

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

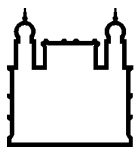
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estudo da associação de marcadores para *Trypanosoma cruzi* e humanos em uma coorte de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas crônica

ANA CAROLINA BASTOS DE LIMA

RIO DE JANEIRO

2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANA CAROLINA BASTOS DE LIMA

Estudo da associação de marcadores para *Trypanosoma cruzi* e humanos em uma coorte de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas crônica

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Dr^a. Constança Felícia de Paoli de Carvalho Britto
Dr. Otacilio da Cruz Moreira

RIO DE JANEIRO

2021

ii

Bastos de Lima, Ana Carolina .

Estudo da associação de marcadores para *Trypanosoma cruzi* e humanos em uma coorte de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas crônica / Ana Carolina Bastos de Lima. - Rio de Janeiro, 2021. xx, 192ff.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

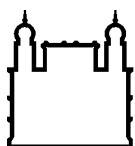
Orientadora: Constança Felicia de Paoli de Carvalho Britto.

Co-orientador: Otacilio da Cruz Moreira.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Doença de Chagas. 2. Polimorfismos de base única. 3. High Resolution Melting. 4. Genotipagem molecular. 5. Diagnóstico molecular. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: ANA CAROLINA BASTOS DE LIMA

Estudo da associação de marcadores para *Trypanosoma cruzi* e humanos em uma coorte de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas crônica

ORIENTADOR (ES): Dr^a. Constança Felicia de Paoli de Carvalho Britto

Dr. Otacilio da Cruz Moreira

Aprovada em: _05___/ _11___/ ___2021__

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Mariana Caldas Waghbi – Membro – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ

Prof^a. Dr^a. Mariana Côrtes Boité – Membro - Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ

Prof^a. Dr^a. Marta de Lana – Membro – UFOP-MG

Prof. Dr. Daniel Pedra Adesse – Suplente - Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello – Suplente – UERJ-RJ

Prof^a. Dr^a. Kelly Salomão Salem – Revisora - Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ

Rio de Janeiro, 05 de novembro de 2021

Às minhas amadas Maria (mãe), Iracy (vó) e Clarinha (filha).

Agradecimentos

Aos meus alicerces: Maria Bastos (mãe) e Iracy Bastos (vó), com certeza sem o apoio, a presença, o carinho, a paciência, o incentivo e principalmente o amor de vocês duas, eu não teria conseguido dar um passo sequer. Peço à Deus que continue dando muita saúde a vocês e que Ele continue permitindo que eu desfrute da companhia e desse amor incondicional de vocês. MUITO OBRIGADA! AMO VOCÊS!!

Ao meu pai, Gildo de Lima que nesses últimos anos foi essencial para minha vida tanto acadêmica quanto pessoal. MUITO OBRIGADA!

À minha riqueza INESTIMÁVEL: Clarinha (filha) por, apesar da pouca idade, compreender que nem sempre a mamãe estava disponível para brincar, ouvir, conversar com você. Saiba que meu amor por você é IMENSURAVEL e não tenho palavras para descrever de forma fidedigna o ser humano INCRÍVEL que você é que me ensina tanto TODOS OS DIAS. Papai do Céu esteja sempre ao seu lado, te proporcionando maravilhas nessa longa jornada que teremos juntas. TE AMO!

Às minhas mais que amigatonas, as madrinhas da Clarinha, Nata Ardente e Suka Bernardo...não tenho palavras para descrever a importância de vocês na minha vida (e na da Clarinha também) e, portanto, o quanto vocês colaboraram nessa outra etapa da minha vida acadêmica também. AMO DEMAIS, muito obrigada por tudo!

À Natália Lins e à Hanna Condelo, por terem estado este tempo todo me ajudando não só na questão laboratorial (LABIMDOE), mas principalmente pela amizade formada que levarei para sempre! Obrigada pela paciência e amor! AMO VOCÊS!

Aos meus orientadores que acreditaram, investiram, apoiaram e que durante esses anos acrescentaram e muito para o meu crescimento profissional: Dr^a Constança Britto e Dr Otacilio Moreira. Com certeza o incentivo e a dedicação de vocês foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Heloísa Martins e Jéssica Constermani, minhas sobrinha e filha científicas, por simplesmente serem autênticas, repletas de energia e com garra de aprender cada vez mais obrigada por me inspirarem (e as vezes me pirarem também rs)!

A todos do LABIMDOE, que de alguma forma me ajudaram para que essa etapa fosse concluída, principalmente a Angélica, Dani Pita e Thais Araújo, sempre com um sorriso no rosto, uma mão amiga e cheias de conhecimento para compartilharem. Thaisinha, agradeço demais por ter sido minha companheira de tantos Congressos (e festas rs), obrigada por TUDO!

À FIOCRUZ pela jornada que faço nessa instituição desde 2008, quando iniciei como IC, tendo feito mestrado e agora concluindo meu doutorado. Obrigada também pela bolsa de estudo concedida ao longo desses anos.

Aos funcionários, pacientes e voluntários do INI, em particular o Dr. Roberto Saraiva e a Luciana, que foram imprescindíveis para que este trabalho pudesse ser realizado.

A todos os funcionários e professores da Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial à Julimar, por ser uma profissional excepcional e ter tido a maior paciência do mundo em me ajudar (principalmente nesta reta final).

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é caracterizada por amplo espectro de desfechos clínicos, variando em severidade desde infecções assintomáticas até as formas graves relacionadas a danos cardíacos e no trato digestivo. No tocante ao *Trypanosoma cruzi*, seu agente etiológico, a heterogeneidade intraespecífica tem sido largamente investigada, e a correlação dos diferentes genótipos com as manifestações clínicas da doença ainda é desafiadora. O perfil genético do hospedeiro e a resposta imune frente à infecção são considerados fatores potencialmente importantes na progressão da doença. Este trabalho pretende analisar parâmetros relacionados ao *T. cruzi* (carga parasitária e genótipo) e humanos (polimorfismos de base única - SNPs em genes de citocinas e quimiocinas), buscando correlacioná-los com as diferentes formas clínicas da DC, sexo e idade dos pacientes. Dos 294 pacientes atendidos no Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, 130 (44,2%) apresentaram PCR em tempo real (qPCR) positiva: 32 (24,6%) apresentavam a forma indeterminada, 74 (56,9%) a forma cardíaca (34 no estágio A, 23 nos estágios B1+B2, 17 nos estágios C+D), 18 (13,8%) com a forma mista e 6 (4,6%) portadores da forma digestiva. A carga parasitária no sangue dos pacientes variou de 0,002 a 72,21 eq. parasitos/mL, com valor da mediana de 0,390 [0,0700 – 2,050] eq. parasitos/mL. Todos os pacientes positivos por qPCR tiveram a identificação dos genótipos de *T. cruzi* diretamente do sangue. Os genótipos TcII e TcVI foram os mais prevalentes, representando 39,2% e 38,5%, respectivamente. Ademais, foi observado infecção única por TcIV em um paciente (de Pernambuco) com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) no estágio A. Infecção única por TcV foi identificada em um paciente oriundo da Bahia apresentando CCC no estágio C; e casos de coinfeção TcII+TcV em um paciente (da Paraíba), com a forma indeterminada, e TcII/TcVI+TcV em outro paciente (de Minas Gerais), também na forma indeterminada. Quando foram comparados genótipos do parasito e carga parasitária, observaram-se medianas de 0,785 e 0,230 eq. parasitos/mL para TcII e TcVI, respectivamente. As frequências de CCC entre os pacientes infectados foram de 43,2% e 35,1%, relacionadas aos genótipos TcII e TcVI, respectivamente. Em relação à genotipagem dos SNPs posicionados nas regiões promotoras de genes de citocinas, desenvolvemos ensaios baseados em qPCR com *High Resolution Melting*, para a padronização e validação dos testes para 15 SNPs em 12 genes de citocinas, sendo estes: *TNFA* (-238G/A rs361525, -308G/A rs1800629 e -1031T/C rs1799964), *IL18* (-1297T/C, rs360719 e rs2043055A/G/T), *IL1B* (-511A/G rs16944), *IL1RN* (+11100T/C/A rs315952), *IL12B* (+1188A/C rs3212227), *IL10* (-1082G/A rs1800896), *IL4* (-509C/T rs2243250), *MIF* (-173G/C, rs755622), *IFNG* (+874T/A rs2430561), *IL17A* (SNP G197A/G, rs2275913), *IL17F* (T7488C/T, rs763780) e *TGFβ1* (códon 10 ou +869T/C/G rs1800470). Dois alvos foram eleitos (*TNFA* SNP -308G/A, rs1800629 e *IL10* SNP -1082G/A, rs1800896) para a identificação destes SNPs na população de estudo. Não foram encontradas evidências de associação destes polimorfismos com a suscetibilidade ao desenvolvimento da DC. Porém, um valor de Qui-Quadrado muito próximo do nível de significância (Borderline 5%), $X^2= 3,742$ e $p=0,053$, foi observado, sugerindo uma tendência de associação do alelo A de *TNFA* ao risco de DC. Em conjunto, tais achados reforçam o conceito de que a interação entre parasito/hospedeiro é essencial para o desenvolvimento da DC, bem como para a sua epidemiologia.

ABSTRACT

Chagas Disease (CD) is characterized by a broad spectrum of clinical outcomes, varying in severity from asymptomatic infection to severe forms related to cardiac and digestive tract damages. Regarding the parasite *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of the disease, its intraspecific heterogeneity has been widely investigated and the correlation of the different genotypes with clinical manifestations of the disease is still a great challenge. The host's genetic profile and the immune response to infection are considered important factors in the progression of the disease. The present work aims to analyze parameters related to *T. cruzi* (parasite load and genotype) and humans (single base polymorphisms – SNPs in cytokines and chemokines genes), searching to correlate them with the different clinical forms of CD, sex and age of the patients. Of the 294 patients assisted in the Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, 130 (44.2%) had positive qPCR results, of which, 32 (24.6%) presented the indeterminate form of CD, 74 (56.9%) the cardiac form (34 in stage A, 23 in stages B1+B2, 17 in stages C+D), 18 (13.8%) with mixed clinical form and 6 (4.6%) with the digestive form. The parasitic load in blood of the patients ranged from 0.002 to 72.21 eq. parasites/mL, with median value of 0.390 [0.0700 - 2.050] eq. parasites/mL. In all positive patients by qPCR, it was possible to identify *T. cruzi* genotypes directly from blood. The genotypes TcII and TcVI were the most prevalent, representing 39.2% and 38.5%, respectively. In addition, a single infection by TcIV was observed in one patient (from Pernambuco) with chagasic cardiomyopathy (CCC) in stage A. A single infection by TcV was identified in one patient (born in Bahia) presenting CCC in stage C. Beyond, co-infection cases by TcII+TcV in one patient (born in Paraíba) with the asymptomatic form, and TcII/TcVI+TcV in other patient, also with the asymptomatic form, from Minas Gerais. When comparing the parasite genotypes and parasite load, it was observed a median of 0.785 and 0.230 eq. parasites/mL for TcII and TcVI genotypes, respectively. Among the infected patients, the frequencies of CCC were 43.2% and 35.1% related to TcII and TcVI genotypes, respectively. Regarding the genotyping of SNPs positioned in the promotor regions of cytokine genes, we developed real-time PCR-based assays with High Resolution Melting for the standardization and validation of the tests for 15 SNPs in 12 human cytokine genes, being these: *TNFA* (-238G/A rs361525, -308G/A rs1800629 and -1031T/C rs1799964), *IL18* (-1297T/C, rs360719 and rs2043055A/G/T), *IL1B* (-511A/G rs16944), *IL1RN* (+11100T/C/A rs315952), *IL12B* (+1188A/C rs3212227), *IL10* (-1082G/A rs1800896), *IL4* (-509C/T rs2243250), *MIF* (-173G/C, rs755622), *IFNG* (+874T/A rs2430561), *IL17A* (SNP G197A/G, rs2275913), *IL17F* (T7488C/T, rs763780) and *TGFβ1* (codon 10 or +869T/C/G rs1800470). Two targets were elected (*TNFA* SNP -308G/A, rs1800629 and *IL10* SNP -1082G/A, rs1800896) for the identification of these SNPs in the study population. It was not found evidences of association of these polymorphisms with the susceptibility of developing CD. Nonetheless, a Chi-square value closely to the significance level (Borderline 5%) was observed ($\chi^2= 3,742$ and $p=0,053$), suggesting a tendency of *TNFA* association with CD risk. Together, these findings reinforce the concept that the interplay between host/parasite is essential for CD development, as well as for the disease epidemiology.

