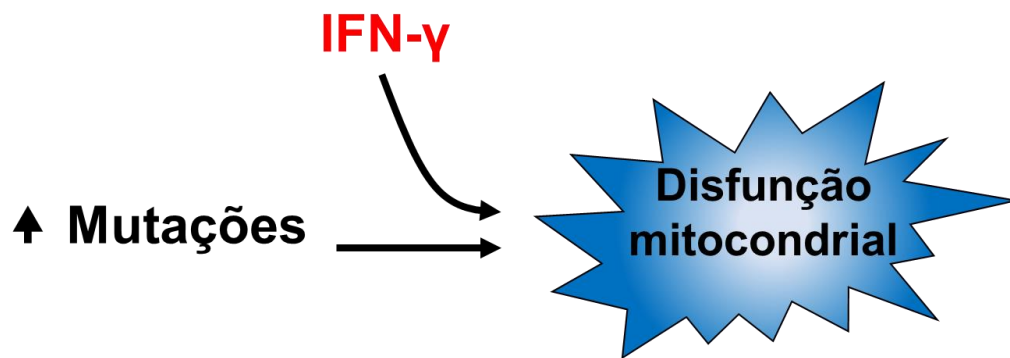
O megaesôfago chagásico é uma doença negligenciada e pouco relatada. A literatura referente ao MEC não é muito vasta, assim, é de extrema importância buscar entender os mecanismos moleculares e imunológicos que levam ao desenvolvimento do megaesôfago. Sabe-se que existem doenças mitocondriais homozigotas que levam a doenças que afetam o trato gastrointestinal (TGI), neurônios e músculos, órgãos que precisam de grande demanda energética. Em estudos anteriores do nosso grupo, identificamos através do sequenciamento do exoma (WES) de 5 famílias que pacientes com a doença de Chagas com CCC possuem mais mutações não sinônimas heterozigotas e patogênicas em genes mitocondriais (Ouarhache *et al.*, 2021). Além disso, nossos estudos de proteômica identificaram que em pacientes com CCC o metabolismo mitocondrial se encontra comprometido, onde foi possível detectar alteração da expressão de componentes da fosforilação oxidativa, do complexo creatina quinase, e da beta-oxidação lipídica que são essenciais para a produção de ATP. Além, resultados da literatura e do nosso grupo mostram que o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , abundantemente produzidos na doença de Chagas, são capazes de causar disfunção mitocondrial de forma direta (Silva Nunes *et al.*, 2021). Estes dados, obtidos de pacientes com CCC, nos fizeram assumir que mutações em genes

associados ao metabolismo energético e mitocondrial podem ter um papel relevante na patogenia do megaesôfago chagásico.

Para avaliar nossa hipótese, nós sequenciamos o exoma de portadores MEC e da forma indeterminada da doença de Chagas. Avaliamos a existência de disfunção mitocondrial *ex vivo* nos pacientes, medindo o marcador plasmático FGF-21, utilizado no *screening* diagnóstico para mitocondriopatias (Liang *et al.*, 2014). Como um segundo marcador plasmático, avaliamos a quantidade de mtDNA de circulante de três genes mitocondriais no plasma (Zhang *et al.*, 2010; Puskarich *et al.*, 2012). Também avaliamos a interação de IFN- $\gamma$  como provável causador de disfunção mitocondrial em células linfoblastóides imortalizadas pelo vírus de Epstein-Barr (EBV-LCL), obtidas dos pacientes MEC. As EBV-LCL são fontes contínuas de células para estudos genéticos e funcionais (Hussain and Mulherkar, 2012) e têm sido amplamente utilizadas para o estudo de função mitocondrial em mitocondriopatias (Castagna *et al.*, 2007; Van Bergen *et al.*, 2011). Após incubação em presença ou ausência de IFN- $\gamma$ , a função mitocondrial nas EBV-LCL foi medida por espectrofluorimetria e microscopia. Medimos a produção de espécies reativas de oxigênio, produção de ATP, nitrito (indicador de NO), proteínas nitradas (indicador de peroxinitrito) e viabilidade celular (Ohkawa *et al.*, 1979; Bryan and Grisham, 2007; Zhou *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013; Vujacic-Mirski *et al.*, 2020).

## 2. Hipótese

Pacientes portadores de MEC apresentam mais mutações patogênicas em genes mitocondriais quando comparados com pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas, e por isso são mais susceptíveis a apresentarem disfunção mitocondrial em presença dos níveis aumentados de IFN- $\gamma$  associados à doença de Chagas.



**Figura 1 Esquema da hipótese deste trabalho**

Pacientes com MEC apresentam disfunção mitocondrial devido a interação da citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$ , reduzindo a função mitocondrial em portadores de mutações em genes mitocondriais. (Fonte: Autoria própria)

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Caracterizar o perfil genético, identificar mutações mitocondriais, avaliar marcadores periféricos de disfunção mitocondrial e avaliar a ação de IFN- $\gamma$  em linhagens celulares obtidas de pacientes que manifestam a forma digestiva da doença de Chagas.

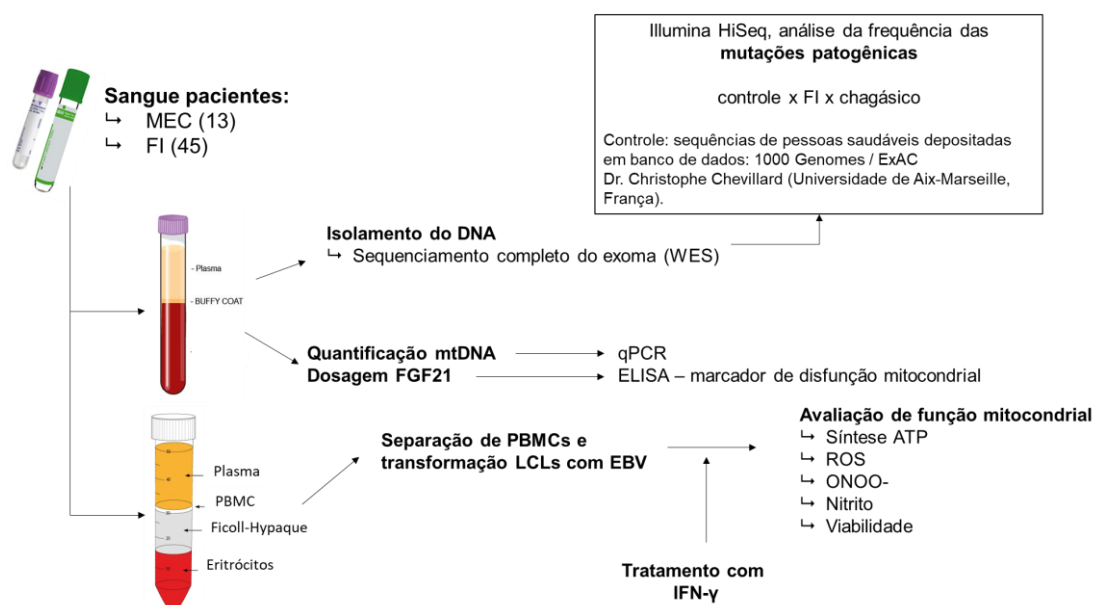
#### **3.2. Objetivos específicos**

- 3.2.1. Realizar o sequenciamento completo do exoma para identificar polimorfismos patogênicos em genes mitocondriais associados exclusivamente ao megaesôfago chagásico, bem como quantificar o número de mutações patogênicas no grupo MEC e no grupo de forma indeterminada (FI);
- 3.2.2. Imortalizar as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com o vírus EBV para obtenção de EBV-LCL dos pacientes MEC;
- 3.2.3. Avaliar a função mitocondrial das EBV-LCL dos pacientes MEC, portadores ou não de mutações mitocondriais em presença e ausência de IFN- $\gamma$ ;
- 3.2.4. Quantificar o DNA mitocondrial no plasma e do *buffy coat* dos pacientes MEC por PCR em tempo real;
- 3.2.5. Quantificar o FGF-21 no plasma dos pacientes MEC por ensaio imunoenzimático (ELISA).



## 4. Método

### 4.1. Desenho experimental



**Figura 2 Desenho experimental**

O sangue de pacientes foi coletado em tubos tratados com EDTA e heparina para obtenção do plasma, *buffy coat* e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). A partir do *buffy coat* foi feito o isolamento do DNA para sequenciamento completo do exoma (WES) em colaboração com o Dr. Christophe Chevillard. O plasma foi usado para quantificação de biomarcadores plasmáticos como o FGF-21 por ELISA e mtDNA através do PCR em tempo real com genes mitocondriais. As PBMCs foram usadas para obtenção de linhagens EBV-LCLs para avaliação de aspectos da função mitocondrial em resposta ao tratamento com IFN-γ. (Fonte: Autoria própria)

### 4.2. Pacientes

Pacientes portadores da forma digestiva da doença de Chagas (megaesôfago, MEC) provenientes da Divisão de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP foram convidados para participar do estudo. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi aplicado caso o paciente quisesse participar do estudo (ANEXO I). Todos os pacientes selecionados para este estudo fizeram pelo menos dois testes sorológicos (ELISA e/ou Imunofluorescência indireta – IFI realizado pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da FMUSP) para comprovar se os mesmos eram positivos ou negativos para a doença de Chagas.

O grupo controle foi composto por pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas (FI) recrutados no Ambulatório de Doença de Chagas no Núcleo de Cardiopatias gerais do Instituto do Coração - HCFMUSP. Para identificação das amostras dos pacientes foi utilizada a seguinte nomenclatura: MEC para pacientes com megaesôfago chagásico (n=13, média da idade 61,31 (46-74) anos, 53,8% homens e 46,2% mulheres) e FI para pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas (n=45, média da idade 64 (50-96) anos, 44,2% homens e 55,8% mulheres) (Tabela 1).

**Tabela 1 Informações dos pacientes que compõem os grupos estudados.**

<b>Amostra</b>	<b>Grupo</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>
MEC01	MEC	74	F
MEC02	MEC	70	M
MEC03	MEC	48	M
MEC04	MEC	47	F
MEC05	MEC	47	F
MEC06	MEC	73	M
MEC07	MEC	66	F
MEC08	MEC	68	M
MEC09	MEC	63	F
MEC10	MEC	65	M
MEC11	MEC	66	F
MEC12	MEC	64	M
MEC13	MEC	46	M
DP141	FI	59	M
ICB02	FI	61	F
ICB03	FI	69	F
ICB04	FI	63	M
ICB06	FI	79	F
IC34EI	FI	60	M
IC44EI	FI	71	M
IC55EI	FI	64	F
IC57EI	FI	50	F
IC61EI	FI	59	M
IC63EI	FI	66	F
IC66EI	FI	62	M
IC68EI	FI	62	F
IC69EI	FI	50	F
IC68EI	FI	68	M

IC69EI	FI	96	F
IC88EI	FI	55	F
IC89EI	FI	60	F
IC92EI	FI	72	M
IC93EI	FI	71	M
DP034I	FI	-	M
DP048I	FI	-	M
IC99EI	FI	54	F
IC100EI	FI	64	F
IC102EI	FI	72	M
IC104EI	FI	70	M
IC105EI	FI	65	F
UB167	FI	60	F
UB216	FI	72	F
UB242	FI	80	F
DP123	FI	62	F
DP130	FI	70	F
DP135	FI	62	M
DP136	FI	59	F
DP142	FI	69	F
DP164	FI	68	F
DP166	FI	70	F
DP174	FI	69	M
DP179	FI	69	M
DP184	FI	71	M
IC261E	FI	52	F
IC44EI	FI	71	M
IC55EI	FI	64	F
IC61EI	FI	59	M
IC255E	FI	62	F

### 4.3. Exoma dos pacientes com MEC e FI

O DNA foi extraído do sangue total coletado em tubo EDTA de pacientes com DC com o QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen, EUA). O sequenciamento do exoma dos 13 pacientes com MEC e 45 pacientes FI foi realizado pela Genewiz em colaboração com o Dr. Christophe Chevillard (Paris, França). Sequências adaptadoras e nucleotídeos de baixa qualidade foram removidos usando o *software Trimmomatic* versão 0.36. Os *contigs* foram alinhados ao genoma de referência *Homo sapiens* GRCh37 usando o Edico Genome Dragen *pipeline*. Os

arquivos VCF (*variant call format*) foram usados para anotações e priorização de mutações no *software Variant Annotation and Filter Tool* (VarAFT, versão 2.06, plataforma *Windows* 10, <https://varaft.eu>), que gera um arquivo para cada indivíduo com uma lista de todas as variantes detectadas a partir de vários bancos de dados, como 1000 Genomes e ExAC. Variantes patogênicas foram selecionadas usando os seguintes critérios com base nos marcadores que foram considerados significativos: 1) manutenção de variantes localizadas em exon e zonas de *splicing*; 2) eliminação de variantes sinônimas; 3) índice de patogenicidade através da classificação por quatro diferentes bancos de dados (SIFT, UMD e dois Polyphen), sendo a mutação considerada patogênica em pelo menos 3 deles; 4) significância estatística da mutação. Também foi calculado o score CADD de patogenicidade (valores maiores que 20; (Ouarhache *et al.*, 2021).

Para validação do polimorfismo genético de MRPS18B em pacientes MEC e FI, um fragmento do gene MRPS18B foi amplificado por PCR em tempo real usando os seguintes iniciadores F 5'-TACCTCTCATGGGGCTGTGAGT-3' e R 5'-TTCCGCTGGTGTCTAGGGGG-3'. O produto da amplificação foi submetido ao sequenciamento Sanger para confirmar a presença do polimorfismo (Genewiz, Leipzig, Alemanha). Linhagens de células linfoblastóides transformada por EBV (EBV-LCL) de quatro pacientes portadores de MRPS18B P260A (um homocigoto e os outros três heterocigotos) e três pacientes MEC sem a variante foram transformadas para as análises funcionais abaixo.

#### **4.4. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)**

As células mononucleares do sangue periférico dos pacientes MEC carregando a mutação mitocondrial MRPS18B foram purificadas a partir de 20 ml de sangue coletados em tubos tratados com heparina dos pacientes descritos no tópico 4.2. O sangue foi diluído em solução salina 0,9% (diluição 1:1) e sobreposta cuidadosamente sobre o Ficoll-Hypaque® (Amersham Biosciences, Suécia) e submetido a centrifugação a 800 x g (sem freio e sem aceleração) por

30 minutos para separação das PBMCs das hemácias e do plasma. As PBMC ficam na interfase e foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferidas para um novo tubo contendo solução salina 0,9% e as células foram submetidas a mais três processos de lavagens em salina e centrifugação (300 x g por 8 min) para remover completamente o Ficoll-Hypaque e eliminar plaquetas. As PBMC coletadas foram ressuspensas em soro fetal bovino (FBS, Gibco®, Nova Iorque, EUA) para contagem.

A viabilidade das células foi avaliada utilizando azul de tripan 0,4% (Invitrogen, Nova Iorque, EUA) e aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/ml foram criopreservadas em 90% de FBS e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, EUA) para serem posteriormente imortalizadas utilizando EBV, conforme descrito no tópico 4.6. As células foram armazenadas em nitrogênio líquido até o dia da imortalização.

#### **4.5. Produção de sobrenadante rico em partículas virais do vírus Epstein-Barr provenientes da linhagem celular B95.8**

Para enriquecimento do sobrenadante com partículas virais do vírus Epstein-Barr (EBV), aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/ml de macaco B95.8, provenientes do Banco de células do Rio de Janeiro, ricas em partículas virais do EBV, foram descongeladas em tubo cônico de 15 ml contendo 8 ml de meio de crescimento específico R15 (RPMI 1640 -Gibco®, Nova Iorque, EUA) suplementado com 15% FBS inativado (Life Technologies™, Nova Iorque, EUA), 10 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de Anfotericina B (Thermo Fisher Scientific, EUA) e as células foram centrifugadas a 125 x g por 8 min para remoção completa do DMSO. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspendido a uma densidade de  $0,2 \times 10^6$  de células/ml em meio R15 em garrafa de 25 cm<sup>2</sup> de superfície de crescimento (T25). As células foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> por sete dias e todo conteúdo foi transferido para uma garrafa nova de 75 cm<sup>2</sup> de superfície de crescimento (T75) já contendo 10 ml de meio R15. Uma vez por semana, 10 ml de meio de crescimento específico foram adicionados até atingir

o volume final de 50 ml na garrafa. Com o volume final de 50 ml, a garrafa foi totalmente fechada e mantida na estufa a 37 °C por 14 dias ou até que o meio estivesse com pH ácido com o objetivo de causar morte celular. O meio coletado e filtrado através de um filtro 0,22 µm para eliminar *debris* causados pela morte celular e retirar qualquer eventual célula que ainda estivesse viva. Alíquotas de 1 ml do sobrenadante foram congeladas e armazenadas a -80 °C.

#### **4.6. Imortalização de PBMCs com o vírus EBV para obtenção de EBV-LCLs de pacientes**

As PBMC isoladas de todos os pacientes foram infectadas com o vírus EBV para transformação das células B em LCL (linhagem de células linfoblastóides).

As PBMC foram descongeladas e contadas utilizando azul de tripan 0.4%. Para cada  $1,0 \times 10^6$  de PBMC viáveis foram utilizados 400 µL de meio R20 (RPMI 1640 -Gibco®, Nova Iorque, EUA) suplementado com 20% de FBS inativado (Life Technologies™, Nova Iorque, EUA), 10 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de Anfotericina B (Thermo Fisher Scientific, EUA), 200 µL do sobrenadante produzido a partir da célula B95.8 e 2,4 µL de ciclosporina A 1,0 mg/ml (Sigma-Aldrich, EUA) em uma placa de 1,9 cm<sup>2</sup> de superfície (placa de 24 poços). As células foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> por sete dias sem perturbar. Foram feitos aproximadamente três poços por paciente.

No sétimo dia foram adicionados mais 250 µL de meio R20 em cada poço e incubado por mais sete dias em estufa a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> sem perturbar. No décimo quarto dia foi possível visualizar a formação de grumos (sinal de que as células foram imortalizadas) e todo o conteúdo dos três poços foi transferido para garrafa 12,5 cm<sup>2</sup> (T12,5) e foi adicionado 1 ml de meio R20 e deixado em estufa a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub>. A garrafa foi vistoriada a cada dois dias e meio R20 era adicionado aos poucos quando necessário ou quando observado acidificação do meio.

Quando o volume da cultura atingiu 4 ml, todo o conteúdo foi transferido para um tubo cônico de 15 ml estéril e completado até 5 ml com meio R20. As células foram centrifugadas a 100 x g por 10 minutos em temperatura ambiente e após, descartado o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 1 ml de meio R15 e foi feita a contagem com câmara de Neubauer e azul de tripan 0,4% (Invitrogen, Nova Iorque, EUA). As células foram mantidas a uma concentração de  $0,4 \times 10^6$  de células viáveis/ml em meio R15.

Ao atingir  $20 \times 10^6$  as células foram criopreservadas com 90% de FBS (Gibco®, Nova Iorque, EUA) e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) em nitrogênio líquido.

#### **4.7. Avaliação de mtROS em EBV-LCLs**

Vinte e quatro horas antes do experimento, as células EBV-LCL de cada paciente foram centrifugadas a 100 x g por 10 minutos e a contagem foi feita com câmara de Neubauer e azul de tripan 0,4% (Invitrogen, Nova Iorque, EUA). Após, as células foram ressuspensas em meio R15 na concentração de  $0,4 \times 10^6$  viáveis por ml.

No dia do experimento, as células foram centrifugadas a 100 x g por 10 minutos e depois ressuspensas com 2 ml de meio R15 e a contagem foi feita com câmara de Neubauer e azul de tripan 0,4%. Em seguida, foram semeados  $15 \times 10^4$  por ml de EBV-LCL por paciente e condição de tratamento em placas de 96 poços estéril e fundo em U com 150  $\mu$ L de meio R15. As células foram estimuladas com a citocina pró-inflamatória interferon  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) na concentração de 25 ng/ml e deixadas em cultura por 24 horas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o estímulo, as células foram transferidas para placas de 96 poços em fundo em V para remoção do meio R15 através de centrifugação a 300 x g por 5 minutos e suspensas em tampão salino Hank's com Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> 1x pH 7.4 (HBSS<sup>++</sup>) contendo 5  $\mu$ M de *MitoSOX™ Red* (Thermo Fisher Scientific, EUA), sonda fluorescente específica para superóxido mitocondrial. As células foram então incubadas por 10 minutos na estufa a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub>.

Após, a placa foi centrifugada a 300 x g por 5 minutos e as células ressuspensas em 150  $\mu\text{L}$  de HBSS<sup>++</sup> contendo 3,5  $\mu\text{M}$  de Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, EUA) para marcação do núcleo e 1 gota por ml de NucGreen (ReadyProbes, Thermo Fisher Scientific, EUA) para marcação de viabilidade. Foram transferidos  $3 \times 10^4$  de células por poço/condição em 100  $\mu\text{L}$  de HBSS<sup>++</sup> para uma placa de 96 poços compatível para imagem (Corning) e centrifugada a 300 x g por 2 minutos sem aceleração e baixa frenagem.

As imagens foram capturadas no sistema de *High Content Screening* (HCS, ImageXpress, Molecular Devices) em magnificação de 200x, cinco campos por poço, com os filtros DAPI (núcleo), FITC (núcleo de células mortas) e texas red (mtROS).

#### **4.8. Tratamento de EBV-LCLs de pacientes com IFN- $\gamma$ por 48 horas**

Para quantificação de nitrito, ATP e de proteínas nitradas,  $50 \times 10^4$  das células EBV-LCL de cada paciente foram plaqueadas em 2,5 ml de meio R15 sem vermelho fenol em placas de 6 poços com tratamento de 25 ng/ml de IFN- $\gamma$  por 48 horas. Após o tratamento, as EBV-LCL foram coletadas, divididas e transferidas em dois microtubos de 1,5 ml e centrifugados a 800 x g por 5 minutos. O sobrenadante das células foi coletado em microtubos de 1,5 ml e armazenados no freezer -80 °C até uso para quantificação do nitrito.

O *pellet* formado nos dois microtubos de 1,5 ml contendo as células foram processados de formas diferentes, mantendo os tubos sempre no gelo. As células que foram usadas para a quantificação de ATP foram ressuspensas em 200  $\mu\text{l}$  de tampão TE (100 mM Tris e 4 EDTA, pH 7.5). Após, as amostras foram aquecidas a 95 °C por 7 minutos para causar lise celular e centrifugadas a 20800 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e mantido a -20 °C até uso para quantificação do ATP.

O outro tubo com o *pellet* de células foi feito um extrato proteico para avaliação de proteínas nitradas. Para isso, as células foram ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (HEPES 10 mM, sacarose 0,32 M, EDTA 0,1 mM, ditiotreitól (DTT) 1,0 mM, leupeptina 5,25  $\mu\text{L}$ , aprotinina 0,3  $\mu\text{M}$  e fluoreto de



metilfenilsulfonil (PMSF) 125 µg/ml em pH 7,4 e submetidas a lise com o auxílio de um sonicador VirSonic 100 (Virtis) por 3 ciclos de 10 segundos com 15 segundos de intervalos e centrifugado a 10000 x g por 30 minutos a 4 °C para retirada dos debrís celulares. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad, EUA) usando albumina bovina sérica (BSA) para curva padrão. As amostras foram armazenadas a -80 °C até uso para quantificação de proteínas nitradas.

#### **4.9. Quantificação da produção de nitrito, ATP e proteínas nitradas**

A quantificação do nitrito no sobrenadante foi realizada por meio do *Griess Reagent Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e a produção de ATP foi quantificada pelo *ATP Determination Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a quantificação das proteínas nitradas, 5 µg da proteína foram adicionados sob vácuo à uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm com a ajuda de um aparato de dot blot HYBRID DOT MANIFOLD (Bethesda Research Laboratories, EUA). Em seguida, a membrana foi secada a ar em termobloco *Eppendorf ThermoMixer®* (Thermo Fisher Scientific, EUA) a 60 °C por 1 hora e então bloqueados com 5% *Blotting- Grade Blocker* (Bio-Rad, EUA) + Solução salina tamponada com Tris-Tween (TBS-T – NaCl 120mM, Tris 20mM, Tween20 0,05%) por 2 horas a temperatura ambiente (TA), com agitação. Depois, a membrana foi lavada 3 vezes durante 5 minutos sob agitação com TBS-T. A membrana foi então incubada com 1:1000 do anticorpo primário 3 nitrotirosina livre (3-NT) em BSA 0,3% + TBS-T durante a noite a 4 °C sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes e incubada com 1:10000 de anticorpo secundário IRDye 680RD Donkey anti-mouse 700nm (LI-COR, EUA) em 0,3% BSA + TBS-T por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação e protegida da luz.

Em seguida, a membrana foi lavada três vezes novamente e a fluorescência foi adquirida com o scanner Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR, EUA) no canal de 700nm. A normalização foi feita pela coloração de

Ponceau S adquirida no leitor de imagens ImageQuant LAS-400 (GE Healthcare, EUA).

#### 4.10. Quantificação do DNA mitocondrial no plasma e *buffy coat*

Para quantificação do DNA mitocondrial plasmático e do *buffy coat*, cerca de 15 ml do sangue dos pacientes coletadas nos tubos de EDTA foram centrifugadas a 800 x g por 10 minutos e submetido a uma nova centrifugação a 16000 x g por 10 minutos para assegurar a precipitação de células e de organelas. Em seguida, o *buffy coat* e o plasma foram coletados e somente o plasma foi filtrado utilizando um filtro 0,22 µm para eliminação das plaquetas e debris celulares.

O DNA mitocondrial (mtDNA) foi isolado a partir de 200 µL do plasma utilizando o kit *QIAmp DNA Micro Kit* (Qiagen, EUA) conforme as instruções do fabricante. O DNA do *buffy coat* foi isolado a partir de 3 ml utilizando o kit *QIAmp DNA Blood Maxi Kit* (Qiagen, USA) conforme as instruções do fabricante. O mtDNA isolado do plasma e o DNA isolado do *buffy coat* foi quantificado utilizando Nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific) e foram avaliados a pureza do DNA genômico através da densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) nos comprimentos de ondas de 260 nm (absorbância do DNA), 280 nm (proteína) e 230 nm (polissacarídeos).

A reação de PCR foi feita utilizando os iniciadores (Tabela 2) e o reagente *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA), no termociclador *QuantStudio 12k Flex* (Applied Biosystems, EUA) com a seguinte programação: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos; 40 ciclos a 95 °C 15 segundos, 55 °C por um minuto, 75 °C por 30 segundos. Avaliação da especificidade da PCR foi feita com base no decaimento da fluorescência do *SYBR Green* pela curva de *melting*.

A quantificação absoluta do mtDNA no plasma foi feita com base na curva padrão de diluições seriadas de uma quantidade conhecida de *amplicons* específicos para os genes mitocondriais MT-CYTB, MT-ND1 e MT-COXIII (Tabela 2). Os *amplicons* foram gerados em uma PCR e em seguida fracionados

eletroforeticamente em gel de agarose 2% em Tris-Acetato-EDTA 1x (TAE) por 2 horas a 100 Volts e purificados utilizando o kit *QIAquick Gel extraction* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração dos padrões foi determinada pela absorbância a 260 nm (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) e as concentrações desconhecidas de mtDNA foram interpoladas com a curva padrão com concentrações conhecidas, usando o valor de  $C_T$  (*cycle threshold*) da amostra desconhecida (Zhang *et al.*, 2010; Puskarich *et al.*, 2012). Só foram consideradas reações de boa qualidade aquelas em que o decaimento da fluorescência da titulação do *amplicon* fornecesse uma eficiência entre 90-110% (slope -3,10 e -3.60, fórmula: Eficiência =  $(10^{(-1/\text{slope})}) - 1$ )

Para a quantificação do mtDNA do *buffy coat* foram utilizados os mesmos genes mitocondriais (Tabela 2) e um gene endógeno. Os cálculos da quantificação relativa foram realizados utilizando a fórmula  $2^{2eDCt}$ , onde  $DCt = Ct(\text{DNA nuclear}) - Ct(\text{mtDNA})$ .

A reação de PCR foi conduzida em triplicata e foi utilizado 1 ng do DNA de cada paciente.

**Tabela 2 Sequências dos iniciadores para amplificação do DNA mitocondrial**

Gene	Nome	Código (NCBI)	Sequência 5'-3'
MT-CYTB	Citocromo B humano	AP008920.1	Fw: ATGACCCCAATACGCAAAT Rv: CGAAGTTTCATCATGCGGAG
MT-COXIII	Subunidade III da citocromo C oxidase humano	AY495156.2	Fw: ATGACCCACCAATCACATGC Rv: ATCACATGGCTAGGCCGGAG
MT-ND1	NADH desidrogenase humano	DQ092356.1	Fw: ATACCCATGGCCAACCTCCT Rv: GGGCCTTTGCGTAGTTGTAT

Sequências: Fw – Forward , Rv – Reverse.

#### 4.11. Detecção de FGF-21 no plasma

Para a detecção do FGF-21 foi usado o plasma dos pacientes MEC que apresentaram a mutação em gene mitocondrial em homozigose, heterozigose e

pacientes que não apresentaram mutação. Cerca de 15 ml do sangue dos pacientes foi coletado em tubos de EDTA e centrifugados a 800 x g por 10 minutos e após, submetidos a uma nova centrifugação a 16000 x g por 10 minutos para assegurar a precipitação de células e de organelas. Em seguida, o plasma foi filtrado utilizando filtro 0,22 µm para eliminação das plaquetas e debris celulares e usados para o ensaio.

Foram usados anticorpos específicos contra FGF-21 humano por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, EUA) e a absorbância das amostras foi medida no comprimento de onda 450 e 540 nm utilizando o leitor de placas SpectraMax (Molecular Devices). As amostras de plasma foram diluídas 1:2 em solução reagente indicada pela empresa e a absorbância de 100 µL do plasma diluído foi interpolado na curva padrão de quantidades conhecidas de FGF-21 de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante.

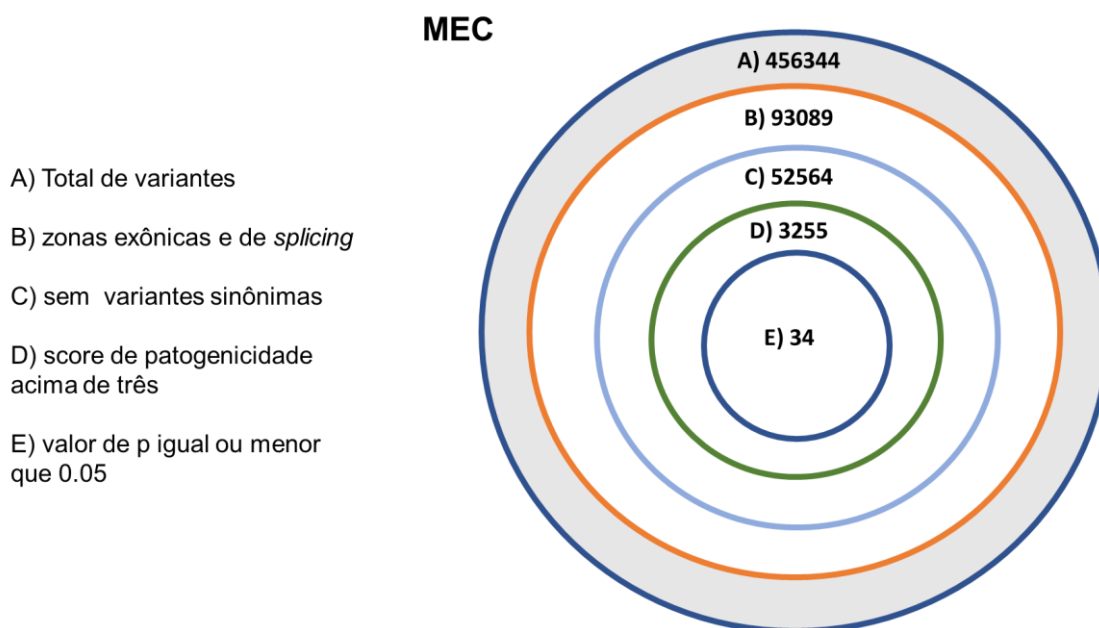
#### **4.12. Análise estatística**

A análise dos dados e estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 8 (Windows 10). Para comparação entre os pacientes foi utilizado o teste de Mann-Whitney a partir da média das estatísticas na quantificação do mtROS, nitrito, ATP e proteínas nitradas para cada paciente. Após, foi feita uma segunda análise por grupo C/C (sem mutação), C/G (heterozigoto) e G/G (homozigoto) utilizando a média de cada análise. Para esta segunda análise, usamos o teste ANOVA two-way. Para os dados de análise de exoma foram utilizadas duas estatísticas: teste de Fisher e qui-quadrado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Para avaliação do mtDNA no plasma e *buffy coat* e FGF-21 foi usado somente as medianas de cada paciente.