Lista de siglas e abreviaturas

°C – Graus Celsius

µL - Microlitro

A – Adenina

BAT1- *HLA-B Associated transcript 1*

BAV - Bloqueio atrioventricular

BAVT - Bloqueio atrioventricular total

BDAS - Bloqueio divisional anterossuperior

BENDITA - *Benznidazole New Doses Improved Treatment and Associations*

BENEFIT - *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*

BIRD - Bloqueio incompleto de ramo direito

BRE - Bloqueio de ramo esquerdo

BNZ – Benznidazol

C - Citosina

CCC – Cardiomiopatia chagásica crônica

COII - Citocromo oxidase II

DC - Doença de Chagas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dsDNA – *Double stranded DNA*

DTUs - *Discrete typing units*

ECO - Ecocardiograma

ECG – Eletrocardiograma

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

Eq. parasitos - Equivalentes de parasitos

EUA- Estados Unidos da América

FA - Fibrilação atrial

FC- Frequência cardíaca

FEVE - Fração de ejeção de ventrículo esquerdo

fg - Fentograma

Fw - *Forward*

G – Guanina

GEB - *Guanidine/EDTA Blood*

GPI - Glico-fosfatidil-inusitol

h – hora(s)

HCl – Cloreto de hidrogênico

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA – *Human Leukocyte Antigen*

HRM - *High Resolution Melting*

HSP60 - Proteína *Heat shock* 60

IAC - Controle interno de amplificação

IC - Insuficiência cardíaca

ICC - Insuficiência cardíaca congestiva

IFI - Imunofluorescência indireta

IgG – Imunoglobulina G

IHA - Hemaglutinação indireta

IFNG – Gene que codifica a citocina interferon gamma

IFN- γ - Interferon gamma (citocina)

IL – Interleucina

kDNA- Ácido desoxirribonucleico de cinetoplasto

Kg - kilograma

LAMP - *Loop-mediated amplification*

LIT - *Liver infusion triptose*

LSSP - *Low-Stringency Single-Specific Primer*

LTA – Gene que codifica a linfotoxina-alfa

M - Molar

mg – Miligrama

MHC - *Major histocompatibility complex*

MIF - Fator inibitório da migração de macrófagos

mL - Mililitro

Min - Minuto

MLMT - *Multilocus microsatellite typing*

MLST - *Multilocus sequence typing*

mM - MiliMolar

NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

ng - nanograma

NK – Células *natural killer*

nM – Nanomolar

NTC - *Negative template control*

P - *p value*

Pb – Pares de base

pg - Picograma

PBS - Salina tamponada com fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

POC - *Point-of-care*

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RDP4 - *Recombination detection program 4*

rDNA – Ácido desoxirribonucleico ribossomal

RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*

RPM – Rotação por minuto

Rv – Reverse

s – segundo (s)

SatDNA – Ácido desoxirribonucleico nuclear satélite

SL - *Spliced leader*

SNP – *Single nucleotide polymorphism*

ssDNA – *Single stranded DNA*

ST-T - Segmento ST-T

T - Timina

Tc – *Trypanosoma cruzi*

TGFB – Gene que codifica a citocina Fator transformador de crescimento beta

TGF- β – Fator transformador de crescimento beta (citocina)

T_m – Temperatura de *melting*

TNFA – Gene que codifica a citocina Fator de necrose tumoral alfa

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa (citocina)

TPPs - *Target product profiles*

TVNS - Taquicardia ventricular não sustentada

UTR – *Untranslated region*

V - Volts

VE - Ventrículo esquerdo

VNTRs - *Variable number of tandem repeats*

Z – Zimodema

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
Lista de siglas e abreviaturas.....	x
Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Tabelas.....	xx
1. Introdução.....	1
1.1 <i>Aspectos da epidemiologia da doença de Chagas</i>	1
1.2 <i>Diversidade genética de T. cruzi</i>	7
1.3 <i>Fases e formas clínicas da doença de Chagas</i>	16
1.4 Diagnóstico da doença de Chagas	19
1.4.1. Diagnóstico parasitológico e sorológico	19
1.5 Diagnóstico molecular	20
1.6 Tratamento antiparasitário	27
1.7 <i>Resposta imune, citocinas e patogenia da doença de Chagas</i>	29
1.7.1. <i>Polimorfismos de base única em genes de citocinas</i>	37
1.7.2. <i>Estudos de associação entre SNPs em genes de citocinas e doença de Chagas</i>	41
1.7.3. Genotipagem de SNPs por High Resolution Melting (HRM).....	43
1.8 Justificativa	48
2. Objetivos.....	49
2.1 Objetivo geral	49
2.2 Objetivos específicos	49
3. Material e Métodos	50
3.1 Considerações éticas	50
3.2 População de estudo.....	50
3.3 Cultivo de células	54

3.4	Extração de DNA a partir de amostras de sangue periférico e de cultura de parasitos	54
3.5	Quantificação da carga parasitária de <i>T. cruzi</i> por PCR em Tempo Real (qPCR)	55
3.6	Genotipagem de <i>T. cruzi</i> em amostras de sangue periférico	56
3.7	Genotipagem de SNPs por HRM (High Resolution Melting)	58
3.8	Sequenciamento de DNA	61
3.8.1.	Obtenção das referências para HRM: padronização por PCR Gradiente	61
3.9	Análises estatísticas	63
4.	Resultados	65
4.1	Estratificação da coorte do INI/Fiocruz quanto à idade, sexo e formas clínicas	65
4.2	Medida da carga parasitária de <i>T. cruzi</i> por PCR em Tempo Real (qPCR)	69
4.3	Genotipagem molecular de <i>T. cruzi</i>	74
4.4	Correlação entre carga parasitária, genótipo de <i>T. cruzi</i> e manifestação clínica	78
4.5	Genotipagem de SNPs por HRM	80
4.5.1.	Padronização da técnica de HRM	80
4.5.2.	Obtenção dos controles para referência na técnica de HRM	88
4.5.3.	Genotipagem molecular dos SNPs por HRM e análises estatísticas	93
5.	Discussão	104
6.	Conclusão	120
7.	Bibliografia	122
Anexo 1	174
Anexo 2	178
Anexo 3	183
Anexo 4	185
Anexo 5	189

Lista de Figuras

Figura 1.1: Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Figura 1.2: Modelos de origem das linhagens de <i>T. cruzi</i> . (A) “Duas Hibridizações” e (B) “Três Ancestrais”.	10
Figura 1.3: Algoritmo para avaliação do indivíduo com doença de Chagas a partir do eletrocardiograma (ECG) convencional.	18
Figura 1.5: Citocinas desempenhando um papel na orquestração da resposta imune na doença de Chagas: o yin/yang da imunoregulação.....	36
Figura 1.6: SNPs em genes que codificam citocinas e seus possíveis desfechos...40	
Figura 1.7: Análise da fluorescência de dissociação do DNA. A- Dado de fluorescência original mostrando um decréscimo linear da fluorescência em temperaturas mais baixas, seguido por um decaimento abrupto próximo da temperatura de <i>melting</i> (T _m). A fluorescência é nula quando o DNA se apresenta como fita simples. B- Curva de <i>melting</i> normalizada, na qual o dado original de fluorescência está normalizado entre 0 e 100%.....	45
Figura 1.8: Genotipagem de SNP através da dissociação de um pequeno amplicon.	46
Figura 3.1: Diagrama de fluxo dos pacientes e controles envolvidos no estudo.	51
Figura 3.2: Fluxograma para genotipagem de <i>T. cruzi</i> diretamente de amostras clínicas.	57
Figura 4.1: Distribuição das formas clínicas de acordo com o sexo e faixa etária dos pacientes com doença de Chagas crônica pertencentes à coorte do INI.....	67
Figura 4.2: Distribuição dos diferentes estágios da forma clínica cardíaca de acordo com o sexo e faixa etária dos pacientes com doença de Chagas crônica pertencentes à coorte do INI.	68
Figura 4.3: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos 130 pacientes com DC crônica que foram positivos pela qPCR, pertencentes à coorte do INI.....	70
Figura 4.4: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos 130 pacientes pertencentes à coorte do INI, em função das diferentes formas clínicas da doença de Chagas crônica.....	70
Figura 4.5: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos pacientes com diferentes níveis de severidade da cardiomiopatia chagásica, pertencentes à coorte do INI.....	71
Figura 4.6: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos pacientes pertencentes à coorte do INI de acordo com o gênero.	73
Figura 4.7: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos pacientes pertencentes à coorte do INI de acordo com o gênero e faixa etária.....	73

Figura 4.8: Géis de agarose de 2-3% representativos da caracterização molecular de <i>T. cruzi</i> em amostras de sangue de pacientes com DC crônica pertencentes à coorte do INI. A. Região intergênica ac do gene Spliced Leader (SL-IR ac). PM: marcador de peso molecular 100pb; 1: DM28c (Tcl); 2: cepa Y (TclI); 3: 3663 (TclIII); 4-10: amostras de pacientes. B. Região intergênica do Spliced Leader (SI-IR I e II). PM: marcador de peso molecular 100pb; 1: DM28c (Tcl), 2: cepa Y (TclI), 3-7: amostras de pacientes. C. região do gene da subunidade ribossomal 24S α . PM- marcador de peso molecular 100pb; 1: 3663 (TclIII); 2: LL014 (TcV); 3: cepa Y (TclI); 4-7: amostras de pacientes. D. Região correspondente ao fragmento nuclear A10. PM- marcador de peso molecular 100pb; 1: cepa Y (TclI); 2: CL Brener (TcVI); 3-10: amostras de pacientes.	74
Figura 4.9: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos pacientes pertencentes à coorte do INI, de acordo com os genótipos de <i>T. cruzi</i>	79
Figura 4.10: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos pacientes pertencentes à coorte do INI, de acordo com os genótipos de <i>T. cruzi</i> e as diferentes formas clínicas da DC.	80
Figura 4.11: Ensaio preliminar de HRM para padronização da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos. Curvas de dissociação em alta resolução, em formato derivativo, para o alvo <i>TNFA</i> -308G/A rs1800629.....	82
Figura 4.12: Ensaio preliminar de HRM para padronização da concentração dos oligonucleotídeos testados à temperatura de anelamento de 58 °C. Curvas de dissociação em alta resolução, em formato derivativo, para o <i>TNFA</i> -308G/A rs1800629.	83
Figura 4.13: Ensaio preliminar de HRM para padronização da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos. Curvas de dissociação em alta resolução, em formato derivativo, para o alvo <i>IL10</i> SNP -1082G/A rs1800896.....	84
Figura 4.14: Ensaio preliminar de HRM para padronização da concentração dos oligonucleotídeos, a partir da temperatura de anelamento de 60 °C. Curvas de dissociação em alta resolução, em formato derivativo, para o alvo <i>IL10</i> SNP -1082G/A rs1800896.	85
Figura 4.15: Figura representativa das etapas de sequenciamento e HRM para o alvo <i>TNFA</i> SNP -308G/A, rs1800629. Colchetes vermelhos envolvem os nucleotídeos referentes ao SNP (selvagem G/mutante A); Quadrados/retângulos vermelhos estão demarcando o(s) nucleotídeo(s) participante(s) do SNP, troca de G/A. A: Sequência que flanqueia o SNP depositada no dbSNP; B: Eletroferograma gerado das sequências senso e antisenso a partir do sequenciamento; C: Sequências senso e antisenso pareadas, em amarelo destacam-se as sequências do SNP; D: Gráfico da curva normalizada gerada pelo software de HRM.	91
Figura 4.16: Figura representativa das etapas de sequenciamento e HRM para o alvo <i>IL10</i> SNP -1082G/A, rs1800896. Colchetes vermelhos envolvem os nucleotídeos referentes ao SNP (selvagem G/mutante A); Quadrados/retângulos	

vermelhos estão demarcando o(s) nucleotídeo(s) participante(s) do SNP, troca de G/A. **A:** Sequência que flanqueia o SNP depositada no dbSNP; **B:** Eletroferograma gerado das sequencias senso e antisense a partir do sequenciamento; **C:** Sequências senso e antisense pareadas, em amarelo destacam-se as sequências do SNP; **D:** Gráfico da curva normalizada gerada pelo software de HRM.92

Figura 4.17: Curvas de dissociação geradas por HRM para a genotipagem do SNP de *TNFA* (-308G/A, rs1800629). **A:** Gráfico das curvas de dissociação formato derivativo; **B:** Gráfico das curvas de dissociação normalizada; **C:** Gráfico das diferenças.....94

Figura 4.19: Distribuição genotípica de *TNFA* (-308G/A, rs1800629) considerando o grupo de pacientes com DC crônica, realizados através do test de χ^297

Figura 4.20: Proporção dos genótipos avaliados de *TNFA* (-308G/A, rs1800629) considerando o grupo de pacientes com DC crônica, realizados através do test de χ^297

Figura 4.21: Distribuição genotípica de *IL10* (SNP -1082G/A, rs1800896) considerando o grupo de pacientes com DC crônica, realizados através do test de χ^299

Figura 4.22: Proporção dos genótipos avaliados de *IL10* (SNP -1082G/A, rs1800896) considerando o grupo de pacientes com DC crônica, realizados através do test de χ^2 100

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Nomenclatura atual proposta para o taxon <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Tabela 1.2: Polimorfismos em genes de citocinas e suas associações à doença de Chagas.....	42
Tabela 3.1: Características da população de estudo e manifestação clínica.	52
Tabela 3.2: Distribuição dos diferentes estágios de cardiomiopatia chagásica crônica.....	52
Tabela 3.3: Sequência dos oligonucleotídeos para a genotipagem de <i>T. cruzi</i>	58
Tabela 3.4: Sequências dos oligonucleotídeos e tamanhos dos produtos gerados da amplificação dos 15 SNPs em genes de citocinas humanos avaliados por HRM.	59
Tabela 3.5: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a construção dos controles/referências e seus respectivos tamanhos de produtos gerados por PCR convencional.	62
Tabela 4.1: Apresentação numérica das formas clínicas de acordo com o sexo e faixa etária dos pacientes com doença de Chagas crônica pertencentes à coorte do INI.....	66
Tabela 4.2: Dados numéricos dos diferentes estágios da forma clínica cardíaca de acordo com o sexo e faixa etária dos pacientes com doença de Chagas crônica pertencentes à coorte do INI.	67
Tabela 4.3: Tipagem molecular de <i>T. cruzi</i> nas amostras de sangue dos 130 pacientes positivos por qPCR.	75
Tabela 4.4: Distribuição das DTUs de <i>T. cruzi</i> e manifestação clínica correlata.	76
Tabela 4.5: Padronização da temperatura de anelamento do par de oligonucleotídeos para o alvo <i>TNFA</i> -308G/A rs1800629.	82
Tabela 4.9: Valores obtidos da padronização das temperaturas de anelamentos e concentrações dos oligonucleotídeos testados.	87
Tabela 4.12: Distribuição genotípica do SNP de <i>TNFA</i> (-308G/A, rs1800629) entre os grupos de pacientes vs controle.	96
Tabela 4.13: Frequência alélica do SNP de <i>TNFA</i> (-308G/A, rs1800629) em pacientes com DC crônica e controle.....	98
Tabela 4.14: Distribuição genotípica do SNP de <i>IL10</i> (SNP -1082G/A, rs1800896) entre os grupos de pacientes vs controle.....	99
Tabela 4.15: Frequência alélica do SNP de <i>IL10</i> (SNP -1082G/A, rs1800896) em pacientes com DC crônica e controle.....	100
Tabela 4.16: Análise pela Correlação de Pearson dos dados Forma Clínica, Idade, Sexo, Carga Parasitária, SexIdade e os SNPs de <i>TNFA</i> e <i>IL10</i>	102
Tabela 4.17: Análise de Regressão Logística Binomial entre Sexo, Idade e os SNPs dos genes de <i>TNFA</i> e <i>IL10</i>	103

1. Introdução

1.1 Aspectos da epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), é uma doença negligenciada, endêmica em 21 países nas Américas (sul do Brasil e Chile até os Estados Unidos), sendo o México apontado como um dos países mais afetados, atualmente (WHO 2015; Arnal *et al.*, 2019). Mundialmente, estima-se que mais de 10 mil pessoas morram por ano em consequência desta doença, e que aproximadamente 6 milhões estejam infectadas na América Latina (Rassi *et al.*, 2010, 2012; WHO 2021). Fluxos migratórios levaram à expansão da DC em todo o mundo, especialmente a partir do início dos anos 2000, fazendo com que a doença tenha emergido em países não-endêmicos da América do Norte, Europa e a Região do Pacífico Ocidental (Schmunis & Yadon 2010; Albajar-Viñas & Jannin 2011; Coura & Viñas 2010). Contudo, a DC é provavelmente uma doença antiga: o DNA do *T. cruzi* foi registrado em espécimes de tecido de múmias em países Andinos pré-Colombianos há 9.000 anos atrás (cerca de 7050 AC) (Aufderheide *et al.*, 2004).

Em ambientes endêmicos, a principal via de transmissão do parasito para os hospedeiros vertebrados, é através do contato com as fezes/urina dos vetores, insetos hematófagos conhecidos como triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), os quais eliminam formas metacíclicas infectantes de *T. cruzi* junto às excretas, durante o repasto sanguíneo no hospedeiro (Chagas 1909; Abad-Franch *et al.*, 2015; Pérez-Molina & Molina 2018). Ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, o inseto vetor adquire o parasito, que por sua vez, é capaz de se replicar dentro do trato digestivo do triatomíneo (sob a forma de epimastigotas), sendo excretado pelas fezes/urina (como tripomastigotas metacíclicos). Quando o vetor infectado realiza o repasto sanguíneo em um humano, ele tende a defecar, pois há o preenchimento da região abdominal com o sangue humano, pressionando e forçando a eliminação das fezes. Com isso, o parasito contido nas excretas atravessa a lesão na pele ou a mucosa e entra na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. A partir desse momento, as formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* penetram em diversas células, escapam do vacúolo fagolisosomal e, dentro delas, se transformam em amastigotas (formas replicantes intracelulares). Após vários ciclos reprodutivos, os amastigostas intracelulares se diferenciam em

tripomastigotas, os quais rompem a célula infectada, podendo invadir células vizinhas e/ou cair nas correntes sanguínea e linfática, infectando outros órgãos e tecidos, e também podem ser ingeridos pelo inseto vetor, se diferenciando em epimastigotas, dando início a um novo ciclo (Chagas 1909, Pérez-Molina & Molina 2018) (**Figura 1.1**).

Em áreas sem exposição vetorial, outras formas de transmissão do *T. cruzi* se tornaram as principais vias de veiculação do parasito, tais como a transmissão congênita (materno-fetal) (Howard *et al.*, 2014; Carlier & Truyens 2015), transfusão de sangue ou hemoderivados de doadores infectados, transplante de órgãos (Schmunis 2007; Kun *et al.*, 2009; Gontijo & Santos 2009; Fiorelli *et al.*, 2011) e por acidentes de laboratório (Dias 1994; WHO 2010). Por outro lado, a ocorrência de surtos de casos agudos, potencialmente fatais, da DC, por ingestão de bebidas ou alimentos contaminados com *T. cruzi* presentes nas excretas do vetor ou no próprio inseto macerado (transmissão oral) tem sido cada vez mais frequente em regiões que até então apresentavam poucos relatos da doença, como por exemplo a Amazônia Brasileira e a Venezuela (Shikanai-Yasuda & Carvalho 2012; de Noya *et al.*, 2015). Importante destacar que a transmissão oral tem sido observada também em outros países como Colômbia, Bolívia, Equador, Argentina e Guiana Francesa (Velásquez-Ortiz & Ramírez 2020). Originalmente, outras formas de infecção oral foram descritas, que até hoje geram polêmicas, como por exemplo, através de alimentos contaminados com secreções das glândulas anais de *Didelphis marsupialis* (Deane *et al.*, 1984; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991), ou pelo consumo de carne de caça crua de animais infectados (de Noya *et al.*, 2015).

Além dos humanos, a transmissão vetorial clássica não ocorre com facilidade em espécies de animais que apresentam pelos e pele espessa; portanto, tem sido especulado que a transmissão usual do parasito entre reservatórios selvagens e domésticos deva se dar por via oral (de Noya & González, 2015). O somatório de mudanças ecológicas e a exposição de humanos aos triatomíneos infectados e aos alimentos contaminados, associados ao processamento inadequado, tem sido a fonte de infecção mais frequente nas microepidemias observadas até agora, em surtos orais de DC (Velásquez-Ortiz & Ramírez 2020). Enquanto que a transmissão vetorial clássica está associada à pobreza, a população com risco de contrair DC via oral é representada por toda a população continental de áreas endêmicas, não importando a classe social.