## 5. Resultados

### 5.1. Sequenciamento do exoma em pacientes MEC e FI

As análises da frequência das variantes genéticas raras e patogênicas entre os grupos MEC (n = 13) e de FI (n = 45) foram feitas usando o *software* VarAFT. Os polimorfismos genéticos identificados no sequenciamento dos exoma foram priorizados com base nos marcadores que foram encontrados em zonas exônicas e de *splicing*, eliminação de variantes sinônimas, score de patogenicidade acima de três e valor de p igual ou menor que 0,05. Com a priorização de marcadores significantes foram encontradas 34 variantes nos pacientes MEC (Figura 3).



#### Figura 3 Variantes selecionadas de pacientes MEC.

Representação esquemática das etapas utilizadas para seleção das variantes patogênicas e significativas a partir dos dados obtidos no sequenciamento completo do exoma de 13 pacientes MEC. Após análise de frequência de variantes genéticas raras e patogênicas e priorização de variantes foram identificadas 34 variantes genéticas em pacientes MEC. (Fonte: Autoria própria)

Para avaliar se os pacientes com megaesôfago chagásico (MEC) apresentavam mutações prejudiciais em genes mitocondriais, fizemos um sequenciamento completo do exoma de 13 pacientes com MEC e 45 pacientes com a forma indeterminada (FI). Encontramos polimorfismos missense

patogênicos prejudiciais em 34 genes (Tabela 3), entre elas a variante 688C>G no gene MRPS18B (cromossomo 6p21.33) que codifica uma proteína ribossomal mitocondrial e que altera o aminoácido prolina para alanina na posição 230 (P230A).

A variante MRPS18B (388C>G, P230A) foi identificada em 38% dos pacientes MEC (em 5 dos 13 pacientes MEC testados) e 2% dos pacientes FI (1 de 45), [P=0,015, OR=11, 95%CI (1,56-128,6)] (Tabela 5, Tabela 6). Um dos cinco pacientes MEC portadores da mutação é homocigoto (G/G), enquanto os outros 4 portadores MEC e o portador FI são heterocigotos (C/G). Na Tabela 4 é possível ver a distribuição das 34 mutações apresentadas por cada indivíduo dos pacientes MEC. Na população global, a variante G **rs34315095** tem uma frequência de 2,12% (n amostral 113878, ALFA Allele Frequency, dbSNP). Essa variante é também descrita no banco de dados 1000 Genomes (n=5008), onde o genótipo C/G foi identificado em 4,3% (n=218) e G/G em 0,1% dos indivíduos (n=6).

**Tabela 3 Variantes patogênicas missense associadas a MEC em comparação com pacientes FI.**

Gene	Função	Crom.	Posição	Ref.	Alt.	AA	Valor de p	CADD
MRPS18B	Mito.	Chr6	30593485	C	G	P230A	3.00E-02	27.9
GNAO1	Infla.	Chr16	56377748	A	C	K317N	1.13E-03	28.8
HS6ST1	Infla.	Chr2	129075877	G	T	D87E	4.91E-08	27.5
HLA-A	Infla.	Chr6	29912030	G	C	D251H	1.89E-04	25.1
HS6ST1	Infla.	Chr2	129026227	G	T	R249S	1.13E-03	32
TNXB	Infla.	Chr6	32024395	C	T	R2704H	9.34E-03	26.7
KMT2C	-	Chr7	151927021	C	A	C988F	5.44E-07	33
SCGB1C1, SCGB1C2	-	Chr11	193865	T	G	I70R	4.81E-06	24.1
RGPD5, RGPD8	-	Chr2	113147370	G	A	T911I,T1051I	3.41E-05	23.4
ZNF827	-	Chr4	146744666	G	A	S414L,S764L	3.41E-05	23.7

OR11H12	-	Chr14	19377862	C	T	S90F	2.11E-04	23.4
PABPC3	-	Chr13	25671027	A	G	K231E	8.90E-04	26.1
OR4F17	-	Chr19	111016	T	G	F113C	1.13E-03	23.7
SMOX	-	Chr20	4163469	G	A	C305Y,C448Y, C395Y	5.25E-03	26.5
CEL	-	Chr9	135944586	C	T	T409I,T412I	5.25E-03	27.3
MAGEC1	-	ChrX	140994116	C	G	S309C	5.25E-03	12.78
DEF8	-	Chr16	90030680	C	T	H309Y,H430Y, H369Y,H352Y, H359Y	2.23E-02	24.2
CES1	-	Chr16	55862883	C	A	G19V,G18V	2.34E-02	25
RHPN2	-	Chr19	33490566	T	C	Q233R,Q384R	4.35E-02	26.8
MUC6	-	Chr11	1017325	A	C	Y1826D	2.09E-02	8.215
TCAF2	-	Chr7	143416945	C	T	R101W,R265W	7.56E-06	25.2
CNTNAP3	-	Chr9	39118196	C	A	G620V,G626V, G714V,G713V	1.31E-05	29.2
AGAP4	-	Chr10	46321527	G	A	R610C	3.26E-05	24.8
LRRC37A	-	Chr17	44409255	A	G	K1538E,K1538E, K576E	1.35E-04	11.2
FAM86B1	-	Chr8	12049320	C	A	D43Y	3.26E-05	22.5
OR13C5	-	Chr9	107361460	G	A	P79S	3.26E-04	5.414
USP17L20, USP17L22	-	Chr4	9270634	G	C	Q430H	2.02E-03	15.52
KRT32	-	Chr17	39619115	G	A	T395M	1.73E-03	28.8
CCL3L1, CCL3L3	-	Chr17	34522695	A	G	X48R	2.02E-03	14.56
WDR64	-	Chr1	241951329	C	T	R556W,R511W, R785W,R952W	2.76E-02	26.2

KRR1	-	Chr12	75900382	C	T	R134Q	2.44E-02	33
KMT2C	-	Chr7	151935910	C	T	G845E	2.44E-02	25.3
NPIPA5	-	Chr16	15463612	G	A	R9C,R132C, R151C	1.54E-03	17.23
TRIM47	-	Chr17	73874071	G	A	R187W	2.39E-02	34

Crom= Cromossomo, Ref= Referência, Alt = Alteração, AA = troca de aminoácido, Infla = Genes inflamatórios, Mito = Genes mitocondriais.

CADD = escore CADD



Tabela 4 Variantes apresentadas por cada indivíduo dos pacientes MEC.

Gene	Função	MEC01	MEC02	MEC03	MEC04	MEC05	MEC06	MEC07	MEC08	MEC09	MEC10	MEC11	MEC12	MEC13
MRPS18B	Mito.				het		het	hom	het				het	
GNAO1	Infla.	het	het	het			het	het		het		het		
HS6ST1	Infla.	het	het	het	het	het	het	het		het	het	het	het	het
HLA-A	Infla.										het			
HS6ST1	Infla.			het	het	het	het				het		het	het
TNXB	Infla.					het		het	het	het			hom	hom
KMT2C	-			het	het									
SCGB1C1,SCGB1C2	-			het			het		het					
RGPD5,RGPD8	-		het			het	het	het	het	het	het	het		het
ZNF827	-	het	het		het	het		het	het	het		het		het
OR11H12	-	het	het		het	het		het	het				het	het
PABPC3	-				het									
OR4F17	-	het			het	het	het					het	het	het
SMOX	-	het					het	het		het		het	het	
CEL	-	het			het		het	het			het	het		
MAGEC1	-	het						het	het	het	het	het		
DEF8	-	het					het	het	het			het		
CES1	-								het		het	het		
RHPN2	-	het	het	het	het	het		het	het	het	het	het	het	het
MUC6	-	het	het				het		het	het		het		
TCAF2	-	het	het	hom	het	het		het		het	hom		het	
CNTNAP3	-												hom	
AGAP4	-	hom	het	het	het	het	het	hom				het		
LRRC37A	-	het	het			het		het	het			hom		hom
FAM86B1	-	het	hom				hom	het			het	het		hom

Gene	Função	MEC01	MEC02	MEC03	MEC04	MEC05	MEC06	MEC07	MEC08	MEC09	MEC10	MEC11	MEC12	MEC13
OR13C5	-							het						
USP17L20,USP17L22	-	hom				het		het	het	het				het
KRT32	-				het									
CCL3L1,CCL3L3	-				hom	hom					het	het		het
WDR64	-			het		het		het		het		hom		het
KRR1	-	het		hom	hom	het				het				het
KMT2C	-		het			hom						het		het
NPIPA5	-	het	het		het	hom	het		hom	hom	hom	het	het	hom
TRIM47	-	het		het	het	hom	het	het	het	het	het	het		het
Total Homozigotos		2	1	2	2	4	1	2	1	1	2	3	1	4
Total Heterozigotos		17	12	9	15	14	14	18	14	14	11	18	9	13
<b>Total</b>		<b>19</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>21</b>	<b>10</b>	<b>17</b>

Mito = Genes mitocondriais; Infla = genes inflamatórios; Het = heterozigoto, Hom = Homozigoto.

Tabela 5 Lista de pacientes e o genótipo correspondente para o gene MRPS18B

ID	Forma	sexo	MRPS18B Genótipo
MEC04	MEC	F	<b>C/G</b>
MEC06	MEC	M	<b>C/G</b>
MEC08	MEC	M	<b>C/G</b>
MEC12	MEC	M	<b>C/G</b>
MEC07	MEC	F	<b>G/G</b>
MEC01	MEC	F	C/C
MEC02	MEC	M	C/C
MEC03	MEC	M	C/C
MEC05	MEC	F	C/C
MEC09	MEC	F	C/C
MEC10	MEC	M	C/C
MEC11	MEC	F	C/C
MEC13	MEC	M	C/C
DP141	FI	M	<b>C/G</b>
ICB02	FI	F	C/C
ICB03	FI	F	C/C
ICB04	FI	M	C/C
ICB06	FI	F	C/C
IC34EI	FI	M	C/C
IC44EI	FI	M	C/C
IC55EI	FI	F	C/C
IC57EI	FI	F	C/C
IC61EI	FI	M	C/C
IC63EI	FI	F	C/C
IC66EI	FI	M	C/C
IC68EI	FI	F	C/C
IC69EI	FI	F	C/C
IC68EI	FI	M	C/C
IC69EI	FI	F	C/C
IC88EI	FI	F	C/C
IC89EI	FI	F	C/C
IC92EI	FI	M	C/C
IC93EI	FI	M	C/C
DP034I	FI	M	C/C
DP048I	FI	M	C/C
IC99EI	FI	F	C/C
IC100EI	FI	F	C/C
IC102EI	FI	M	C/C
IC104EI	FI	M	C/C

IC105EI	FI	F	C/C
UB167	FI	F	C/C
UB216	FI	F	C/C
UB242	FI	F	C/C
DP123	FI	F	C/C
DP130	FI	F	C/C
DP135	FI	M	C/C
DP136	FI	F	C/C
DP142	FI	F	C/C
DP164	FI	F	C/C
DP166	FI	F	C/C
DP174	FI	M	C/C
DP179	FI	M	C/C
DP184	FI	M	C/C
IC261E	FI	F	C/C
IC44EI	FI	M	C/C
IC55EI	FI	F	C/C
IC61EI	FI	M	C/C
IC255E	FI	F	C/C

Tabela 6 Quantidade de pacientes MEC e FI com a variante MRPS18B.

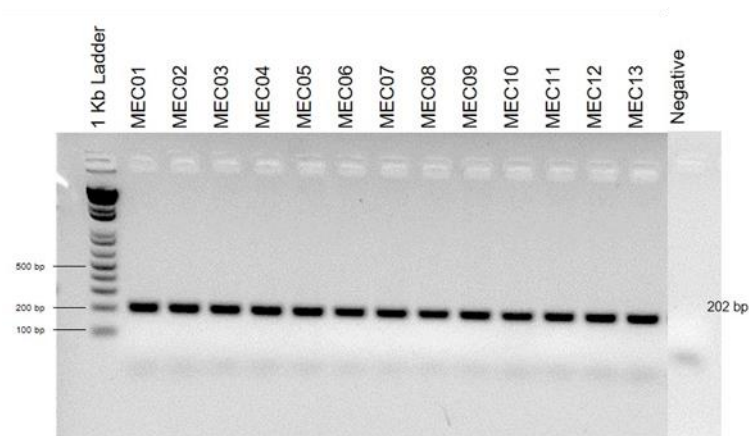
	Pacientes	MRPS18B		
		NM C/C	Het C/G	Hom G/G
MEC	13	8	4	1
FI	45	44	1	0

NM: não mutado; Het: heterozigoto; Hom: homozigoto

## 5.2. Sequenciamento de Sanger da variante MRPS18B

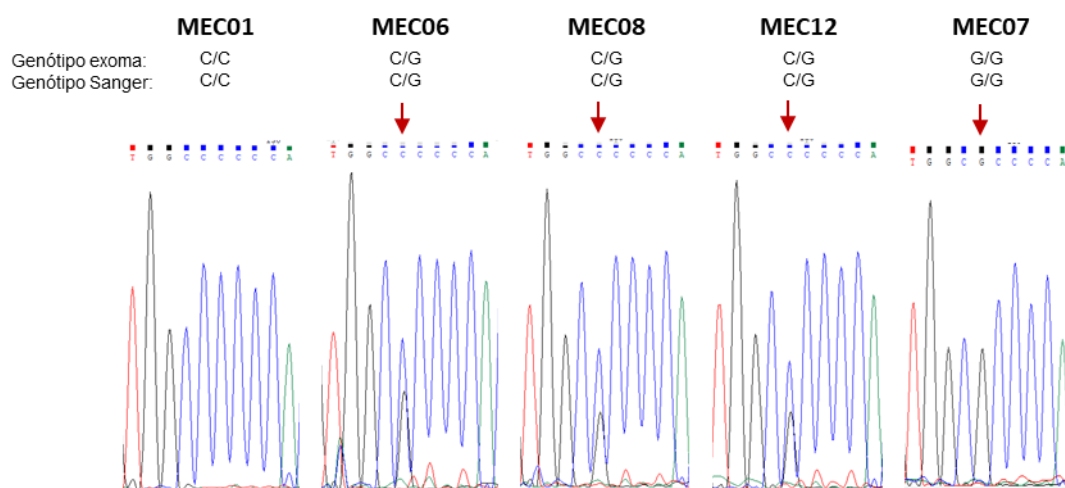
Para confirmar a mutação no gene mitocondrial MRPS18B e o genótipo dos indivíduos testados foi feito o sequenciamento Sanger (Genewiz) em todos os pacientes com MEC. O DNA foi amplificado por PCR em tempo real utilizando primers específicos para MRPS18B. O *amplicon* resultante foi submetido a

fracionamento eletroforético em gel de agarose 2% para confirmar a presença de uma única banda correspondente ao MRPS18B (Figura 4) e em seguida o *amplicon* foi submetido ao sequenciamento Sanger. Os cromatogramas da Figura 5 confirmaram a presença do polimorfismo 680C>G gene MRPS18B (Apêndice I).



**Figura 4 Fracionamento eletroforético do amplicon correspondente ao gene MRPS18B nos pacientes MEC.**

O DNA de cada paciente foi extraído com o kit *QIAamp DNA Blood Maxi* (Qiagen, EUA) e 25 ng de DNA foram utilizados para a amplificação do gene MRPS18B. A qualidade da PCR foi avaliada por eletroforese em gel 2% em TAE e todas as amostras geraram uma única banda correspondente ao MRPS18B na altura 202 bp.



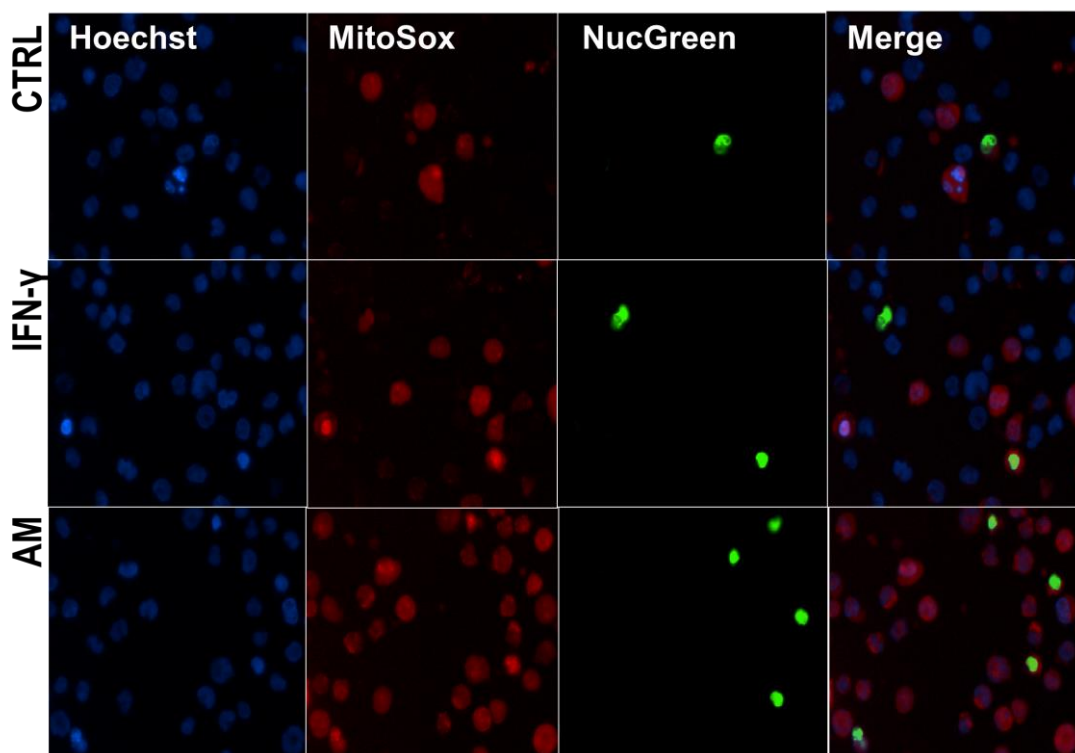
**Figura 5 Cromatograma de Sanger de pacientes com a variante MRPS18B.**

Para confirmação do genótipo foi realizado o sequenciamento Sanger. O DNA de cada paciente foi extraído com o kit *QIAamp DNA Blood Maxi* (Qiagen, EUA) e 25 ng de DNA foram utilizados para a amplificação do gene MRPS18B. A qualidade da PCR foi avaliada por eletroforese em gel e todas as amostras geraram uma única banda correspondente ao MRPS18B. Em seguida, as amostras foram sequenciadas pelo sequenciamento de Sanger da Genewiz. Imagens representativas do cromatograma de Sanger dos 5 pacientes revelam a mudança no nucleotídeo. A seta em vermelho indica a mudança de citosina para guanina.

### 5.1. Função mitocondrial de linhagens EBV-LCL de pacientes que apresentam ou não a variante MRPS18B

A fim de investigar se a variante 688C>G no gene MRPS18B contribuiu para um aumento de estresse nitro-oxidativo e dano mitocondrial em células estimuladas com IFN- $\gamma$ , realizamos ensaios funcionais em EBV-LCLs derivados de pacientes MEC com heterozigose (C/G), pacientes homozigotos (G/G) e pacientes sem mutação (NM, C/C). Quantificamos mtROS, nitrito, proteínas nitradas e síntese de ATP em células não estimuladas e estimuladas por IFN- $\gamma$  (25 ng/ml).

Para avaliar a produção de mtROS a partir das EBV-LCL foi utilizado a *probe* fluorescente MitoSOX™ Red na concentração de 5  $\mu$ M. Esta *probe* se liga especificamente ao radical superóxido (Figura 6).

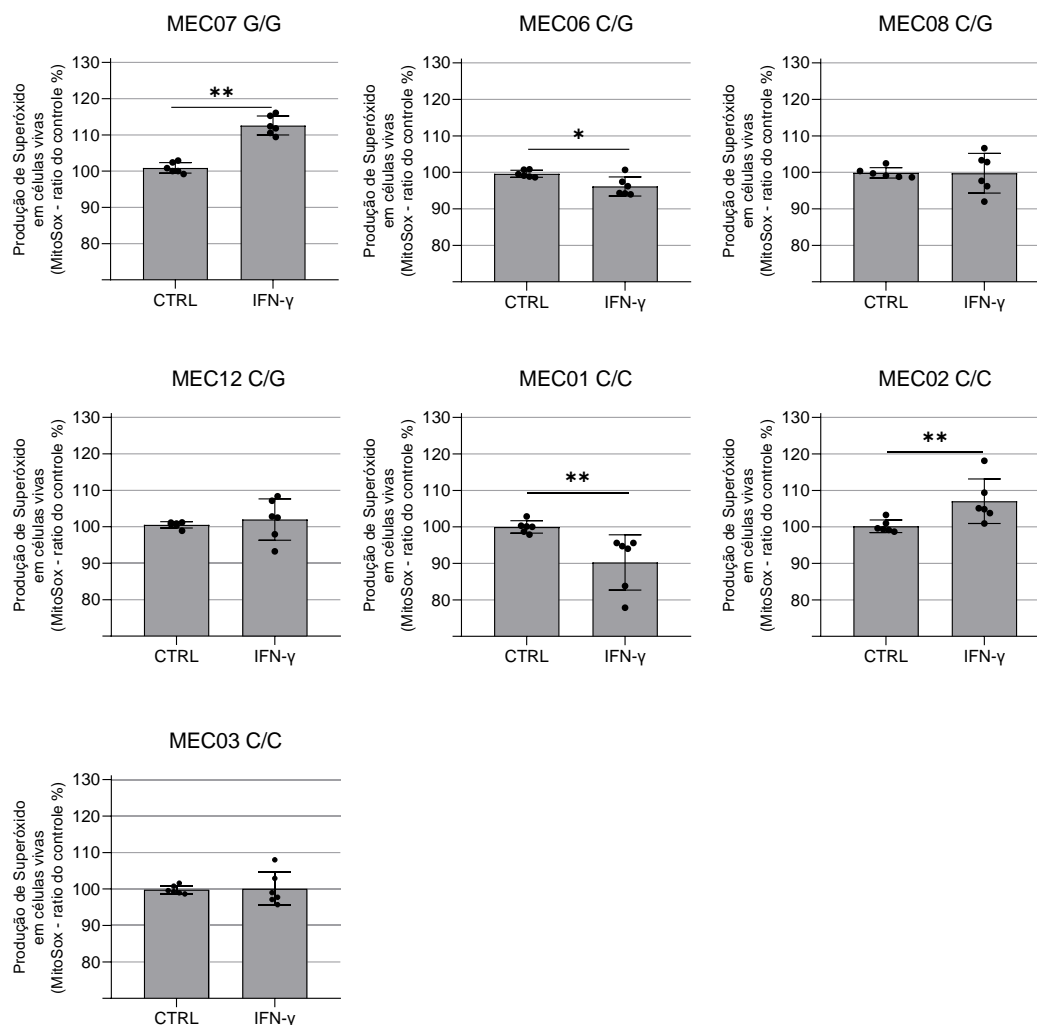


**Figura 6** Imagens representativas da marcação de ROS mitocondrial em EBV-LCLs usando MitoSox Red em EBV-LCL de paciente homozigoto.

Linhas de EBV-LCLs obtidas de pacientes tiveram o mtROS citoplasmático quantificado utilizando MitoSOX™ Red após 24 horas de tratamento com IFN- $\gamma$ . Imagens representativas de mtROS citoplasmático com tratamento IFN- $\gamma$  25 ng/ml por 24 horas em EBV-LCL de paciente MEC07. Antimicina A = 50  $\mu$ M, controle positivo, desacoplador de fosforilação oxidativa por inibir o complexo 3. Hoechst 33342 = núcleo (azul), MitoSox = mtROS (vermelho), NucGreen = viabilidade (verde) e Merge = sobreposição de imagens.

Para avaliar a disfunção mitocondrial dependente de estímulo de IFN- $\gamma$  foi feita a quantificação de mtROS em EBV-LCLs de pacientes com estímulo de IFN- $\gamma$  por 24 horas. O mtROS citoplasmático mitocondrial foi quantificado entre os grupos de pacientes que apresentaram a mutação em gene mitocondrial em homozigose, heterozigose e sem mutação 24 horas após o estímulo das EBV-LCLs com a citocina pró inflamatória IFN- $\gamma$  na concentração de 25 ng/ml. Foi analisado o efeito do IFN- $\gamma$  na produção de mtROS de cada paciente individualmente e verificou-se que cada paciente respondeu de forma diferente em resposta ao tratamento e em consequência na produção de mtROS.

O paciente MEC07 com a mutação em homozigose teve um aumento de mtROS de 12% ( $p= 0,0022$ ) e o paciente MEC02 também teve aumento de mtROS 7% ( $p= 0,0087$ ) quando comparado com o seu controle. Os pacientes MEC06 (HET) e MEC01 (NM) tiveram produção reduzida de mtROS (Figura 7).



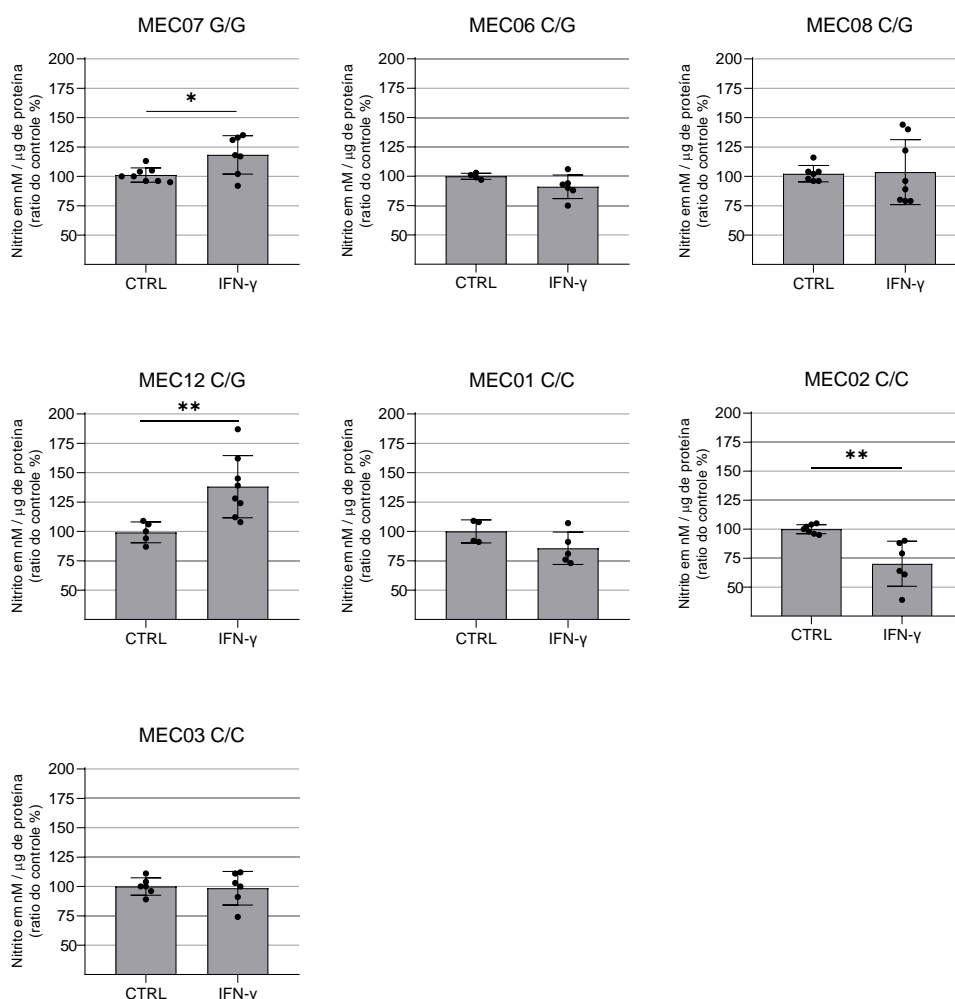
**Figura 7** mtROS citoplasmático em EBV-LCLs de pacientes MEC tratados por 24 horas com IFN-  $\gamma$ .

Linhagens de EBV-LCLs obtidas de pacientes tiveram o mtROS citoplasmático quantificado utilizando o corante MitoSOX™ Red após 24 horas de tratamento com IFN-  $\gamma$ . Quantificação de mtROS citoplasmático em EBV-LCLs de pacientes MEC apresentando o genótipo em homozigose, heterozigose e sem mutação. Concentração das citocinas em ng/ml. AM = Antimicina A 50  $\mu$ M. Hom (G/G), Het (C/G) e NM (C/C). Cada ponto é uma medida de um experimento independente. Foi usado o teste de Mann-Whitney. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

Analizamos a resposta do efeito de IFN- $\gamma$  na produção de nitrito nas linhagens EBV-LCL de cada paciente com genótipo HOM, HET e NM após 48 horas de estímulo com IFN- $\gamma$  na dose de 25 ng/ml e como na produção de mtROS, também foi observado que cada paciente responde de maneira diferente em resposta ao tratamento com IFN- $\gamma$  e por consequência produção de nitrito.



O paciente MEC07 (HOM) teve um aumento de nitrito de 17% ( $p=0,0496$ ), o paciente MEC12 (HET) teve um aumento de nitrito de 39% ( $p=0,0031$ ). O paciente MEC02 (NM) teve produção reduzida de nitrito (Figura 8).

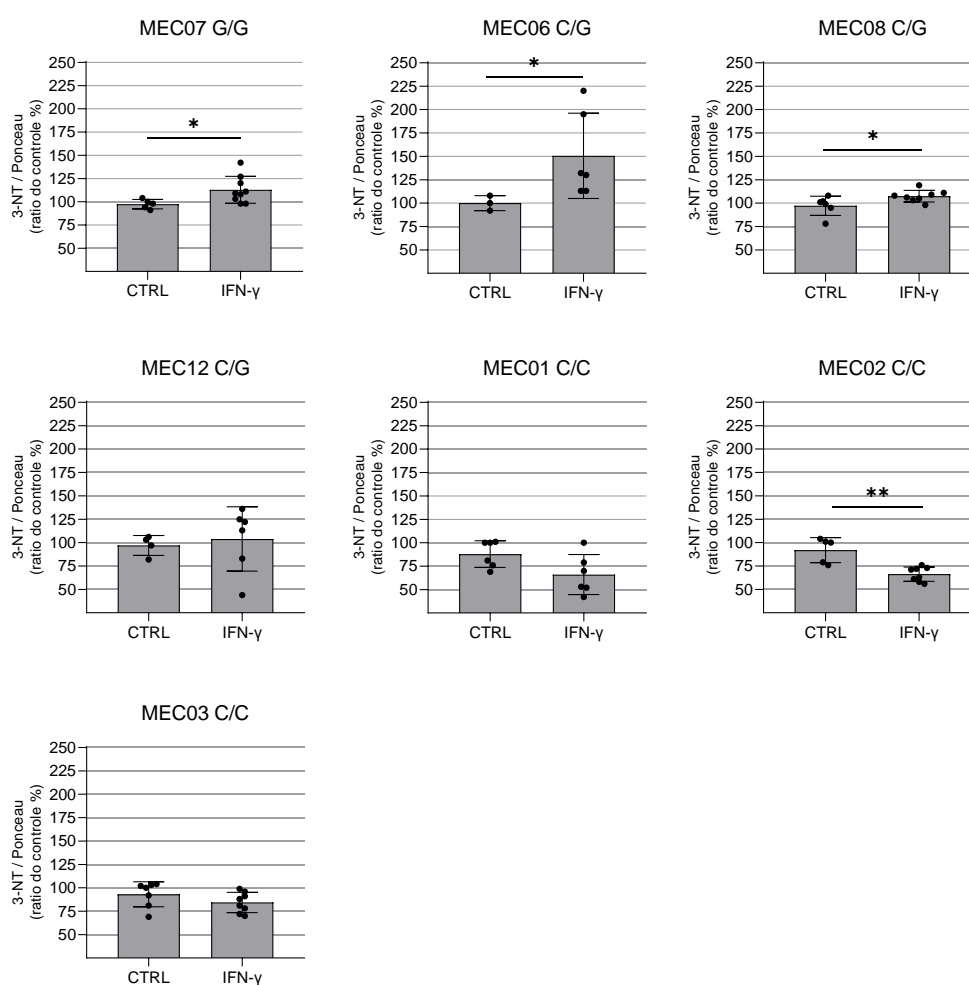


**Figura 8 Produção de nitrito em pacientes com e sem mutação.**

As linhagens EBV-LCL obtidas de pacientes MEC tiveram o nitrito quantificado usando o *Griess Reagent Kit*, para quantificação de nitrito após 48 horas de tratamento com IFN- $\gamma$  25 ng/ml. Para normalização, foi dividido a quantidade de nitrito em nM por  $\mu$ g de proteínas das células. HOM (G/G), HET (C/G) e NM (C/C). Cada ponto é uma medida de um experimento independente. Foi usado o teste de Mann-Whitney. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

Para avaliar efeito do IFN- $\gamma$  na linhagem EBV-LCL na produção de proteínas nitradas de cada paciente com genótipo HET, HOM e NM após 48 horas de estímulo com IFN- $\gamma$  25 ng/ml foi utilizado o método de *dot blot* e também observamos que IFN- $\gamma$  induz nitratação de proteína de maneira diferente em cada paciente.