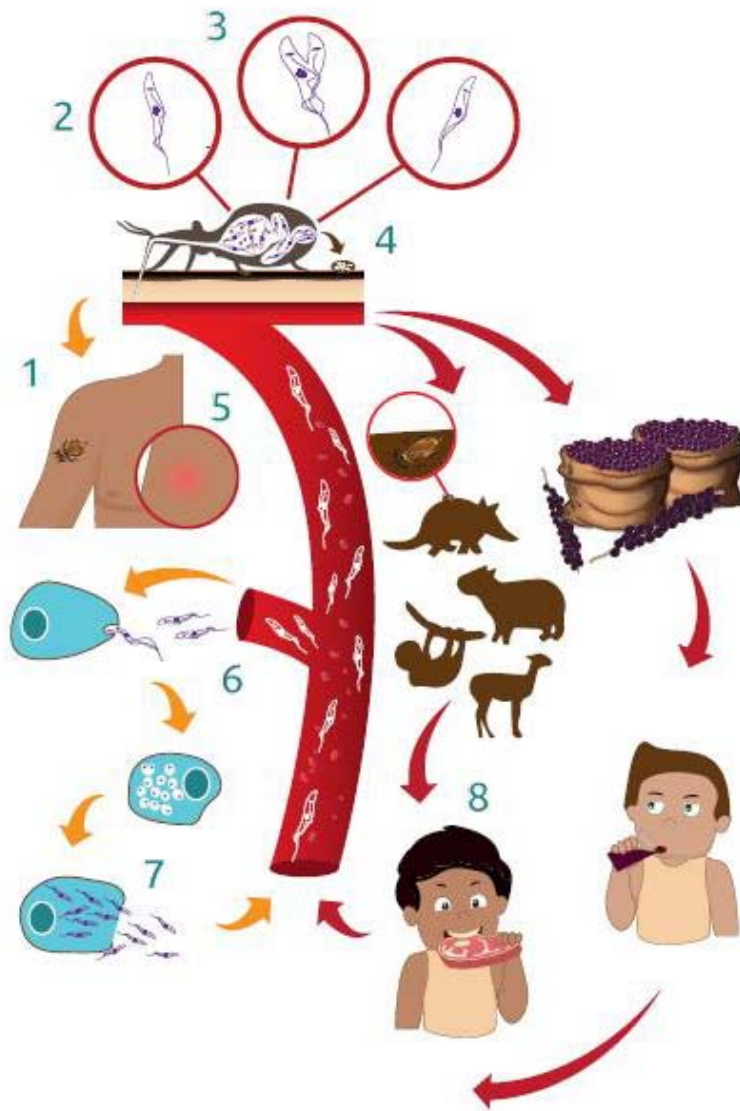


Figura 1.1: Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. 1. O ciclo de vida do *T. cruzi* começa quando o triatomíneo ingere tripomastigotas presentes no sangue de um hospedeiro mamífero infectado; 2-3. No intestino do vetor, os tripomastigotas transformam-se em epimastigotas, o principal estágio replicativo no hospedeiro invertebrado; 4- Epimastigotas migram para o reto e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infectantes, sendo excretados junto com as fezes/urina do vetor. 5- Tripomastigotas metacíclicos entram no hospedeiro mamífero através da ferida causada pela picada do vetor ou pela mucosa intacta do hospedeiro. 6- Essas formas invadem diferentes tipos de células nucleadas do vertebrado infectado. No citoplasma, tripomastigotas se diferenciam em amastigotas intracelulares, as quais se replicam, em média, a cada 12 horas durante 4-5 dias; 7- Ao final deste período, amastigotas transformam-se em tripomastigotas, rompem as células e são liberados na corrente sanguínea do hospedeiro. Os parasitos circulantes podem invadir novas

células e iniciar novos ciclos de replicação, além de serem capazes de infectar insetos vetores que se alimentem do hospedeiro; 8- O homem também pode se infectar consumindo carne de caça crua ou bebidas contaminadas com o parasito.

Fonte: Meis & Castro 2017.

O *Trypanosoma cruzi* está amplamente distribuído no continente americano e foi visualizado pela primeira vez no intestino de triatomíneos no município de Lassance, Minas Gerais, pelo cientista Carlos Chagas, que também descreveu a presença destes flagelados em reservatórios (Chagas 1909). Além de caracterizar o agente causador da infecção – o protozoário parasito *T. cruzi* – Chagas identificou o inseto transmissor - o triatomíneo, reservatórios domésticos e silvestres, e pôde ainda fazer a descrição da doença e o diagnóstico parasitológico de fase aguda (Kropf & Sá 2009; Rey 2011).

Mamíferos e insetos podem ser encontrados naturalmente infectados por *T. cruzi* em qualquer ecótopo silvestre, mas ainda pouco se conhece sobre a cinética da transmissão desse parasito em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados no ambiente natural (Jansen *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2007). Em animais silvestres, a transmissão por via oral vem sendo documentada, onde se observou que o suco gástrico aprimora o potencial infeccioso do parasito, e que esse tipo de transmissão seria a que ocorre com maior frequência entre os animais (Barreto *et al.*, 1978; Calvo-Mendez *et al.*, 1992; Hoft *et al.*, 1996).

A situação epidemiológica da DC no Brasil mudou substancialmente nas últimas décadas, como resultado das ações de controle, das transformações ambientais e de ordem econômica e social (Villela *et al.*, 2009; Silveira 2011; Dias *et al.*, 2016). As estimativas atuais variam de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* (Hotez & Fujiwara 2014; Martins-Melo *et al.*, 2014a), ou cerca de 1,0 - 2,4% da população brasileira (Dias *et al.*, 2016). Como reflexo, permanece elevada a carga de mortalidade no país por DC, sendo uma das quatro maiores causas de morte por doenças infecto-parasitárias, além da DC ser a doença mais negligenciada no Brasil (Martins-Melo *et al.*, 2016). O diagnóstico da doença e o seu manejo continuam sendo um desafio pela ocorrência de novos casos relacionados com a transmissão oral, com a transmissão vetorial extradomiciliar, principalmente na região Amazônica, e pela existência de ciclos de transmissão do parasito em ambientes silvestres próximos às habitações humanas (CONITEC/MS 2018). O novo

cenário epidemiológico emergente no Brasil, onde a transmissão oral passou a ser uma das mais importantes vias de transmissão do parasito, ocorre principalmente na região Amazônica que é considerada uma região não endêmica, na qual acredita-se que *T. cruzi* é um parasito enzoótico de animais silvestres (Aguilar *et al.*, 2007; Coura & Junqueira 2012; Coura 2015). Com a ocorrência de surtos associados ao consumo de açaí no estado do Pará, devido à colonização frequente de açazeiros por triatomíneos infectados, foi proposto o transporte deste alimento através de cestos e rasas, desde a sua área de colheita até as máquinas de extração do suco da fruta, localizadas em áreas distantes, assim como o branqueamento do fruto por choque térmico; buscando assim, evitar a contaminação do homem pela ingestão do suco/polpa de açaí contendo *T. cruzi* (Valente *et al.*, 2000; Xavier *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2018).

A epidemiologia da DC está em constante transformação e no que se refere às áreas endêmicas, a transmissão vetorial de *T. cruzi* constitui-se na via mais importante, sendo propiciada por espécies de vetores que infestam domicílios. Cerca de dez espécies e três gêneros (*Triatoma* Laporte 1832, *Panstrongylus* Berg 1879 e *Rhodnius* Stal 1859) são importantes epidemiologicamente devido aos seus aspectos comportamentais (Rey 2011; Juberg *et al.*, 2014). Dentre estas espécies destacam-se: *T. infestans* (Klug, 1834), *T. brasiliensis* (Neiva, 1911), *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, *P. megistus* (Burmeister, 1835) e *R. robustus* Larrousse, 1927 (Galvão *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2006; Costa & Felix 2007; Jurberg *et al.*, 2009; Coura & Dias 2009; Noireau *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2013). Esses vetores por serem capazes de colonizar ecótopos silvestres, peridomiciliares e domiciliares, além de apresentarem outras características biológicas que favorecem a transmissão de *T. cruzi*, são considerados de grande relevância epidemiológica, como é o caso de *T. brasiliensis* (Costa *et al.*, 1998, 2003; Silveira & Vinhaes 1999; Borges *et al.*, 2005; Sarquis *et al.*, 2010).

Os métodos para a prevenção do aumento da incidência da DC são o controle vetorial, o controle de bancos de sangue e a testagem de mulheres grávidas com o intuito de se prevenir a transmissão congênita. Porém, os desafios ampliam-se diante de estimativas nas quais mais de 80% das pessoas acometidas pela DC no mundo não possuem acesso a diagnóstico ou tratamento, o que sustenta o elevado impacto de morbimortalidade e a associação com o custo social (WHO 2021). O

controle de vetores é baseado principalmente na pulverização interna das moradias com inseticidas residuais, a fim de eliminar ou pelo menos reduzir, as populações de triatomíneos domésticos dentro das habitações, reduzindo assim a incidência de novos casos humanos. Apesar de algumas conquistas importantes no controle das principais espécies de vetores, até mesmo eliminando a transmissão por *T. infestans* e *R. prolixus* em alguns países/regiões, como resposta à Iniciativa do Cone Sul (Schofield & Dias 1999; Cedillos *et al.*, 2012), a presença continuada de várias outras espécies capazes de esporadicamente invadir casas e manterem um grau reduzido de transmissão, implica em um risco contínuo para a transmissão de *T. cruzi* ao homem e um desafio para o controle vetorial efetivo (Waleckx *et al.*, 2015).

Com o acordo do Cone Sul estabelecido entre Argentina, Bolívia, Brasil (este, com a aderência ao consórcio em 1991), Chile, Paraguai, Uruguai e, mais tarde, Peru, as populações de *T. infestans* (até então a principal espécie transmissora do *T. cruzi*), foram eliminadas ou reduzidas, resultando em uma diminuição da transmissão vetorial nesses países (Silveira & Vinhaes 1999; Dias *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012). Porém, juntamente com as constantes atividades antrópicas nos ambientes silvestres, várias outras espécies de triatomíneos passaram a ocupar os nichos deixados vagos por *T. infestans*, possibilitando assim, a formação de novos ciclos de transmissão da DC no peri- e intradomicílio por espécies autóctones com alto potencial de colonização, bem como pelos focos residuais de *T. infestans* (Silveira & Vinhaes 1999; Costa *et al.*, 2003; Silveira & Dias 2011; Vinhaes *et al.*, 2014).

Desse modo, as estratégias para o controle da DC necessitam incluir ações integradas para a prevenção da transmissão vetorial, transfusão de sangue (com uma melhor cobertura na triagem de doadores de sangue), vertical ou congênita (atualmente corresponde à principal via de transmissão na Argentina e em países não-endêmicos) (Buekens *et al.*, 2018), e a transmissão oral. As ações de vigilância devem incluir o monitoramento de novos casos da doença, diagnóstico e tratamento apropriado para os casos crônicos e agudos. A educação comunitária é fundamental para que tais estratégias possam ser implementadas de maneira compreensiva, bem como para que se possa alcançar o melhor resultado possível (Coura 2015).