O paciente MEC07 (HOM) teve um aumento de proteínas nitradas de 16% ( $p= 0,0280$ ), o paciente MEC06 (HET) e MEC08 (HET) tiveram um aumento na produção de proteínas nitradas sendo 51% ( $p= 0,0238$ ) e 11% ( $p= 0,0316$ ) respectivamente. O paciente MEC02 (NM) teve produção reduzida de proteínas nitradas (Figura 9).

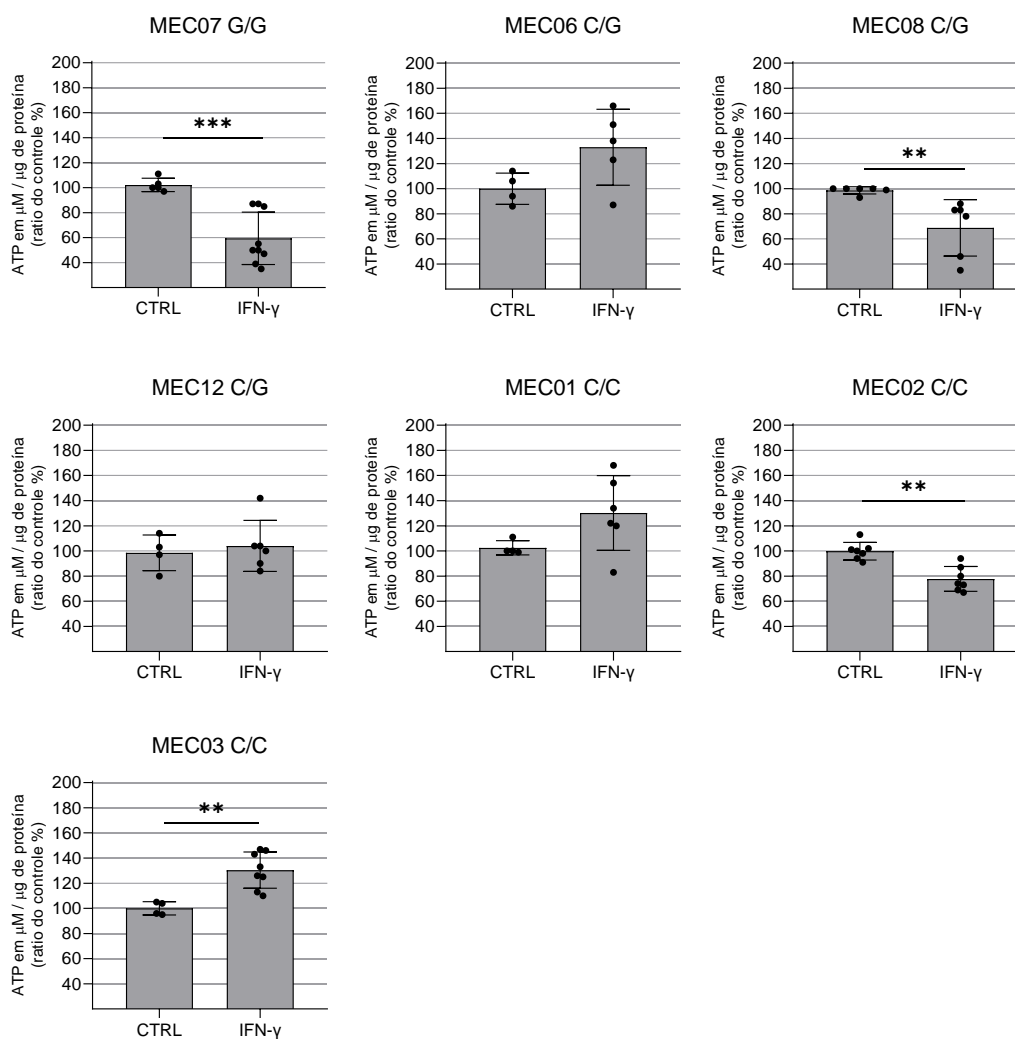


**Figura 9 Detecção de proteínas nitradas em pacientes com e sem mutação.**

As linhagens EBV-LCL obtidas de pacientes tiveram as proteínas nitradas quantificadas usando anticorpo anti-3-nitrotirosina após 48 horas de tratamento com IFN- $\gamma$  25 ng/ml. Para normalização, foi dividido a intensidade de fluorescência pelo ponceau. HOM (G/G), HET (C/G) e NM (C/C). Cada ponto é uma medida de um experimento independente. Foi usado o teste de Mann-Whitney. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

Para avaliar a síntese de ATP na linhagem EBV-LCL em resposta tratamento de IFN- $\gamma$  25 ng/ml por 48 horas em cada paciente com genótipo HET, HOM e NM foi utilizado o kit *ATP Determination*.

O paciente MEC07 (HOM) teve uma redução da síntese de ATP de 42% ( $p= 0,001$ ), os pacientes MEC08 (HET) e MEC02 (NM) também tiveram uma redução na síntese de ATP sendo: 30% ( $p= 0,0022$ ) e 22% ( $p= 0,0017$ ) respectivamente. O paciente MEC03 (NM) teve produção aumentada de síntese de ATP (Figura 10).



**Figura 10 Avaliação da síntese de ATP em pacientes com e sem mutação.**

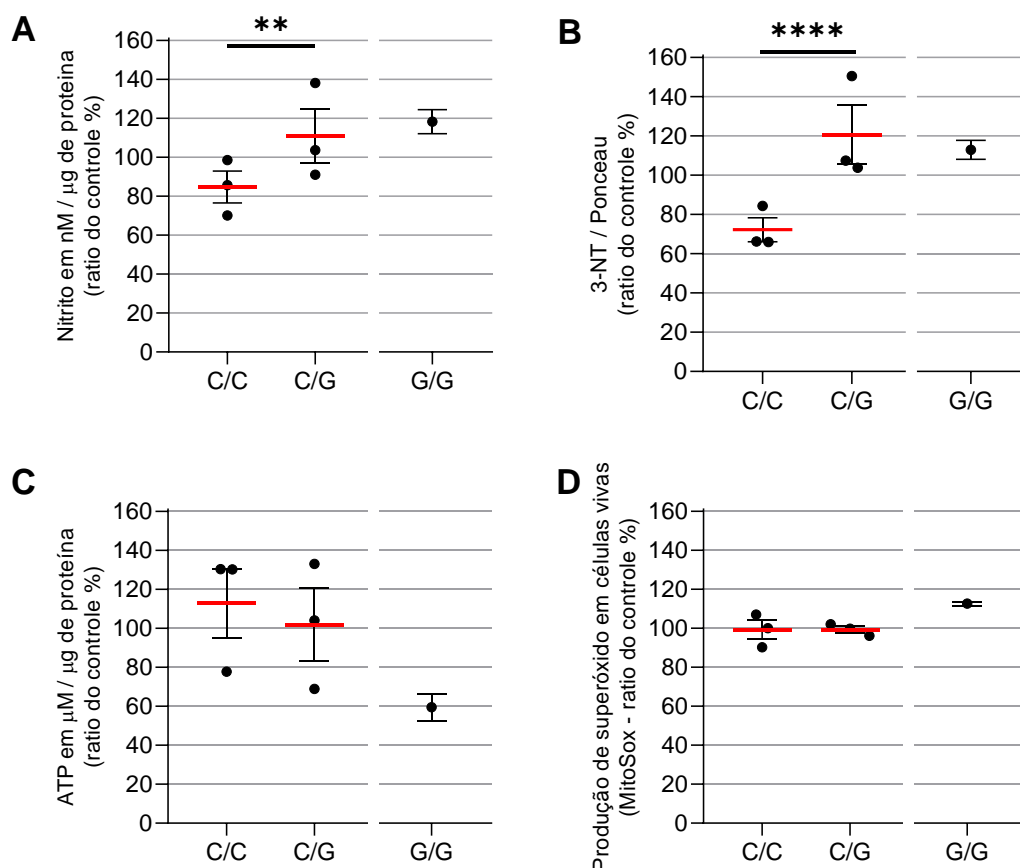
As linhagens EBV-LCL obtidas de pacientes tiveram a síntese de ATP quantificada usando o kit *ATP Determination* após 48 horas de tratamento com IFN- $\gamma$  25 ng/ml. Para normalização, foi dividido a quantidade de ATP em  $\mu\text{M}$  por  $\mu\text{g}$  de proteínas das células. HOM (G/G), HET (C/G) e NM (C/C). Cada ponto é uma medida de um experimento independente. Foi usado o teste de Mann-Whitney. \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

## **5.2. IFN- $\gamma$ causa estresse nitro-oxidativo e dano mitocondrial em pacientes portadores da variação MRPS18B P260A**

Após análise de dados individualmente, foi feita uma nova análise a partir das médias de cada experimento individual e foi feita uma análise por grupos, sendo possível somente aplicar a estatística comparativa entre o grupo C/G e C/C. Descobrimos que os pacientes C/G (MEC06, MEC08 e MEC12) e G/G (MEC07) são mais suscetíveis aos efeitos prejudiciais do IFN- $\gamma$  em comparação com os pacientes C/C (MEC01, MEC02 e MEC03). Identificamos que os pacientes C/G e G/G tiveram uma produção aumentada de nitrito (31% e 38%, respectivamente ( $p < 0,01$ ) em comparação com o grupo C/C (Figura 11A). Da mesma forma, os pacientes C/G tiveram um aumento de 67% ( $p < 0,0001$ ) e G/G 70% de aumento de proteínas nitradas quando comparados com o grupo C/C (Figura 11B).

Em seguida, medimos a produção de ATP por ensaio baseado em luciferase e descobrimos que IFN- $\gamma$  reduziu 3% (não significativo) a produção de ATP em pacientes C/G em comparação com pacientes C/C, enquanto o MEC07 G/G mostrou uma redução de 54% (Figura 11C).

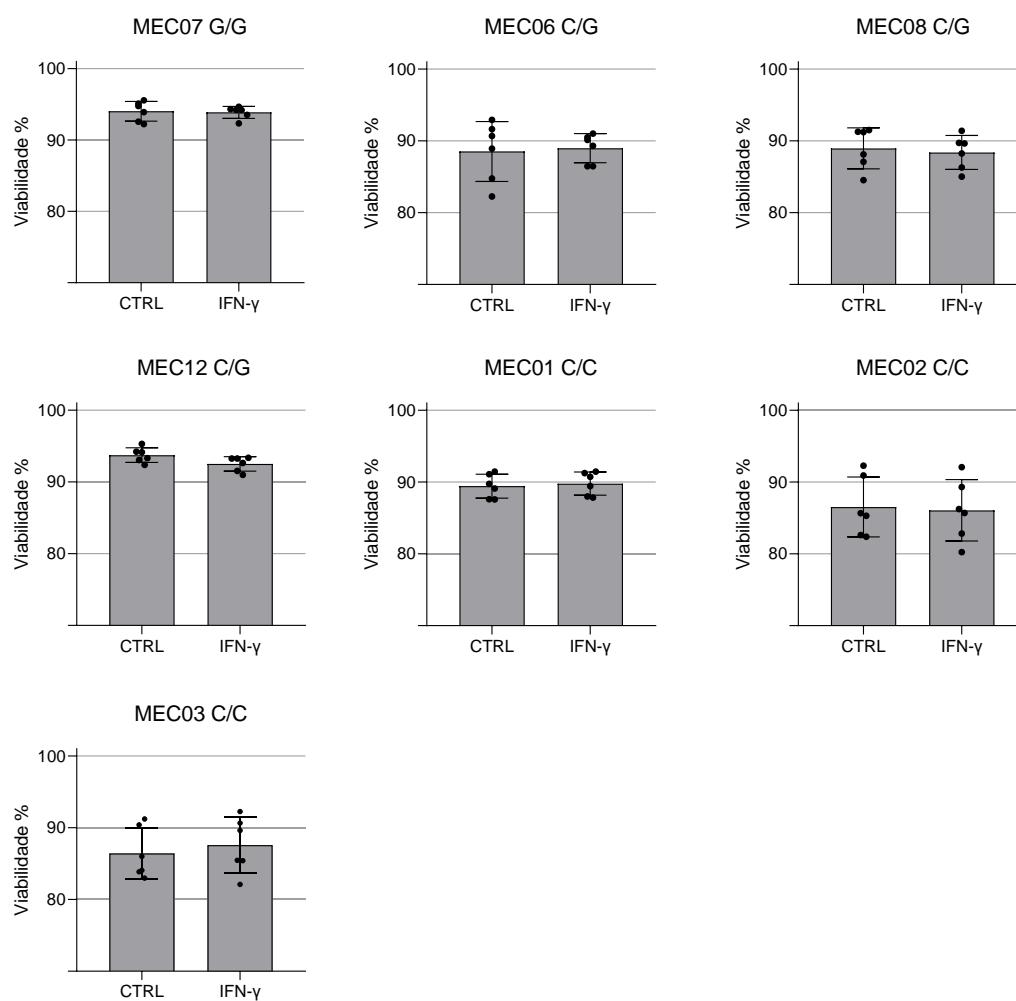
Avaliamos a produção de mtROS usando MitoSOX™ Red e os resultados mostram que não há aumento significativo nos pacientes C/G vs C/C, mas o paciente homocigoto CME7 (G/G) apresentou aumento de 12% quando comparado aos demais pacientes (Figura 11D). Um ensaio de viabilidade indica que IFN- $\gamma$  e os resultados mostraram que 25 ng/ml não foi citotóxico, como mostrado na Figura 12.



**Figura 11 Produção de ATP e estresse nitro-oxidativo após tratamento com IFN- $\gamma$  em portadores ou não portadores de mutação do gene mitocondrial MRPS18B 688C>G MRPS18B P230A.**

EBV-LCL foi obtido a partir de PBMCs dos pacientes e infectados com o vírus EBV para transformação. Os EBV-LCL dos pacientes foram estimulados *in vitro* com IFN- $\gamma$ . Medimos a produção de mtROS, nitrito e ATP e a quantificação relativa de proteínas nitradas após estímulo com IFN- $\gamma$  25 ng/ml com MitoSOX<sup>TM</sup> Red, Griess Reagent Kit, Dot Blot, ATP Determination Kit e o anticorpo anti-3-nitrotirosina. Aqui, representamos a proporção média entre células estimuladas com IFN- $\gamma$  e células não estimuladas. Cada ponto é um paciente com  $\geq 6$  medições independentes. A estatística usada foi Two-way ANOVA realizada entre C/C e C/G. \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

Para avaliar se o tratamento com IFN- $\gamma$  em EBV-LCLs causou morte celular, foi utilizado o corante ReadyProbes<sup>TM</sup> NucGreen para quantificar a viabilidade dos EBV-LCLs. Nenhuma diminuição na viabilidade celular de EBV-LCLs foi observada após a incubação com IFN- $\gamma$  (Figura 12).



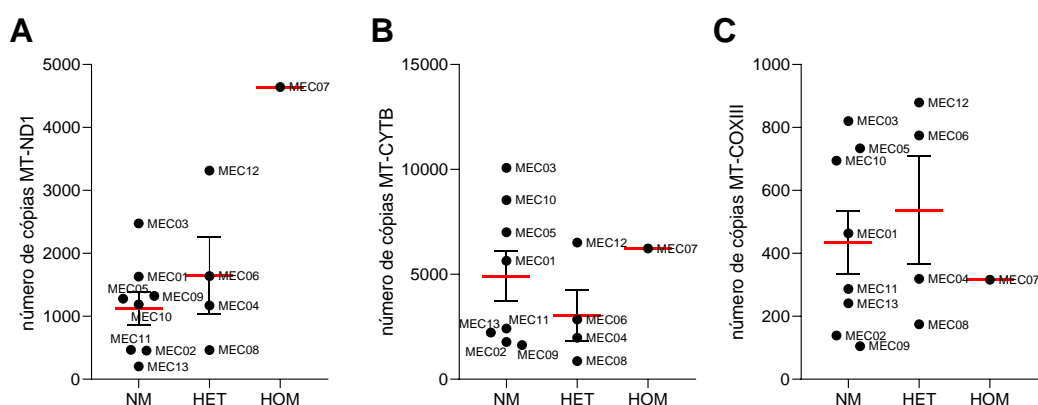
**Figura 12 Viabilidade de células EBV-LCL após tratamento com IFN- $\gamma$  por 24 horas.**

EBV-LCL obtida dos pacientes teve a viabilidade quantificada pelo corante ReadyProbes™ NucGreen após 24 horas de tratamento com IFN- $\gamma$  (25 ng/ml). Viabilidade celular de EBV-LCLs de pacientes com MEC com a mutação em HOM (G/G), HET (C/G) e NM (C/C). Cada ponto é uma medida de um experimento independente. Foi usado o teste de Mann-Whitney.

### 5.1. Quantificação do DNA mitocondrial no plasma e *buffy coat* de pacientes MEC portadores ou não portadores de mutação do gene mitocondrial MRPS18B c.688C>G p.P230A.

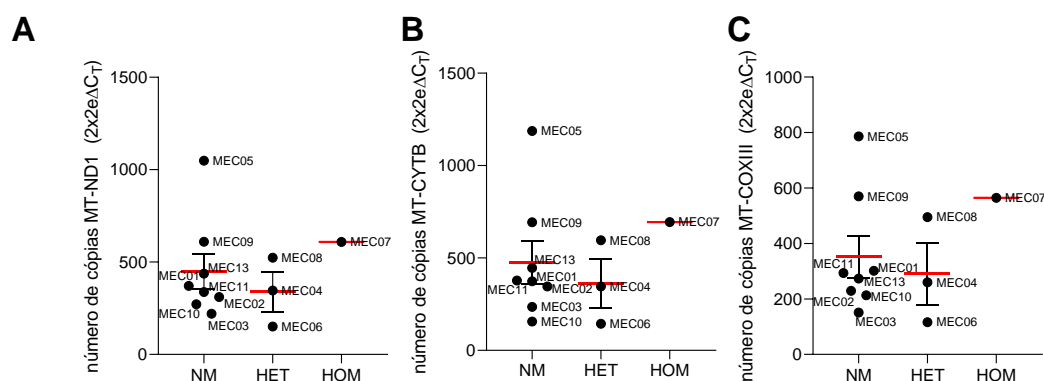
Para avaliar se o paciente MEC com mutação em HOM apresenta disfunção mitocondrial sistêmica maior que os grupos HET e NM, fizemos a determinação do mtDNA circulante com o método de PCR em tempo real e três genes mitocondriais MT-ND1, MT-CYTB e MT-COXIII. Foi quantificado o DNA mitocondrial no plasma e no *buffy coat* de pacientes com megaesôfago chagásico (n = 13). O plasma foi processado e o DNA extraído como descrito nos métodos.

Não houve diferença entres os genótipos no mtDNA extraído do plasma (Figura 13) e do *buffy coat* de pacientes MEC (Figura 14).



**Figura 13** Quantificação do mtDNA no plasma dos pacientes MEC.

As amostras foram isoladas do plasma de pacientes e três genes mitocondriais em plasma de pacientes MEC (n= 13) foram quantificados por PCR em tempo real. **(A)** gene MT-ND1, **(B)** gene MT-CYTB e **(C)** gene MT-COXIII. NM = não mutado, HET = heterozigoto e HOM = homozigoto.



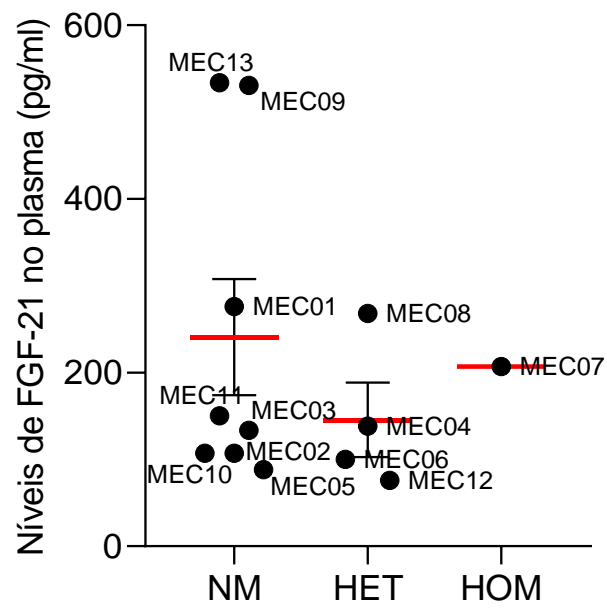
**Figura 14** Quantificação do mtDNA no buffy coat dos pacientes MEC.

As amostras foram isoladas do plasma de pacientes e três genes mitocondriais em buffy coat de pacientes MEC (n = 13) foram quantificados por PCR em tempo real. **(A)** gene MT-ND1, **(B)** gene MT-CYTB e **(C)** gene MT-COXIII. NM = não mutado, HET = heterozigoto e HOM = homozigoto.

## 5.2. Detecção de FGF-21 no plasma de pacientes MEC portadores ou não portadores de mutação do gene mitocondrial MRPS18B 688C>G P230A.

A quantificação de FGF-21 no plasma foi feita conforme descrito nos métodos e foram avaliados o plasma dos 13 pacientes MEC. Não houve diferença entre os genótipos e os níveis de FGF-21 no plasma (Figura 15).





**Figura 15 Níveis de FGF-21 no plasma de pacientes com MEC.**

Níveis de FGF-21 no plasma de pacientes com MEC (n= 13). A quantidade de FGF-21 foi detectada por ensaio de imunoabsorção enzimática usando uma curva padrão para medição das amostras e foi correlacionado entre os genótipos NM = não mutado, HET = heterozigoto e HOM = homozigoto.

## 6. Discussão

Este estudo demonstrou pela primeira vez a relevância da presença de variantes patogênicas em pacientes com megaesôfago da doença de Chagas. Demonstramos que os pacientes MEC apresentam maior frequência de mutações patogênicas comparadas com os pacientes da FI, como por exemplo a mutação mitocondrial MRPS18B 688C>G que foi identificada em 38% dos MEC e 2% dos pacientes FI. O tratamento com IFN- $\gamma$  em linhagens de células EBV-LCL portadoras de MRPS18B 688C>G em homozigose foi associado à disfunção mitocondrial (medida pela diminuição da produção de ATP) e aumento de estresse nitro-oxidativo, em comparação com pacientes com megaesôfago sem a mutação. Os resultados sugerem ainda um efeito de dosagem do gene, uma vez que o paciente homozigoto G/G apresentou maior estresse nitro-oxidativo, em comparação aos grupos sem mutação e heterozigotos. Também mostramos, através da medição de marcadores periféricos de disfunção mitocondrial como o FGF-21 e do mtDNA de três genes, que não há indícios fortes de que exista uma disfunção global, indiciando que provavelmente seja mais localizado na região do tecido inflamado, no caso de pacientes MEC, no esôfago. Análises histológicas e/ou moleculares dos fragmentos esofágicos dos pacientes MEC seriam uma forma de responder essa questão.

Neste trabalho focamos na mutação mitocondrial MRPS18B, uma vez que estudos recentes vêm apontando a contribuição importante da mitocôndria na patogenia da doença de Chagas. As proteínas MRPS18 são codificadas por genes nucleares e estão envolvidas na síntese de proteínas dentro da mitocôndria. As proteínas homólogas são proteínas que compõem a subunidade pequena 28S (MRPS18B e C) e a subunidade grande 39S (MRPS18A) dos mitorribossomos 55S de mamíferos (Cavdar Koc *et al.*, 2001; Greber *et al.*, 2015; Gopisetty and Thangarajan, 2016; Mushtaq *et al.*, 2016). As mitocôndrias têm seu próprio sistema de tradução para a síntese das treze proteínas que compõem o complexo da fosforilação oxidativa (OXPHOS).

Mutações em proteínas mitorribossômicas são causas frequentes de distúrbios metabólicos e energéticos devido a deficiências na síntese de proteínas mitocondriais (Ferrari *et al.*, 2021). Mutações nos genes MRPS

demonstraram ter efeitos deletérios, especialmente em distúrbios da cadeia respiratória mitocondrial. Mutações causadoras de doenças mitocondriais foram encontradas em treze proteínas mitoribossômicas da subunidade ribossomal pequena (MRPS1, MRPS2, MRPS6, MRPS7, MRPS9, MRPS11, MRPS14, MRPS16; MRPS22, MRPS23, MRPS25, MRPS34, MRPS39) e quatro proteínas mitoribossômicas da subunidade ribossomal grande (MRPL3, MRPL12, MRPL24, MRPL44) (Ferrari *et al.*, 2021). Vários deles estão associados a cardiomiopatia, como também foi observado em estudo do nosso grupo onde foi identificado a presença da mutação MRPS18B em pacientes CCC (Ferrari *et al.*, 2021; Ouarhache *et al.*, 2021). Algumas proteínas deste grupo desempenham papéis extraribossômicos, como participação da regulação da apoptose e de uma série de cascatas de sinalização celular (Gopisetty and Thangarajan, 2016). Mutações no gene mitocondrial que afetam a tradução mitocondrial, como nos tRNAs mitocondriais, foram associadas à Síndrome de Leigh e observadas na encefalopatia neuro-gastrointestinal mitocondrial (MNGIE), duas doenças mitocondriais com perda de neurônios e neurônios do plexo miotérico e disfagia. (Finsterer, 2004; Gorman *et al.*, 2016; Finsterer and Frank, 2017; Ferrari *et al.*, 2021).

Nossos resultados corroboram com o papel das variantes do gene mitocondrial na suscetibilidade às formas sintomáticas da doença de Chagas, conforme observado pela primeira vez em pacientes CCC (Ouarhache *et al.*, 2021). No entanto, a maioria das doenças mitocondriais afetam crianças pequenas e recém-nascidos e frequentemente envolvem vários sistemas de órgãos. É interessante notar que o paciente MEC07, que apresenta a variante homozigótica, é um paciente de 60 anos com sintomas digestivos e cardiológicos (insuficiência cardíaca, classe funcional New York Heart Association (NYHA II). O fato de que o fenótipo mitocondrial *in vitro* só emergiu após estimulação de citocinas e só se expressou clinicamente em um adulto é sugestivo de um fenômeno *two-hit*, onde a mutação aumenta a suscetibilidade das células ao estresse nitro-oxidativo induzido por IFN- $\gamma$  e disfunção mitocondrial.

Dessa forma, o dano mitocondrial *two-hit* estaria localizado apenas em sítios inflamatórios em pacientes com doença de Chagas; por exemplo em plexo

mioentérico em pacientes com doença de Chagas com megaesôfago (Matsuda *et al.*, 2009) e no coração no caso do CCC (Nogueira *et al.*, 2014).

O gene MRPS18B é um dos genes identificados no estudo de múltiplas famílias soropositivas para portadores de Chagas e CCC, mencionado anteriormente (Ouarhache *et al.*, 2021) e por meio do sequenciamento completo do exoma também foi identificada a mutação no gene mitocondrial nos pacientes MEC. Isso nos leva a supor que os pacientes MEC tenham uma piora na patologia porque esta mutação causa disfunção ribossomal afetando a síntese de proteínas essenciais para fosforilação oxidativa e a homeostase mitocondrial. É possível hipotetizar que portadores da mutação apresentem aumento de ROS e posteriormente de NOS2 aumentando o peroxinitrito e no caso do paciente homozigoto levar à disfunção mitocondrial com redução da produção de ATP.

A resposta imunológica crônica também é um fator-chave associado com a pior progressão dos pacientes com doença de Chagas (Reis *et al.*, 1993). As citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  estão aumentadas exclusivamente em pacientes com CCC em comparação com pacientes com cardiomiopatia dilatada (Abel *et al.*, 2001) e estes estímulos são reportados como sendo indutores de disfunção mitocondrial por acarretar danos no tecido cardíaco (Lee *et al.*, 2007; Bocchi *et al.*, 2017; Meyer *et al.*, 2017) e em cardiomiócitos *in vitro* (Nunes and Andrieux *et al.*, 2021), promovendo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) que também são oriundas da infecção pelo *T. cruzi* (Abel *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2009; Pissetti *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2012). Tendo em vista que o gatilho compartilhado pelos pacientes com megaesôfago e cardiomiopatia chagásica é a infecção pelo *T. cruzi*, nossa hipótese é que esses pacientes MEC também podem ter disfunção mitocondrial/energética associada à patologia em presença de mutação no gene mitocondrial.

Identificamos que os pacientes MEC quando expostos ao IFN- $\gamma$  respondem de forma diferente na produção de mtROS citoplasmáticos. Apesar de não termos encontrado diferenças na produção de mtROS no grupo de pacientes heterozigotos para MRPS18B, identificamos que o MEC07 MRPS18B G/G, teve um aumento significativo de 12% no mtROS em relação a todos os

grupos, mostrando a mutação em homozigose pode contribuir para uma piora no metabolismo mitocondrial que culmina em maior produção de mtROS.

Um trabalho realizado para avaliar o papel do óxido nítrico na destruição neuronal em camundongos C57BL/6 controles e *knockout* para NOS2 e IFN durante a infecção por *T. cruzi* demonstrou que a denervação miontérica observada na fase aguda da infecção pelo protozoário é devido a produção de óxido nítrico (NO) e IFN- $\gamma$ , pois foi observado que em camundongos controle produziam mais NO quando comparado com os dois grupos *knockout* (Arantes *et al.*, 2004). Nosso estudo mostrou que as EBV-LCL dos pacientes MEC portadores da variante genética em homozigose e em heterozigose demonstrou um aumento na produção de nitrito (produto do metabolismo endógeno do NO) após o tratamento com IFN- $\gamma$ , mostrando assim que a citocina tem um papel essencial no aumento da produção de nitrito e por consequência gerando uma possível disfunção mitocondrial e o aumento de agentes que em grandes quantidades se tornam tóxicos para o funcionamento da mitocôndria.

Além do aumento de nitrito, os pacientes portadores MRPS18B 688C>G P260A aumentaram a quantidade de proteínas nitradas após estímulo com IFN- $\gamma$  em comparação com os não portadores. A identificação de proteínas nitradas é uma consequência do aumento de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), produto originado pela combinação de superóxido e NO ou pela combinação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) com nitrito (Rakshit *et al.*, 2014). A produção excessiva de ONOO<sup>-</sup> pode levar à danos teciduais e disfunção mitocondrial (Kauppinen *et al.*, 2013; Rakshit *et al.*, 2014). Um estudo feito em linhagens de hepatomas e de fibrosarcoma também demonstrou que após o tratamento com IFN- $\gamma$  ocorreu um aumento peroxinitrito (Rakshit *et al.*, 2014).

Sabemos que as mitocôndrias possuem um papel importante na produção de energia para o consumo das células e essa energia é representada pela produção da molécula ATP, sendo assim a principal forma de energia para a demanda energética das células. Em estudos anteriores do nosso grupo demonstrou que pacientes com CCC possuem uma redução na produção de ATP através da fosforilação oxidativa (Teixeira *et al.*, 2011). Nossas investigações mostraram que essa diminuição também se encontra presente nos pacientes MEC, onde observamos uma diminuição na síntese de ATP nas EBV-

EBV-LCL do paciente com mutação mitocondrial homozigota após o tratamento com IFN- $\gamma$ .