Com isso, as atividades de vigilância e controle da DC no Brasil estão estruturadas em três eixos prioritários e englobam, principalmente, ações integradas para (i) casos humanos, objetivando o diagnóstico precoce, com vistas ao

tratamento oportuno, bem como à aplicação de medidas de prevenção, o conhecimento das formas de transmissão, o monitoramento da infecção por *T. cruzi* e a identificação do perfil de morbimortalidade na população acometida; (ii) vetores, visando manter eliminada a transmissão vetorial por *T. infestans* e sob monitoramento/controle, as outras espécies importantes epidemiologicamente para a transmissão do *T. cruzi* ao homem, e (iii) o ambiente, visando incorporar ações de vigilância sanitária, ambiental, de forma integrada com as ações de vigilância epidemiológica (SVS/MS 2019).

1.2 Diversidade genética de *T. cruzi*

Para a compreensão da complexa epidemiologia e do amplo espectro de desfechos clínicos da DC, é necessário um maior conhecimento sobre a diversidade genética do parasito. O conjunto de variabilidade genética identificado no genoma de *T. cruzi*, associado às diferenças no comportamento biológico de cepas e clones, têm servido de base para estudos que visam a identificação e caracterização molecular dos grupos populacionais deste parasito (Brisse *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2009; De Winne *et al.*, 2014). Alguns clones naturais de *T. cruzi* estão amplamente dispersos e são frequentemente encontrados em amostras clínicas, o que sugere uma importante associação à epidemiologia e à patogenia da DC (Tibayrenc 1998a).

Os primeiros estudos sobre a diversidade genética das subpopulações de *T. cruzi* foram realizados por Miles e cols (1977), quando analisaram o polimorfismo isoenzimático de isolados obtidos de casos humanos e de mamíferos e vetores silvestres e domésticos. Desta forma, conseguiu-se identificar três zimodemas que foram correlacionados com os ciclos de transmissão do parasito no Brasil: zimodema 1 (Z1) e o zimodema 3 (Z3) associados ao ciclo de transmissão silvestre, enquanto que zimodema (Z2) ao ciclo de transmissão domiciliar (Miles *et al.*, 1977; Barrett *et al.*, 1980). Em paralelo, com o uso de marcadores no genoma mitocondrial do *T. cruzi*, foi possível classificar as diferentes cepas e isolados em esquizodemas, os quais se diferenciam com base nos perfis de restrição do cinetoplasto (kDNA) (Morel *et al.*, 1980; Ávila *et al.*, 1990).

Em 1999, a comunidade científica reuniu os isolados de *T. cruzi* em dois genótipos distintos e independentes filogeneticamente (DTUs - *Discrete Typing Units*), os quais apresentavam características biológicas, bioquímicas e moleculares distintas, e estes passaram a ser denominados por *T. cruzi* I (DTU I) e *T. cruzi* II

(DTU II) (Anonymous 1999), presentes no ciclo silvestre e no ciclo doméstico de transmissão do parasito, respectivamente (Briones *et al.*, 1999). Com o avanço das técnicas de genotipagem em multilocus, foi possível caracterizar a diversidade do *T. cruzi* em dois grandes grupos, DTUs I e II, sendo este último classificado em cinco sub-grupos, denominados DTUs IIa, IIb, IIc, IId, IIe (Barnabé *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2000a, 2001; Tibayrenc 2003). Posteriormente, Freitas e colaboradores (2006) propuseram a existência de uma terceira linhagem principal em *T. cruzi*, designada de *T. cruzi* III ou Z III. Porém, após a Segunda Reunião Satélite, um sistema de unificação da nomenclatura do agente causador da DC foi estabelecido, e nesse consenso as cepas de *T. cruzi* foram agrupadas em seis DTUs denominados de *T. cruzi* I a VI (Zingales *et al.*, 2009) (**Tabela 1.1**).

Tabela 1.1: Nomenclatura atual proposta para o taxon *Trypanosoma cruzi*.

Designação da DTU	Abreviação	Equivalente aos esquemas de grupos de <i>T. cruzi</i> anteriores
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> I ^{a, b} e DTU I ^c
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II ^a e DTU IIb ^c
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT ^d , Z3-A ^e , DTU IIc ^c e <i>T. cruzi</i> III ^f
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3 ^d , Z3-B ^e e DTU IIa ^c
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Z2 boliviano ^d , rDNA 1/2 ^g , clone 39 ^h e DTU IId ^c
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Z2 paraguaio ⁱ , Zimodema B ^j e DTU IIe ^c

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

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

Além da subdivisão em DTUs, a estrutura populacional de *T. cruzi* foi investigada a partir de genealogias de sequências mitocondriais e, com isso, três clados foram reconhecidos. Tais clados mantêm uma correlação com as DTUs, sendo: clado A correspondente à TcI; clado B à TcIII, TcIV, TcV e TcVI; e o clado C exclusivamente à TcII (Machado & Ayala 2001, Barnabé *et al.*, 2016). Mais tarde, foi descrito uma sétima DTU identificada em morcegos (Tcbat) (Marcili *et al.*, 2009a).

Trypanosoma cruzi é essencialmente um organismo diploide, que se replica por fissão binária, um processo assexuado que origina clones celulares (El-Sayed *et al.*, 2005). Seu genoma é distribuído em pares de cromossomos homólogos que podem variar em número e tamanho entre as diferentes cepas (Henriksson *et al.*, 1996, 2002; Brisse *et al.*, 2003; Pedroso *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2004; Branche *et al.*, 2006). Por conta dessa característica e das variações observadas no conteúdo do DNA entre as cepas, este parasito apresenta ampla plasticidade genômica e um

potencial envolvimento na geração de diversidade genotípica e fenotípica (Zingales 2017).

Tendo como base as pesquisas realizadas para inferir sobre a evolução de *T. cruzi* e sua estrutura populacional, foi possível a criação do conceito de DTUs e da evolução clonal. Nesta estrutura de modelo, uma "espécie clonal" origina genótipos multilocus descendentes virtualmente idênticos ao genótipo fundador, sem a ocorrência de recombinação gênica. (Tibayrenc & Ayala 2002; Zingales *et al.*, 2012). Mesmo quando há eventuais trocas gênicas, subdivisões estáveis e discretas podem ser identificadas de forma confiável. Assim, Tibayrenc (1998b) propôs pela primeira vez, o termo "discrete typing unit" para descrever conjuntos de *stocks* que são geneticamente mais similares entre si do que em relação à qualquer outro *stock*, podendo ser indentificados por marcadores moleculares ("tags"). As DTUs constituem unidades confiáveis para serem empregadas em análises de epidemiologia molecular e em estudos relacionados com a filogenia de *T. cruzi* e de evolução experimentais. O compartilhamento de características entre cepas/isolados de uma mesma DTU deve ser considerado como uma família de clones intimamente relacionadas, e não como sendo representativo de um clone único (Zingales *et al.*, 2012).

Existem dois modelos para a origem das populações de *T. cruzi*. Ambos se baseiam em dois eventos de hibridização, porém apresentam sugestões de ancestrais diferentes: "Duas Hibridizações" proposto por Westenberger e colaboradores (2005) e o modelo "Três Ancestrais" por Freitas e colaboradores (2006) (**Figura 1.2**). O modelo Duas Hibridizações (**Figura 1.2A**) envolve um evento de hibridização entre os ancestrais TcI e TcII, resultando nas progênies homozigóticas TcIII e TcIV. O segundo evento de hibridização, mais recente, ocorre entre os grupos TcII e TcIII originando os grupos heterozigóticos TcV e TcVI (Westenberger *et al.*, 2005). Por outro lado, Freitas e colaboradores (2006) descreveram o modelo de três ancestrais (TcI, TcII e TcIII) (**Figura 1.2B**), no qual ocorrem duas hibridizações recentes entre os isolados TcII e TcIII originando os grupos TcV e TcVI (heterozigóticos) (Machado & Ayala, 2001, 2002; Freitas *et al.*, 2006; Rozas *et al.*, 2007). As análises de marcadores para regiões gênicas que codificam a subunidade II da citocromo oxidase e a subunidade I da NADH desidrogenase (Machado & Ayala, 2001; Freitas *et al.*, 2006), além de microssatélites (Freitas *et al.*, 2006) e outros marcadores nucleares (Machado &

Ayala, 2002; Rozas *et al.*, 2007), indicaram que não houve a participação de TcI nos eventos de hibridização que resultaram nas progênes heterozigóticas. O modelo de Freitas e colaboradores (2006) não contemplou a origem de TcIV.

Os dois modelos descritos para a origem das populações de *T. cruzi* basearam-se em marcadores moleculares distintos, bem como o uso de diferentes estratégias para genotipar os parasitos, uma vez que, é necessária a utilização de diferentes marcadores para que as similaridades entre os grupos sejam identificadas, principalmente para os híbridos TcV e TcVI, os quais, muitas vezes estão representados em mais de um grupo populacional (Souto *et al.*, 1996; Barnabé *et al.*, 2000; Machado & Ayala 2001; Sturm *et al.*, 2003; Broutin *et al.*, 2006; Rozas *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2011; Yeo *et al.*, 2011). Ainda assim, existem modelos alternativos ou complementares para a origem, evolução e as relações filogenéticas entre as DTUs, os quais levam a novas percepções acerca dos supostos eventos de hibridização (Lewis *et al.*, 2011; Tomasini & Diosque 2015).

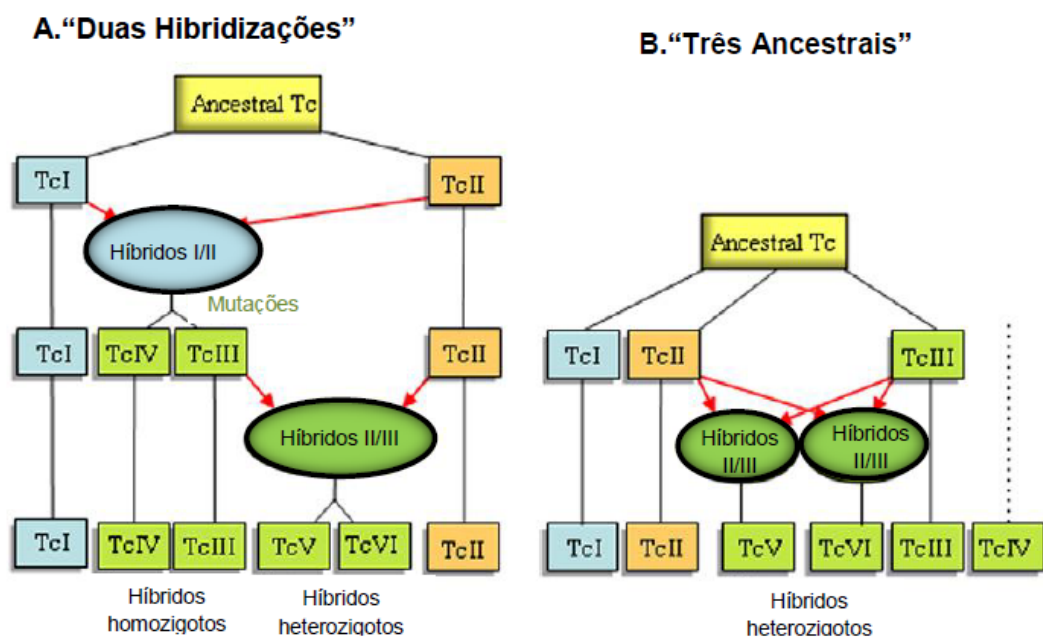


Figura 1.2: Modelos de origem das linhagens de *T. cruzi*. (A) "Duas Hibridizações" e (B) "Três Ancestrais". Comparação entre os modelos considerando a ocorrência de troca genética durante a evolução clonal do parasito. Retângulos indicam diferentes DTUs. Formas ovais indicam a fusão entre duas células com troca genética entre elas, estando a contribuição parental indicada pelas setas em

vermelho. Os clados mitocondriais são demonstrados por cores: Azul=clado A; Verde =clado B; Laranja= clado C.