Um grupo divulgou um estudo *in vitro* em um modelo celular de mucosa intestinal tratada com citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e infecção por *C. rodentium*. Os resultados demonstraram que após o tratamento com as citocinas, tanto separadas quanto em combinação, mesmo sem a infecção por *C. rodentium* provoca uma diminuição na síntese de ATP, esse resultado também ficou evidenciado após o tratamento com as citocinas mais a infecção por *C. rodentium*, demonstrando assim o grande impacto que as citocinas tem na redução na produção de ATP (Maiti *et al.*, 2015). Obtivemos o mesmo achado em nossas linhagens de pacientes após o tratamento com IFN- $\gamma$  no paciente com a mutação homozigota em MRPS18B, revelando que as citocinas podem contribuir para um mal funcionamento das mitocôndrias.

Em conjunto, identificamos que a mutação patogênica exclusiva de pacientes MEC MRPS18B 688C>G P230A esteve associada a estresse nitrosativo e à diminuição da produção de ATP no que parece ser uma resposta dependente do genótipo. Os efeitos nitro-oxidativos do IFN- $\gamma$  foram maiores em células EBV-LCL de pacientes homozigotos e heterozigotos, respectivamente, em comparação com pacientes não mutados. Para explicar o mecanismo por trás desses fenômenos, trouxemos uma nova hipótese. Acreditamos que essa mutação causa a ruptura do ribossomo mitocondrial, ou seja, mutações que levam à disfunção do ribossomo que afetam a tradução das 13 proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial, resultando em um defeito da cadeia respiratória, aumento da produção de mtROS e, conseqüentemente, espécies reativas de nitrogênio (RNS).

Na verdade, o paciente homozigoto (MEC07 G/G) seguiu esse padrão, onde o estímulo de IFN- $\gamma$  aumentou mtROS, nitrito e nitração de tirosina acompanhada por produção reduzida de ATP. O grupo heterozigoto (C/G) aumentou o nitrito e a nitrotirosina de forma independente do mtROS. Isso pode ser explicado pela ativação direta de NOS2 pelo próprio IFN- $\gamma$  ou pela rápida conversão catalítica de mtROS vazados em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por enzimas antioxidantes, como superóxido dismutases (Macmillan-Crow and Crow, 2011). O emprego de metodologias refinadas para detecção de mtROS,

como cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS) e técnica de ressonância paramagnética de elétrons (EPR)/*spin-trapping* "livre de sonda" (Cheng *et al.*, 2018) poderia nos dar uma pista melhor sobre a produção de mtROS nessas células.

O aumento da nitração de proteínas observado em nosso modelo também pode ser explicado pelos efeitos de dano combinatórios entre a ativação aumentada de NF- $\kappa$ B/NOS2 por IFN- $\gamma$ . Uma sinalização aumentada da via NF- $\kappa$ B/NOS2, secundária a mutações observadas em genes ligados à inflamação, pode ter sido responsável pelo aumento de NO e nitração de proteínas nos pacientes heterozigotos.

Nosso estudo teve limitações. O número reduzido de pacientes MEC analisados pode mascarar a identificação de mutações mitocondriais adicionais e o número reduzido de EBV-LCL empregado para os ensaios funcionais apresenta apenas resultados sugestivos e não definitivos. No entanto, as diferenças identificadas na frequência de variantes genética entre os grupos MEC (34 variantes) e FI foram robustas, e um fenótipo de fenótipo celular/molecular foi associado à variante. Para estimar se de fato essa via poderia estar influenciando nas respostas das EBV-LCLs dos pacientes, testes adicionais precisam ser feitos como por exemplo silenciar as vias associadas aos genes nas linhagens e medir novamente como as linhagens responderiam ao estímulo com IFN- $\gamma$ .

## 7. Conclusão

- Foram identificadas mutações em 34 genes nos 13 pacientes MEC;
- 5 dos 13 pacientes MEC apresentam mutação em gene mitocondrial MRPS18B c.688C>G p.P230A (4 em heterozigose e 1 em homozigose) e somente foi identificada em 1 dos 45 nos pacientes FI, em heterozigose;
- Estimulação *in vitro* com IFN- $\gamma$  de EBV-LCL do paciente MEC portador da mutação homozigota no gene mitocondrial MRPS18B causa diminuição da síntese de ATP e aumento de mtROS, nitrito, nitração de proteínas.
- Estimulação *in vitro* com IFN- $\gamma$  de EBV-LCL dos pacientes MEC portadores da mutação em heterozigose no gene mitocondrial MRPS18B promoveu aumento de nitrito e de nitração de proteínas, quando comparado com o grupo sem mutação;

A presença de mutação em gene mitocondrial pode estar ligada ao desenvolvimento do megaesôfago em pacientes com doença de Chagas, secundária ao aumento do estresse nitro-oxidativo e diminuição de função mitocondrial quando em homozigose.



## 8. Anexos

### ANEXO I

Nº CAAE: 35658720.2.0000.0068

Título das Genética e patogenia de megaesôfago chagásico: identificação de variantes patogênicas raras e investigação de seu impacto funcional

## HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- HCFMUSP

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

---

#### DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa: Genética e patogenia de megaesôfago chagásico: identificação de variantes patogênicas raras e investigação de seu impacto funcional.

Pesquisador Principal: Prof. Dr. Edecio Cunha

Neto Departamento/Instituto: Instituto do  
Coração

1. Você está sendo convidado a participar do estudo por ser portador da Doença de Chagas. O objetivo do estudo é avaliar porque algumas pessoas apresentam o megaesôfago, sendo portadoras ou não da doença de Chagas. Procuramos também entender por que apenas um grupo dos portadores da doença de Chagas desenvolve o megaesôfago. Para isso compararemos os pacientes com megaesôfago chagásico, portadores da forma indeterminada da doença de Chagas, e portadores de megaesôfago não chagásico. Vamos estudar aspectos genéticos, imunológicos, e funcionais das mitocôndrias, a parte da célula que produz energia. Já se sabe que alguns pacientes com Chagas possuem mutações que afetam as mitocôndrias, e queremos avaliar se essas mutações podem causar o megaesôfago e outras formas da doença de Chagas.

2. Para isso, coletaremos uma amostra de sangue de até 45 ml (correspondente a 5 colheres de sopa) de sua veia do braço, com agulha estéril descartável. Afora a leve picada e talvez um hematoma no local, o (a) senhor (a) não terá desconforto ou risco adicional. Com o sangue coletado, extrairemos células do sangue, DNA, soro e plasma para estudos imunológicos, genéticos e funcionais. Talvez você seja convocado de novo, para nova coleta de sangue, dependendo do resultado da análise da primeira amostra.
3. Não há benefício direto e imediato para o participante. Entretanto, a pesquisa ajudará a encontrar um tratamento mais eficiente para a Doença de Chagas no futuro para outros pacientes, ou até mesmo ao (à) senhor (a) no futuro.
4. Você pode recusar-se a participar, e também deixar o estudo em qualquer momento, sem penalização alguma, retirando o consentimento para participação no estudo; a continuidade de seu tratamento na Instituição é garantida. Será mantido sigilo e privacidade sobre seus dados pessoais ou resultados de exames. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante. Você receberá uma via deste documento (Termo de consentimento livre e esclarecido)
5. Você tem o direito de saber sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores, com a opção de tomar ou não conhecimento destas informações.
6. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Você pode ser indenizado em caso de eventual dano decorrente da pesquisa, embora este seja improvável.
7. O material biológico (sangue, células do sangue, DNA) obtido para esta pesquisa será armazenado para execução dessa pesquisa após acúmulo de vários pacientes, de acordo com a resolução CNS 441/2011, de 12 de maio de 2011. Seu material ficará armazenado por 5 (cinco) anos em biorrepositório, localizado no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração-HCFMUSP. Se precisarmos armazenar sua amostra por mais que 5 anos, será solicitada a renovação do seu consentimento. Se precisarmos utilizar sua amostra no futuro, em outro estudo, entraremos em contato com você por telefone e/ou telegrama para solicitar novo consentimento. Toda nova pesquisa só será realizada com a aprovação do do. A confidencialidade de seus dados será mantida e o(a) senhor(a) receberá uma via assinada pelo pesquisador principal deste termo de consentimento.

8. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Edecio Cunha Neto, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 Bloco II, 9º andar – São Paulo, SP 05403-904, Telefones (11) 2661-5914 ou 2661-5906, email [edecunha@gmail.com](mailto:edecunha@gmail.com). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585 / 2661- 1548 / 2661-1549 ou e-mail: [cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br). O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. Visa salvaguardar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do sujeito da pesquisa.
9. Informamos que caso seja realizada alguma transferência do material biológico humano armazenado, esta será comunicada ao participante da pesquisa, sempre que possível. Caso ocorra perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como o encerramento do Biorrepositório, o participante de pesquisa será informado, Além disso o participante de pesquisa ou seu responsável poderá solicitar a devolução ou destruição das amostras biológicas ainda não processadas, mediante formalização da desistência, valendo a partir da data desta manifestação.
10. Os participantes terão direito a toda forma de acompanhamento e assistência integral gratuita inclusive considerando benefícios e acompanhamentos durante o período necessário, inclusive posterior ao encerramento e/ ou a interrupção da pesquisa. O pesquisador principal responsabiliza-se em proporcionar assistência imediata aos participantes nas diferentes fases da pesquisa bem como responsabilizarem-se pela assistência integral aos participantes da pesquisa bem como no que se refere às complicações e danos decorrentes da pesquisa.
11. Você autoriza, ou não, que outras pessoas sejam contatadas (no caso seus familiares), qual a pessoa/membro da família que poderá ser contatado:

NÃO ( )

SIM ( ) Nome: \_\_\_\_\_ Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Genética e patogenia de megaesôfago chagásico: identificação de variantes patogênicas raras e investigação de seu impacto funcional”. Eu discuti com o Pesquisador Responsável Dr. Edecio Cunha Neto sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo assinando este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do paciente/representante legal      Data      /      /

---

Assinatura do responsável pelo estudo      Data      /      /

---

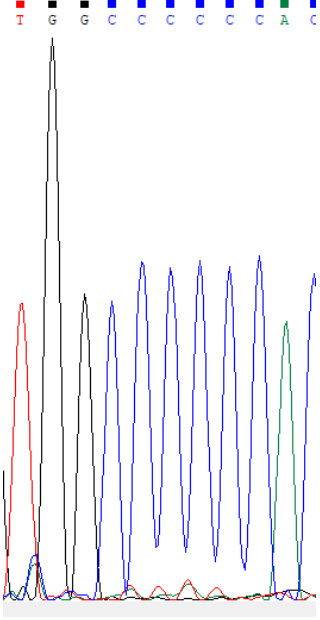
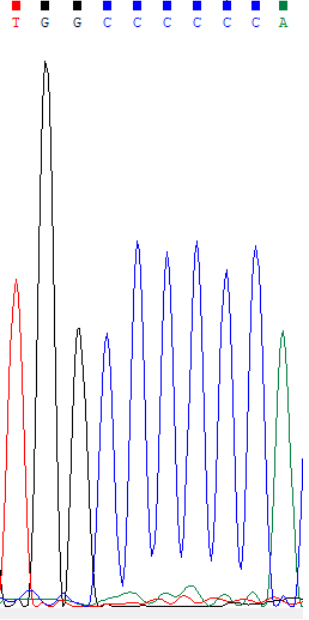
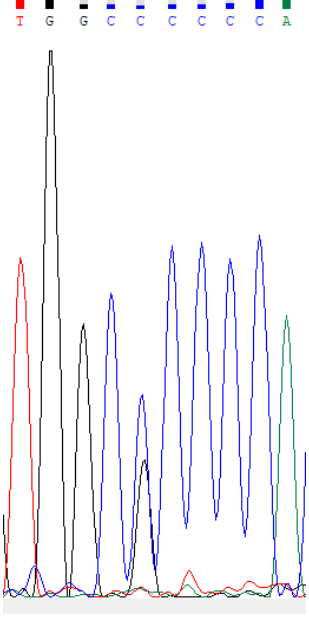
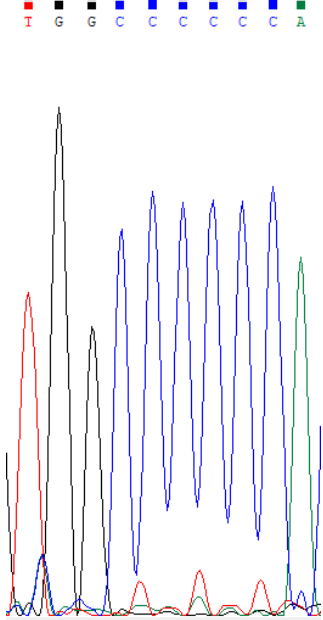
## DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

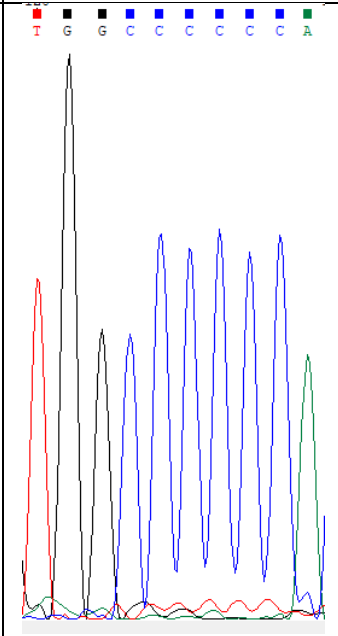
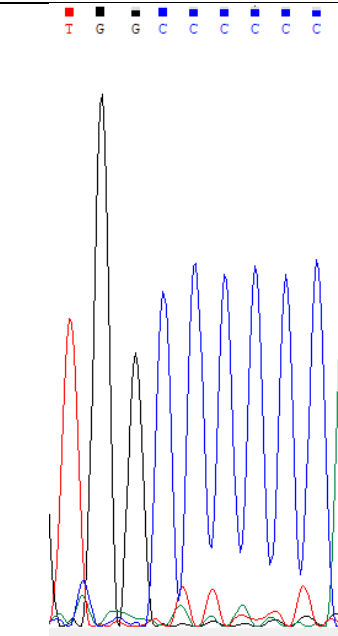
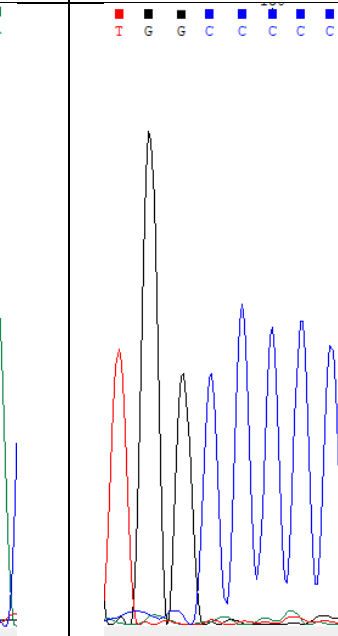
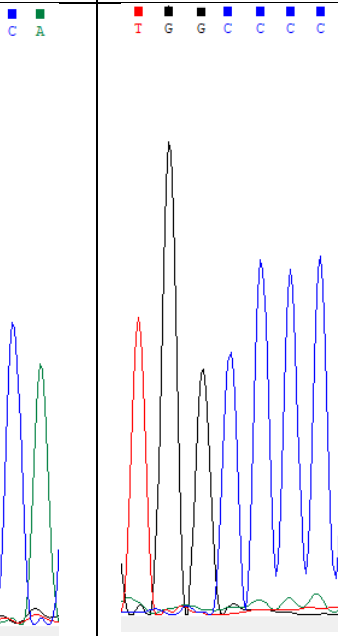
1.NOME:.....  
 ..... DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :  
 ..... SEXO : .M  F  DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
 ENDEREÇO ..... Nº..... APTO: .....  
 BAIRRO:.....CIDADE:.....  
 CEP:.....TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL  
 ..... NATUREZA (grau  
 de parentesco, tutor, curador etc.) .....  
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M  F   
 DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....  
 ENDEREÇO: ..... Nº..... APTO: .....  
 BAIRRO:..... CIDADE: .....  
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

## Apêndice I

Figura Suplementar 1 Cromatogramas de Sanger de pacientes MEC

Pacientes	MEC02	MEC03	MEC04	MEC05
Genótipo exoma	C/C	C/C	C/G	C/C
Genótipo Sanger	C/C	C/C	C/G	C/C
				

Pacientes	MEC09	MEC10	MEC11	MEC13
Genótipo exoma	C/C	C/C	C/C	C/C
Genótipo Sanger	C/C	C/C	C/C	C/C
				

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L. C. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Autoimmun**, v. 17, n. 1, p. 99-107, Aug 2001. ISSN 0896-8411. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11488642> >.