Fonte: Zingales *et al.*, 2012.

Os modelos descritos concordam que TcV e TcVI são intra-linhagens híbridas de TcII-TcIII. Uma discrepância significativa entre os modelos é a participação dos alelos de TcI na composição genética de TcIII e, conseqüentemente, na dos híbridos TcV e TcVI. Mais tarde, Zingales e colaboradores (2017), utilizando a análise de *Bootscan* (Martin *et al.*, 2005) implementada no *Recombination Detection Program 4* (RDP4), analisaram haplótipos de dois genes nucleares de *T. cruzi* e observaram a formação de duas redes genealógicas que confirmaram os dados obtidos para outros genes, tais como: alto grau de reticulação (Tomazi *et al.*, 2009; Ferreira & Briones 2012; Franco *et al.*, 2015); separação clara dos clados TcI e TcII; clado Tcbat mais próximo de TcI; e a distribuição das cepas correspondentes aos haplótipos TcV e TcVI em três grupos, os quais foram posicionados ou mais próximo de TcI, mais próximo de TcII, ou formando um clado de ponto médio entre as duas linhagens. A DTU TcIII foi agrupada em um clado de ponto médio. Em conclusão, a análise *Bootstrap* favoreceu a participação de TcI na formação das DTUs híbridas TcV e TcIII. Estudos análogos realizados com TcVI (CL Brener) confirmam esses achados (Tomazi *et al.*, 2009; Ferreira & Briones 2012; Franco *et al.*, 2015). Adicionalmente, Lewis e cols. (2011) observaram que cepas representativas de TcII e TcIV continham inúmeros polimorfismos de base única (SNPs) nas sequências de Glico-Fosfatidil-Inusitol (GPI), os quais somente tinham sido observados em TcI ou TcII. Estes resultados são compatíveis com o evento de hibridização entre TcI e TcII, como sugerido (Westenberger *et al.*, 2005; Sturm & Campbell, 2010).

Entre as DTUs, TcI é uma linhagem que apresenta a maior heterogeneidade genética, possivelmente resultante de suas características epidemiológicas. Na verdade, TcI é encontrada amplamente distribuída nas Américas. Esta DTU é onipresente no ciclo silvestre, infectando cerca de 50 gêneros de mamíferos na natureza, bem como, pode ser encontrada nas espécies de triatomíneos de importância epidemiológica. A infecção humana por TcI é prevalente na América do Norte (México e Estados Unidos), além de países da América Central e do noroeste

da América do Sul (Colômbia e Venezuela) (Bosseno *et al.*, 2002; Montilla *et al.*, 2002; Añez *et al.*, 2004; Higo *et al.*, 2004; Sánchez-Guillén *et al.*, 2006).

Alvos moleculares variados reconhecem uma diversidade genética extensiva dentro de TcI. Baseados em sítios polimórficos nas sequências da região intergênica do miniexon, cinco genótipos de TcI (TcIa, TcIb, TcIc, TcId, TcIe) foram descritos (Cura *et al.*, 2010; Falla *et al.*, 2009). Um subgrupo homogêneo de TcI nomeado de TcIDOM (antigo TcIa) foi associado com infecções humanas desde a Venezuela até o norte da Argentina (Llewellyn *et al.*, 2009; Messenger *et al.*, 2012). Na Bolívia, foi identificada a ocorrência de três ciclos silvestres de transmissão de TcI, distintos entre si (Messenger *et al.*, 2015a).

Apesar de TcII ser tão antiga quanto TcI, a sua distribuição geográfica é menos abrangente. A DTU TcII predomina nas regiões sul e central da América do Sul, havendo registros raros na América do Norte. A linhagem TcII vem sendo isolada, em grande parte, de ciclos de transmissão domésticos. Em humanos, TcII é encontrada abundantemente em indivíduos das regiões leste e central do Brasil (Zingales *et al.*, 1998; Carranza *et al.*, 2009; Nielebock *et al.*, 2020), sendo raramente identificada na maioria dos outros países da América do Sul; exceto no Chile, onde os genótipos TcI e TcII também são encontrados com frequência infectando humanos, e no Paraguai, com predominância de isolados TcII e TcV obtidos de humanos (Brenière *et al.*, 2016; Messenger *et al.*, 2015b, Zingales 2017). No ambiente silvestre, alguns estudos descreveram a associação de TcII com primatas, em fragmentos de Mata Atlântica (Zingales *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 1999; Lisboa *et al.*, 2007; Kerr *et al.*, 2016).

A DTU TcIII está associada, principalmente, com o ciclo silvestre, desde o nordeste da Venezuela até a Argentina, tendo como principal reservatório os gambás. Poucas infecções por TcIII em humanos foram descritas na Colômbia (Hernández *et al.*, 2016; Ramírez *et al.*, 2010) e em casos agudos na Amazônia brasileira (Monteiro *et al.*, 2010).

Sobre a TcVI, esta é predominantemente associada, também, com o ciclo silvestre, sendo encontrada nas Américas do Norte e do Sul. Na América do Norte, o principal reservatório é o guaxinim, enquanto que na América do Sul, são os primatas e quatis (Marcili *et al.*, 2009b; Roellig *et al.*, 2013). Trabalhos publicados com diversos marcadores genéticos indicam que as cepas de TcIV oriundas das Américas do Norte e do Sul são geneticamente distintas e agrupam separadamente

nas análises filogenéticas (Brisse *et al.*, 2003; Marcili *et al.*, 2009a; Lewis *et al.*, 2011; Yeo *et al.*, 2011; Roellig *et al.*, 2013; Tomasini & Diosque 2015). A DTU TcIV é o agente secundário de DC na Venezuela (Miles *et al.*, 1981) e tem sido registrada nos surtos orais na Amazônia (Marcili *et al.*, 2009c; Monteiro *et al.*, 2012).

Na América do Sul, TcV e TcVI estão evidentemente associadas com a DC humana em países ao sul do continente. Na Argentina, as linhagens TcV e TcVI prevalecem, e alguns casos de infecção em humanos por TcV e/ou TcVI foram reportados mais ao norte do Equador (Garzón *et al.*, 2002) e na Colômbia (Guhl & Ramírez 2013; Messenger *et al.*, 2016). Como observado anteriormente, vários estudos apontam que estas duas DTUs apresentam uma diversidade intra-linhagem mínima e que são produtos de eventos de hibridização distintos. Duas grandes pesquisas conduzidas na Argentina (Cura *et al.*, 2012) e na Bolívia (del Puerto *et al.*, 2010), mostraram que a infecção crônica em humanos está associada aos genótipos TcII, TcV ou TcVI, independentemente da manifestação clínica (cardiomiopatia chagásica crônica [CCC] ou DC digestiva).

Outra DTU identificada é a Tcbat. Este nome foi originalmente dado para um grupo particular de parasitos isolados de morcegos das regiões sudeste e central do Brasil (Marcili *et al.*, 2009a). Tcbat se distingue das outras seis DTUs por uma série de marcadores (Marcili *et al.*, 2009a; Hamilton *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2012). Análises filogeográficas e filogenéticas comprovam que Tcbat é uma DTU independente e mostram que a diversidade genética dentro de Tcbat é estruturada espacialmente (Lima *et al.*, 2015). Diferentemente das outras DTUs, Tcbat não consegue se desenvolver nas espécies de triatomíneos criadas em colônias e acredita-se que os cimicídeos sejam os vetores potenciais desta linhagem (Cavazzana *et al.*, 2010). A DTU Tcbat vem sendo registrada em países como Panamá (Pinto *et al.*, 2012) e Colômbia (Ramírez *et al.*, 2014a), além do Brasil (Marcili *et al.*, 2009a). Ramírez e colaboradores (2014b) encontraram DNA de Tcbat em uma criança de 5 anos na Colômbia; em paralelo, outro estudo demonstrou a presença de DNA de Tcbat em múmias do Chile (Guhl *et al.*, 2014).

Existem poucos estudos relacionados à caracterização dos genótipos de *T. cruzi* em surtos orais, e, como esperado, as populações do parasito envolvidas na via de transmissão oral devem refletir as linhagens que são prevalentes naquela região estudada. Por outro lado, a informação obtida a partir destes estudos tem aumentado nosso conhecimento acerca dos aspectos epidemiológicos da DC. Como

exemplo, nos surtos por via oral na região amazônica brasileira, isolados oriundos de humanos foram genotipados como TcI e TcIV, que correspondem às DTUs prevalentes em primatas selvagens e em *Rhodnius* spp. capturados na região (Marcili *et al.*, 2009c; Monteiro *et al.*, 2012). Em contrapartida, em um caso fatal de DC aguda transmitida via oral no Espírito Santo (região sudeste do Brasil), observou-se infecção mista pelas quatro DTUs (TcI, TcII, TcIII e TcIV), além de ter sido detectado o tripanosomatídeo de morcego *Trypanosoma dionisii* em um fragmento cardíaco (Dario *et al.*, 2016).

Atualmente existem metodologias de genotipagem de *T. cruzi* com sensibilidades suficientes para distinguir o parasito entre as seis DTUs e TcBat, a partir de amostras de sangue de pacientes crônicos e, com isso, buscar correlacionar as DTUs com o desfecho clínico da doença (Marcili *et al.*, 2009a; Burgos *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2010; Hamilton *et al.*, 2011). A caracterização molecular do parasito realizada diretamente de amostras clínicas possibilita a identificação de infecções mistas, evitando assim, uma possível seleção de cepas que pode ocorrer durante o cultivo *in vitro* para o isolamento do parasito (Moreira & Ramirez 2019). De um modo geral, para confirmar a linhagem de *T. cruzi*, se faz necessária a utilização de vários marcadores moleculares, uma vez que cepas híbridas podem apresentar polimorfismos idênticos ao de cepas relacionadas com as DTUs ancestrais/parentais, fazendo com que outros alvos devam ser identificados para o estabelecimento de um algoritmo fidedigno para a tipagem molecular do parasito.

Assim, um sistema de ensaio de Reação em cadeia da polimerase (PCR) baseado na amplificação de regiões específicas dos genes de mini-exon que codificam o *Spliced Leader* (SL) (Souto *et al.*, 1996), da subunidade ribossomal 24S α de rDNA - domínio D7 (Souto & Zingales 1993) e da subunidade 18S rDNA (Clark & Pung 1994), foi proposto (Brisse *et al.*, 2001), no qual, os tamanhos dos fragmentos polimórficos dos produtos amplificados para esses alvos foram adequados para a atribuição de *T. cruzi* dentro de cada DTU. Entretanto, atribuições baseadas pela ausência do que pela presença destes produtos de PCR, são problemáticas; para isso, um conjunto alternativo de critérios torna-se mais favorável para a obtenção de um método padrão ouro de tipagem (Zingales *et al.*, 2012).

Outras estratégias que utilizam combinações de genes, como os loci que codificam a proteína *Heat shock* 60 (HSP60), isomerase glicose-6-fosfato (GPI) e

Citocromo oxidase II (COII), têm sido utilizadas para caracterizar as seis DTUs de *T. cruzi* (D'Ávila *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2009).

As relações evolutivas entre as DTUS são entendidas parcialmente, e dependendo do número e da natureza dos genes analisados, o cenário pode mudar. A técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) é considerada padrão ouro para os estudos populacionais de *T. cruzi*, sendo capaz de descrever as relações inter-DTUs e a diversidade intra-DTUs, bem como a presença de eventos de recombinação genética (Yeo *et al.*, 2011). A técnica de MLST é usada em estudos sobre estruturas populacionais e diversidade de patógenos (Yeo *et al.*, 2011; Matsumura 2013; Jelocnik *et al.*, 2019).

Similar ao MLST, Llewellyn e colaboradores (2009) implementaram uma metodologia baseada no *Multilocus Microsatellite Typing* (MLMT), a partir de um painel de 48 marcadores de microssatélites polimórficos (repetições em tandem de 2 a 6 nucleotídeos) dispersos no genoma nuclear do parasito. Esta técnica é uma alternativa rápida e prática, mas requer a inclusão de sequenciamento de DNA que, assim como o MLST, gera um aumento de custos.

Outra abordagem para genotipar DTUs é a análise complexa por *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) de polimorfismos genéticos presentes em 12 *loci* (Rozas *et al.* 2007) ou em apenas três *loci* (24S α rDNA, HSP60 e GPI) (Lewis *et al.*, 2009), sendo que essas combinações permitem identificar as cepas/isolados TcI, TcII, TcIII e TcIV, porém não são capazes de separar os grupos TcV de TcVI (Lewis *et al.*, 2009; Cosentino & Agüero 2012). A maior limitação desta técnica é a complexidade da análise.

Vago e colaboradores (2000) desenvolveram o ensaio de *Low-Stringency Single-Specific Primer* (LSSP-PCR) que permite obter a caracterização genética de *T. cruzi* diretamente de tecidos infectados com o parasito. Esta técnica foi baseada na amplificação por PCR das regiões variáveis do kDNA de *T. cruzi*, denominada LSSP-PCR, que fornece uma “assinatura de kDNA” específica e altamente reprodutível.

A utilização da nested PCR também é utilizada para a tipagem de *T. cruzi* e pode ser aplicada em amostras biológicas (Marcet *et al.*, 2006; Cardinal *et al.*, 2008) e clínicas (Burgos *et al.*, 2007, 2010; Moreira & Ramirez 2019); por outro lado é uma técnica complexa que necessita de três etapas ou mais para confirmar a DTU.

Ensaio multiplex de PCR em Tempo-Real utilizando sondas TaqMan vêm sendo aperfeiçoados (Duffy *et al.*, 2009).

Outro método que vem sendo desenvolvido é baseado em fragmentos de DNA *barcode* marcados com fluorescência para a detecção de produtos de PCR relacionados aos quatro domínios de rDNA (Hamilton *et al.*, 2011). Esta técnica foi capaz de diferenciar várias espécies de tripanosomatídeos oriundos de mamíferos da América do Sul. Algumas DTUs de *T. cruzi* (incluindo Tcbat) puderam ser facilmente identificadas, contudo TcV e TcVI não foram distinguidas de TcIII e TcII, respectivamente.

Como descrito nos parágrafos anteriores, métodos diretos de genotipagem para identificar as DTUs estão disponíveis para uso difundido nas áreas endêmicas, e pesquisas estão em progresso visando otimizar a sensibilidade e tornar mais simples o manuseio das técnicas, para que estas possam ser cada vez mais facilmente aplicadas diretamente em amostras clínicas e biológicas.

1.3 Fases e formas clínicas da doença de Chagas

A DC é caracterizada pelo amplo espectro de desfechos clínicos, variando em severidade desde infecções assintomáticas, até as formas graves relacionadas aos danos cardíacos, assim como do trato digestivo (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda 2003, Dias 2006, Coura 2007). A doença é também conhecida como tripanossomíase americana e apresenta duas fases: a aguda e a crônica, sendo esta classificada em indeterminada (ou assintomática) e determinada (podendo se apresentar na forma cardíaca, digestiva ou mista) (Dias *et al.*, 1956, WHO 2021).

A fase aguda da DC, de curta duração é caracterizada por alta parasitemia e elevadas concentrações de IgM anti-*T. cruzi*, reveladas por exames sorológicos e é geralmente oligossintomática. Em alguns casos, após o período de incubação de 1-2 semanas (na transmissão oral este período varia de 3 a 22 dias) (Brasil 2009), o paciente pode desenvolver febre, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, inflamação no local da inoculação, e ocasionalmente, edema palpebral classicamente conhecido como sinal de Romaña (Rassi *et al.*, 2000, Coura & Borges-Pereira 2010). A fase aguda pode persistir no intervalo de 4-12 semanas após a infecção inicial e pode ser facilmente confundida com viroses ou outras infecções inespecíficas. Cerca de 1-5% dos indivíduos na fase aguda desenvolvem a miocardite aguda difusa, com edema intertissial, hipertrofia das fibras miocárdias e dilatação das cavidades cardíacas e

encefalite. Este agravamento da doença tende a ocorrer mais frequentemente quando o indivíduo se infecta através da via oral (Coura & Viñas 2010; Shikanai-Yasuda & Carvalho 2012; Dias *et al.*, 2016; Barreto de Albuquerque *et al.*, 2018).

A maioria dos pacientes segue gradativamente para a fase crônica, caracterizada por uma parasitemia subpatente associada a um longo período de latência que é inicialmente assintomático (forma indeterminada), no qual cerca de 70% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* permanecem sem evidências de danos cardíaco, esofágico e/ou cólon por toda a vida, constatados por exames eletrocardiográficos e/ou radiológicos normais. Em cerca de 10-30 anos da fase crônica, 20-30% dos pacientes evoluem para a forma cardíaca caracterizada por um intenso processo inflamatório, gerado pelo desbalanço da resposta imune e a persistência do parasito (Marin-Neto *et al.*, 2007); e cerca de 10% estão em risco de desenvolver manifestações clínicas severas, tais como anormalidades do miocárdio, neurológicas e gastrointestinais, estando associadas à morbimortalidade e diminuição na qualidade de vida (Acquatella 2007; Coura & Borges-Pereira 2011; Rassi *et al.*, 2012).

Uma vez estabelecida a CCC, o prognóstico é sombrio, uma vez que é um processo progressivo. Rassi e cols. 2006 desenvolveram um “score para classificação de risco” que auxilia na identificação de pacientes com alto risco de progressão da CCC. Esta classificação é baseada na capacidade funcional, gênero, aumento do volume cardíaco, anormalidades no movimento da parede, baixa voltagem no eletrocardiograma (ECG) e a presença de taquicardia ventricular não sustentada. Vale ressaltar que a forma cardíaca concentra as mortes atribuídas a esta doença, seja por insuficiência cardíaca (IC), morte súbita ou evento embólico, com grande impacto social e médico-trabalhista (Rassi *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2013; Martins-Melo *et al.*, 2014b).

Segundo dados da literatura e ao Consenso Brasileiro para Doença de Chagas de 2015 (Dias *et al.*, 2016; Healy *et al.*, 2015), a forma crônica cardíaca é classificada em quatro estágios: Estágio A: ECG com alterações típicas da doença e função sistólica global e segmentar do ventrículo esquerdo (VE), ao ecocardiograma (ECO), normais. Estágio B: ausência de clínica de IC, com ECG alterado e função sistólica global e/ou segmentar do VE alteradas no ECO. Este grupo é subdividido em: B1 e B2, de acordo com a fração de ejeção (FE) do ventrículo esquerdo, sendo que em B1, a FE > 45% e em B2, a FE < 45%. Estágio C: clínica compatível com IC

presente ou no passado, com ECG e ECO alterados. Estágio D: alterações de ECG, ECO e IC refratária ao tratamento clínico (**Figura 1.3**) (Dias *et al.*, 2016). Este foi o sistema de classificação utilizado no presente estudo. Esta estratificação torna mais simples o acompanhamento do paciente e torna mais operacional o manejo do tratamento clínico (CONITEC/MS- PCDT 2018).