ALMEIDA, P. S. et al. [Survey of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) fauna in domestic environments and natural infection by Trypanosomatidae in the State of Mato Grosso do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 4, p. 374-80, 2008 Jul-Aug 2008. ISSN 1678-9849. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18853010> >.

ARANTES, R. M. et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Am J Pathol**, v. 164, n. 4, p. 1361-8, Apr 2004. ISSN 0002-9440. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039223> >.

BOCCHI, E. A. et al. Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to Cardiomyopathy Treatment. **J Am Coll Cardiol**, v. 70, n. 12, p. 1510-1524, Sep 2017. ISSN 1558-3597. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28911515> >.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 5, p. 645-57, Sep 2007. ISSN 0891-5849. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17664129> >.

CASTAGNA, A. E. et al. Late onset Leigh syndrome and ataxia due to a T to C mutation at bp 9,185 of mitochondrial DNA. **Am J Med Genet A**, v. 143A, n. 8, p. 808-16, Apr 2007. ISSN 1552-4825. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17352390> >.

CAVDAR KOC, E. et al. The small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Identification of the full complement of ribosomal proteins present. **J Biol Chem**, v. 276, n. 22, p. 19363-74, Jun 01 2001. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11279123> >.

CHELIMSKY, G. et al. Achalasia as the harbinger of a novel mitochondrial disorder in childhood. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 40, n. 4, p. 512-7, Apr 2005. ISSN 0277-2116. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15795604> >.

CHEN, X. H. et al. TNF-alpha induces mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Cell Endocrinol**, v. 328, n. 1-2, p. 63-9, Oct 2010. ISSN 1872-8057. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20667497> >.



CHENG, G. et al. Detection of mitochondria-generated reactive oxygen species in cells using multiple probes and methods: Potentials, pitfalls, and the future. **J Biol Chem**, v. 293, n. 26, p. 10363-10380, 06 29 2018. ISSN 1083-351X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29739855> >.

CHEVILLARD, C. et al. Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie. **Front Immunol**, v. 9, p. 2791, 2018. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30559742> >.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 683230, 2014. ISSN 1466-1861. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25210230> >.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Comparative study of the presence of Trypanosoma cruzi kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology**, v. 131, n. Pt 5, p. 627-34, Nov 2005. ISSN 0031-1820. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16255821> >.

\_\_\_\_\_. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Hum Pathol**, v. 38, n. 8, p. 1256-64, Aug 2007. ISSN 0046-8177. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17490721> >.

DE OLIVEIRA, R. B. et al. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **Am J Gastroenterol**, v. 93, n. 6, p. 884-9, Jun 1998. ISSN 0002-9270. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9647012> >.

DIAS, F. C. et al. Human leucocyte antigen-G (HLA-G) and its murine functional homolog Qa2 in the Trypanosoma cruzi Infection. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 595829, 2015. ISSN 1466-1861. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25688175> >.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 208-18, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753476> >.

EL-HATTAB, A. W.; SCAGLIA, F. Mitochondrial Cardiomyopathies. **Front Cardiovasc Med**, v. 3, p. 25, 2016. ISSN 2297-055X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27504452> >.

FERRARI, A.; DEL'OLIO, S.; BARRIENTOS, A. The Diseased Mitoribosome. **FEBS Lett**, v. 595, n. 8, p. 1025-1061, 04 2021. ISSN 1873-3468. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33314036> >.

FINSTERER, J. Mitochondriopathies. **Eur J Neurol**, v. 11, n. 3, p. 163-86, Mar 2004. ISSN 1351-5101. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009163> >.

FINSTERER, J.; FRANK, M. Gastrointestinal manifestations of mitochondrial disorders: a systematic review. **Therap Adv Gastroenterol**, v. 10, n. 1, p. 142-154, Jan 2017. ISSN 1756-283X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28286566> >.

GENG, Y.; HANSSON, G. K.; HOLME, E. Interferon-gamma and tumor necrosis factor synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, v. 71, n. 5, p. 1268-76, Nov 1992. ISSN 0009-7330. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1394884> >.

GIBBONS, D. et al. Characteristics of chronic megacolon among patients diagnosed with multiple endocrine neoplasia type 2B. **United European Gastroenterol J**, v. 4, n. 3, p. 449-54, Jun 2016. ISSN 2050-6406. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27403312> >.

GOPISETTY, G.; THANGARAJAN, R. Mammalian mitochondrial ribosomal small subunit (MRPS) genes: A putative role in human disease. **Gene**, v. 589, n. 1, p. 27-35, Sep 01 2016. ISSN 1879-0038. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27170550> >.

GORMAN, G. S. et al. Mitochondrial diseases. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16080, 10 2016. ISSN 2056-676X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27775730> >.

GREBER, B. J. et al. Ribosome. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. **Science**, v. 348, n. 6232, p. 303-8, Apr 17 2015. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25837512> >.

GUNAWARDENA, D.; RAJU, R.; MÜNCH, G. Hydrogen peroxide mediates pro-inflammatory cell-to-cell signaling: a new therapeutic target for inflammation? **Neural Regen Res**, v. 14, n. 8, p. 1430-1437, Aug 2019. ISSN 1673-5374. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30964069> >.

GUPTA, S. et al. Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 10, p. 1414-21, Nov 2009. ISSN 1873-4596. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686837> >.

HIGUCHI, M. L. et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. **Clin Cardiol**, v. 10, n. 11, p. 665-70, Nov 1987. ISSN 0160-9289. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3677499> >.

HUSSAIN, T.; MULHERKAR, R. Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. **Int J Mol Cell Med**, v. 1, n. 2, p. 75-87, 2012. ISSN 2251-9637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24551762> >.

KALOVIDOURIS, A. E.; PLOTKIN, Z.; GRAESSER, D. Interferon-gamma inhibits proliferation, differentiation, and creatine kinase activity of cultured human muscle cells. II. A possible role in myositis. **J Rheumatol**, v. 20, n. 10, p. 1718-23, Oct 1993. ISSN 0315-162X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8295184> >.

KANG, S. et al. Batten disease is linked to altered expression of mitochondria-related metabolic molecules. **Neurochem Int**, v. 62, n. 7, p. 931-5, Jun 2013. ISSN 1872-9754. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23524239> >.

KAUPPINEN, A. et al. Antagonistic crosstalk between NF- $\kappa$ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. **Cell Signal**, v. 25, n. 10, p. 1939-48, Oct 2013. ISSN 1873-3913. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770291> >.

KOHDA, M. et al. A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. **PLoS Genet**, v. 12, n. 1, p. e1005679, Jan 2016. ISSN 1553-7404. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26741492> >.

LEE, H. J. et al. The role of STAT1/IRF-1 on synergistic ROS production and loss of mitochondrial transmembrane potential during hepatic cell death induced by LPS/d-GalN. **J Mol Biol**, v. 369, n. 4, p. 967-84, Jun 2007. ISSN 0022-2836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475277> >.

LEWIS, J. A.; HUQ, A.; NAJARRO, P. Inhibition of mitochondrial function by interferon. **J Biol Chem**, v. 271, n. 22, p. 13184-90, May 1996. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8662694> >.

LIANG, C.; AHMAD, K.; SUE, C. M. The broadening spectrum of mitochondrial disease: shifts in the diagnostic paradigm. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 4, p. 1360-7, Apr 2014. ISSN 0006-3002. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24239706> >.

LUSS, H. et al. Characterization of inducible nitric oxide synthase expression in endotoxemic rat cardiac myocytes in vivo and following cytokine exposure in vitro. **J Mol Cell Cardiol**, v. 27, n. 9, p. 2015-29, Sep 1995. ISSN 0022-2828. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8523461> >.

LUZ, P. R. et al. Association of L-ficolin levels and FCN2 genotypes with chronic Chagas disease. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60237, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23593180> >.

MACE, S.; SHELTON, G. D.; EDDLESTONE, S. Megaesophagus. **Compend Contin Educ Vet**, v. 34, n. 2, p. E1, Feb 2012. ISSN 1940-8315. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22488663> >.

MACMILLAN-CROW, L. A.; CROW, J. P. Does more MnSOD mean more hydrogen peroxide? **Anticancer Agents Med Chem**, v. 11, n. 2, p. 178-80, Feb 2011. ISSN 1875-5992. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21291402> >.

MAITI, A. K. et al. IL-4 Protects the Mitochondria Against TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  Induced Insult During Clearance of Infection with *Citrobacter rodentium* and *Escherichia coli*. **Sci Rep**, v. 5, p. 15434, Oct 20 2015. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26481427> >.

MARIAPPAN, N. et al. NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. **Cardiovasc Res**, v. 85, n. 3, p. 473-83, Feb 2010. ISSN 1755-3245. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729361> >.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 64, n. 12, p. 1219-24, 2009. ISSN 1980-5322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20037711> >.

MENEGHELLI, U. G. Chagas' disease: a model of denervation in the study of digestive tract motility. **Braz J Med Biol Res**, v. 18, n. 3, p. 255-64, 1985. ISSN 0100-879X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3939103> >.

MENEGHELLI, U. G. et al. Basal motility of dilated and non-dilated sigmoid colon and rectum in Chagas' disease. **Arq Gastroenterol**, v. 19, n. 3, p. 127-32, 1982 Jul-Sep 1982. ISSN 0004-2803. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6821025> >.

MEYER, A. et al. IFN- $\beta$ -induced reactive oxygen species and mitochondrial damage contribute to muscle impairment and inflammation maintenance in dermatomyositis. **Acta Neuropathol**, v. 134, n. 4, p. 655-666, Oct 2017. ISSN 1432-0533. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28623559> >.

MUSHTAQ, M. et al. S18 family of mitochondrial ribosomal proteins: evolutionary history and Gly132 polymorphism in colon carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55649-55662, Aug 23 2016. ISSN 1949-2553. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27489352> >.

NI, C. et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity involves IFN $\gamma$ -mediated metabolic reprogramming in cardiomyocytes. **J Pathol**, v. 247, n. 3, p. 320-332, Mar 2019. ISSN 1096-9896. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30426505> >.

NICOLSON, G. L. Mitochondrial Dysfunction and Chronic Disease: Treatment With Natural Supplements. **Integr Med (Encinitas)**, v. 13, n. 4, p. 35-43, Aug 2014. ISSN 1546-993X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26770107> >.

NOGUEIRA, L. G. et al. Myocardial gene expression of T-bet, GATA-3, Ror- $\gamma$ t, FoxP3, and hallmark cytokines in chronic Chagas disease cardiomyopathy: an essentially unopposed TH1-type response. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 914326, 2014. ISSN 1466-1861. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25152568> >.

\_\_\_\_\_. Myocardial Chemokine Expression and Intensity of Myocarditis in Chagas Cardiomyopathy Are Controlled by Polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, Oct 2012. ISSN 1935-2735. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000310527200032 >.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, Jun 1979. ISSN 0003-2697. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36810> >.

OUARHACHE, M. et al. Rare Pathogenic Variants in Mitochondrial and Inflammation-Associated Genes May Lead to Inflammatory Cardiomyopathy in Chagas Disease. **J Clin Immunol**, v. 41, n. 5, p. 1048-1063, Jul 2021. ISSN 1573-2592. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33660144> >.

PISSETTI, C. W. et al. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development Trypanosoma cruzi infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 3, p. e976, Mar 2011. ISSN 1935-2735. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21408088> >.

PUSKARICH, M. A. et al. Plasma levels of mitochondrial DNA in patients presenting to the emergency department with sepsis. **Shock**, v. 38, n. 4, p. 337-40, Oct 2012. ISSN 1540-0514. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22777124> >.

RADA, B.; LETO, T. L. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. **Contrib Microbiol**, v. 15, p. 164-187, 2008. ISSN 1420-9519. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511861> >.

RAKSHIT, S. et al. Interferon-gamma induced cell death: Regulation and contributions of nitric oxide, cJun N-terminal kinase, reactive oxygen species and peroxynitrite. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2645-61, Nov 2014. ISSN 0006-3002. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24983769> >.

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 5, p. 637-44, May 1993. ISSN 0002-9637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8517482> >.

REIS, M. M. et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial Trypanosoma cruzi antigens. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 83,

n. 2, p. 165-72, May 1997. ISSN 0090-1229. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143377> >.

RIBEIRO, B. M.; CREMA, E.; RODRIGUES, V. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. **Hum Immunol**, v. 69, n. 8, p. 484-9, Aug 2008. ISSN 0198-8859. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18582517> >.

ROCHA RODRIGUES, D. B. et al. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 361730, 2012. ISSN 1740-2530. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811738> >.

RODRIGUES, M. M. et al. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a Trypanosoma cruzi gene. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 3855-63, Aug 1999. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417149> >.

ROSCOE, A. et al. Chagas Cardiomyopathy: A Comprehensive Perioperative Review. **J Cardiothorac Vasc Anesth**, Apr 2018. ISSN 1532-8422. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29803311> >.

ROSSIGNOL, R. et al. Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies. **J Biol Chem**, v. 274, n. 47, p. 33426-32, Nov 1999. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559224> >.

SCAGLIA, F. et al. Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. **Pediatrics**, v. 114, n. 4, p. 925-31, Oct 2004. ISSN 1098-4275. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466086> >.

SILVA NUNES, J. P. et al. Co-exposure of cardiomyocytes to IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induces mitochondrial dysfunction and nitro-oxidative stress: implications for the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. 2021.

SOUSA, G. R. et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e87082, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24603474> >.

TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in chagas disease--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463-91, Aug 2006. ISSN 0074-0276. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072450> >.

TEIXEIRA, A. R. et al. Chagas disease. **Postgrad Med J**, v. 82, n. 974, p. 788-98, Dec 2006. ISSN 1469-0756. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17148699> >.

TEIXEIRA, P. C. et al. Selective decrease of components of the creatine kinase system and ATP synthase complex in chronic Chagas disease cardiomyopathy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 6, p. e1205, Jun 2011. ISSN 1935-2735. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21738806> >.

THAKARE, R.; DASGUPTA, A.; CHOPRA, S. An update on benznidazole for the treatment of patients with Chagas disease. **Drugs Today (Barc)**, v. 54, n. 1, p. 15-23, Jan 2018. ISSN 1699-3993. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29569658> >.

TORZEWSKI, M. et al. Chronic inflammatory cardiomyopathy of interferon  $\gamma$ -overexpressing transgenic mice is mediated by tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Am J Pathol**, v. 180, n. 1, p. 73-81, Jan 2012. ISSN 1525-2191. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22051774> >.

VAN BERGEN, N. J. et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation compensation may preserve vision in patients with OPA1-linked autosomal dominant optic atrophy. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21347, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21731710> >.

VUJACIC-MIRSKI, K. et al. Development of an Analytical Assay for Electrochemical Detection and Quantification of Protein-Bound 3-Nitrotyrosine in Biological Samples and Comparison with Classical, Antibody-Based Methods. **Antioxidants (Basel)**, v. 9, n. 5, May 2020. ISSN 2076-3921. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32384768> >.

WAN, X. et al. Defects of mtDNA replication impaired mitochondrial biogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection in human cardiomyocytes and chagasic patients: the role of Nrf1/2 and antioxidant response. **J Am Heart Assoc**, v. 1, n. 6, p. e003855, Dec 2012. ISSN 2047-9980. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316324> >.

WANG, D. et al. Response of the neonatal rat cardiomyocyte in culture to energy depletion: effects of cytokines, nitric oxide, and heat shock proteins. **Lab Invest**, v. 75, n. 6, p. 809-18, Dec 1996. ISSN 0023-6837. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8973476> >.

ZHANG, Q. et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 104-7, Mar 2010. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203610> >.

ZHOU, R. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 221-5, Jan 2011. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124315> >.

ZICKER, F. et al. Physical activity, opportunity for reinfection, and sibling history of heart disease as risk factors for Chagas' cardiopathy. **Am J Trop Med Hyg**, v.

43, n. 5, p. 498-505, Nov 1990. ISSN 0002-9637. Available at: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2240374>>.