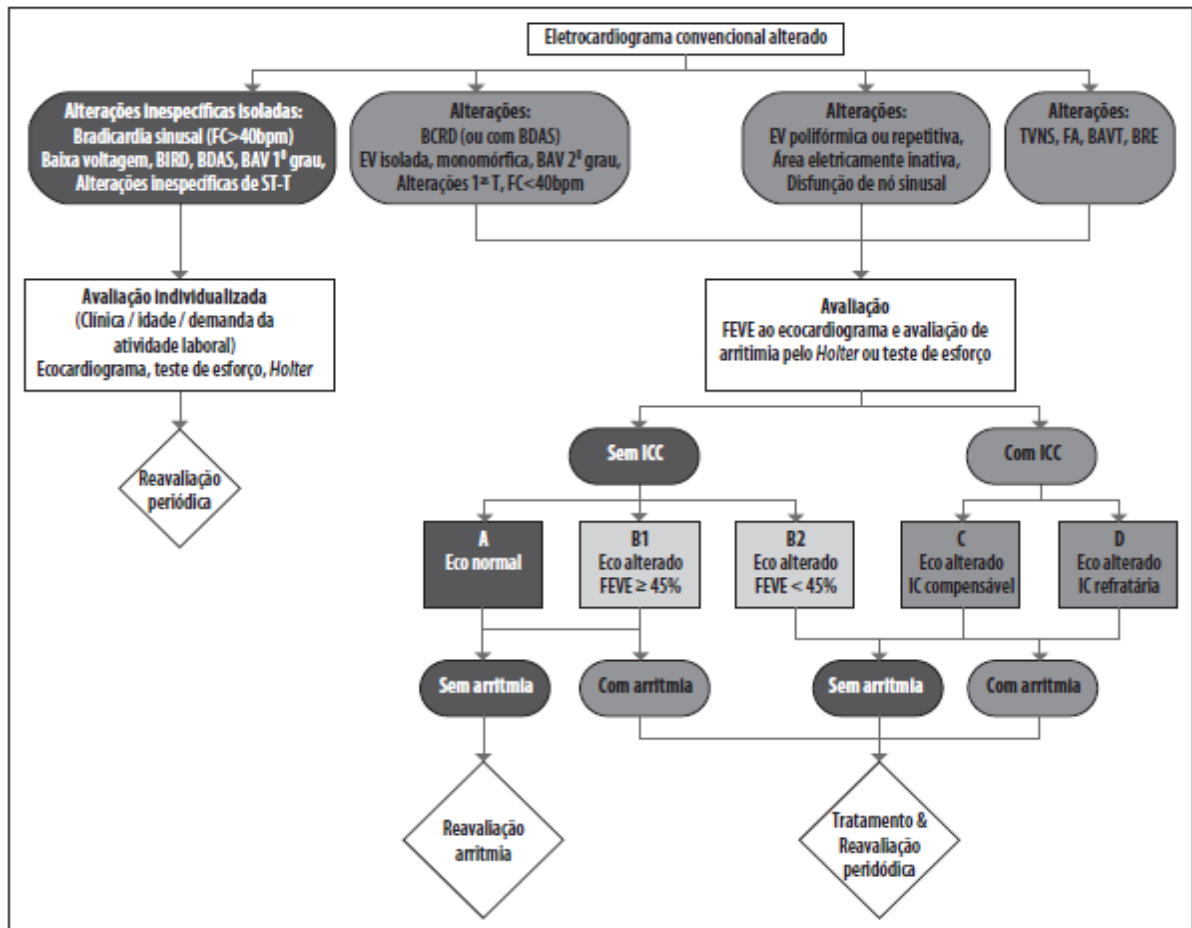


Figura 1.3: Algoritmo para avaliação do indivíduo com doença de Chagas a partir do eletrocardiograma (ECG) convencional. BIRD = bloqueio incompleto de ramo direito; BDAS = Bloqueio divisional anterossuperior; BAV = bloqueio atrioventricular; ST-T = segmento ST-T; BCRD = bloqueio completo do ramo direito; EV = extrassístole ventricular; T = onda T; FC = frequência cardíaca; TVNS = taquicardia ventricular não sustentada; FA = fibrilação atrial; BAVT = bloqueio atrioventricular total; BRE = bloqueio de ramo esquerdo; FEVE = fração de ejeção de ventrículo esquerdo; ICC = insuficiência cardíaca congestiva; ECO = ecocardiograma; IC = insuficiência cardíaca.

Fonte: Dias *et al.*, 2016.

1.4 Diagnóstico da doença de Chagas

1.4.1. Diagnóstico parasitológico e sorológico

O diagnóstico da DC depende da fase na qual o paciente se encontra. Na fase aguda, onde a parasitemia é alta, o método parasitológico direto que consiste na busca por parasitos presentes no sangue periférico, através da microscopia, é recomendado para a detecção de tripomastigotas, através do exame de sangue a fresco, esfregaço e gota espessa (Kirchoff & Rassi 2013). A sensibilidade pode ser ainda aumentada com o uso de técnicas de concentração, tais como os métodos de microhematócrito ou Strout (dupla centrifugação) (Strout 1962), normalmente usados para as infecções congênitas, assim como nos casos de reativação causada por imunossupressão durante a fase crônica.

Na fase crônica da DC, caracterizada por uma parasitemia subpatente e a liberação intermitente das formas tripomastigotas na corrente sanguínea (Ordóñez *et al.*, 2020), como resultado da intensa produção de anticorpos contra o parasito, os métodos parasitológicos indiretos baseados na proliferação de parasitos em insetos vetores, como o xenodiagnóstico, ou em sistemas de cultura *in vitro* (hemocultivo), vinham sendo usados com frequência (Santos *et al.*, 1995; Castro *et al.*, 2006). Não obstante, hoje em dia, o xenodiagnóstico é raramente empregado, pois a sua realização só pode ocorrer em centros de referência onde os triatomíneos são alimentados, e a técnica de hemocultivo tem sido empregada para o isolamento de parasitos, com outras finalidades (Bern *et al.*, 2011). A inoculação de camundongos com sangue de pacientes ou com as fezes de triatomíneos após o xenodiagnóstico é uma outra alternativa, raramente usada (Oliveira *et al.*, 1993). Os métodos parasitológicos indiretos geram sensibilidades baixas e variáveis, em torno de 20% quando aplicados no diagnóstico de fase crônica, além de serem altamente dependentes da habilidade e experiência do operador. Se o teste for repetido, a probabilidade de detecção aumenta até 60% de sensibilidade, mas quando se trata de pacientes com parasitemias muito baixas, mesmo as análises sucessivas trarão resultados negativos (Cerisola *et al.*, 1971).

Assim, o diagnóstico durante a fase crônica é essencialmente realizado por testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. As técnicas sorológicas convencionais, como, imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (IHA) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizam o parasito inteiro ou

lisados de antígenos parasitários (Kirchoff & Rassi 2013). Em razão da (i) especificidade subótima dos testes sorológicos convencionais, (ii) inexistência, nos dias atuais, de um teste disponível que apresente 100% de sensibilidade, além da (iii) ausência de um padrão de referência; a recomendação atual da WHO/OPAS é o emprego simultâneo de pelo menos dois testes sorológicos que utilizem princípios técnicos distintos, para a definição do diagnóstico durante a fase crônica da DC (OPAS 2020). No caso da discrepância de resultados entre os dois testes, um terceiro deve ser realizado para confirmar ou descartar a infecção. Discrepâncias são frequentemente reportadas devido à reação cruzada com outros tripanosomatídeos, incluindo *Leishmania* spp (OPAS 2020).

Testes sorológicos não-convencionais, baseados em princípios diferentes, também têm sido empregados para o diagnóstico da DC crônica. Estes testes fazem uso de antígenos purificados e/ou recombinantes (Umezawa *et al.*, 2003), peptídeos sintéticos (Mucci *et al.*, 2017), e matrizes antigênicas que têm como base, proteínas quiméricas, compostas por fragmentos repetitivos e conservados de aminoácidos imunodominantes de várias proteínas de *T. cruzi* (Del-Rei *et al.*, 2019). Os ensaios imunológicos recombinantes são comercializados e podem usar formatos de detecção com sensibilidades elevadas, sendo o mais empregado, a detecção por quimioluminescência (Abras *et al.*, 2016). Apesar da maior sensibilidade, concomitante ao ganho de especificidade da sorologia não-convencional, a ampla heterogeneidade de antígenos observada entre as distintas linhagens de *T. cruzi*, pode levar à uma diminuição da sensibilidade/especificidade, que é diretamente dependente da escolha dos antígenos a serem empregados (Flores-Chávez *et al.*, 2010; Zingales 2017). Desta forma, a fim de evitar qualquer interferência no desempenho do teste diagnóstico a ser aplicado em distintas regiões nas Américas, estes antígenos devem ser conservados para poderem encobrir a elevada diversidade das linhagens genéticas do parasito. É reconhecido, que a diversidade antigênica de *T. cruzi* é um fator importante que pode levar à uma redução na concordância entre os resultados de diferentes testes comerciais, quando aplicados em cenários epidemiológicos distintos (Majeau *et al.*, 2021).

1.5 Diagnóstico molecular

Ferramentas de diagnóstico acuradas e marcadores de resposta parasitológica ao tratamento são prioridades na pesquisa e desenvolvimento em DC

(Porrás *et al.*, 2015). Desde os anos 90, a PCR vem sendo utilizada como ferramenta molecular por conta da sua elevada sensibilidade e especificidade para a detecção do DNA de *T. cruzi* e com potencial aplicação no monitoramento de quimioterapia tripanocida (Moser *et al.*, 1989; Ávila *et al.*, 1993; Britto *et al.*, 1995). A PCR é um método de detecção rápida e tem se tornado de uso frequente no diagnóstico molecular da DC durante os últimos anos (Britto 2009; Balouz *et al.*, 2017).

Devido à sua maior sensibilidade e rapidez na geração de resultados, comparada aos métodos parasitológicos clássicos (Gomes *et al.*, 1999), ensaios baseados na PCR têm demonstrado serem úteis para o diagnóstico precoce de transmissão congênita em recém nascidos (Schijman *et al.*, 2003; Bua *et al.*, 2013; Cura *et al.*, 2017), no diagnóstico de infecção via oral (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; de Noya *et al.*, 2015a,b), para a detecção prévia de infecção aguda em receptores de órgãos transplantados de doadores infectados (Diez *et al.*, 2007; Cura *et al.*, 2013), para o monitoramento de reativação em pacientes crônicos imunossuprimidos devido a transplantes de órgãos ou infecção por HIV (Burgos *et al.*, 2010; de Freitas *et al.*, 2011), assim como para a avaliação da resposta ao tratamento, uma vez que a conversão sorológica (negativação) em pacientes crônicos tratados, pode levar décadas para ocorrer (Rassi *et al.*, 2012; Schijman 2018; CDC 2019).

Diferentes combinações de alvos moleculares, conjuntos de iniciadores, métodos de extração de DNA e plataformas de amplificação de DNA vêm sendo relatadas com graus variáveis de sensibilidade, especificidade e acurácia. Com a finalidade de identificar aqueles protocolos de melhor desempenho, o Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR-WHO) apoiou, em 2009, um estudo comparativo internacional para a detecção de DNA de *T. cruzi* em amostras de sangue periférico (Schijman *et al.*, 2011). Neste estudo, foi avaliado o desempenho de 48 protocolos baseados na PCR, a partir de um painel cego contendo DNAs de diferentes cepas do parasito, amostras de sangue soronegativas e sangue periférico de pacientes soropositivos. Após as análises de sensibilidade e especificidade, quatro métodos com as melhores performances foram selecionados para a padronização e validação internacional. Estas análises foram fundamentadas tendo como alvos de amplificação, as sequências altamente repetitivas de DNA satélite (SatDNA) ou de minicírculos do DNA de kDNA, ao passo que outros

métodos que tiveram como alvos sequências nucleares, tais como 18S rDNA, 24S rDNA ou as regiões intergênicas de *spliced-leader*, não alcançaram sensibilidades satisfatórias para aplicação diagnóstica na fase crônica da DC (Schijman *et al.*, 2011).

Durante a fase crônica, a PCR gera resultados positivos em 40 a 70% dos pacientes que foram diagnosticados previamente por sorologia convencional, e essa variação na positividade é dependente do grau de parasitemia, volume da amostra, método de purificação do DNA, região alvo a ser amplificada, as características das populações de estudo e a elevada variabilidade genética observada entre as DTUs do parasito (Schijman *et al.*, 2003; Britto 2009; Ramírez *et al.*, 2009; Brasil *et al.*, 2010; Schijman 2018). Diferentes protocolos baseados na PCR foram usados para avaliar sensibilidade e especificidade em amostras de sangue periférico de pacientes portadores da DC crônica, e em geral, a sensibilidade alcançada foi mais baixa, comparada aos testes sorológicos (revisto por Schijman 2018). Nesse contexto, para os pacientes com DC crônica, os métodos de detecção com base molecular apresentam um valor diagnóstico limitado, já que possuem sensibilidades significativamente mais baixas do que os testes baseados em sorologia (Brasil *et al.*, 2010; Schijman *et al.*, 2011). Ressalta-se aqui que a positividade da PCR confirma a presença do parasito em uma determinada amostra, porém, devida à escassez e intermitência de parasitos circulantes, características da fase crônica da doença, um resultado de PCR negativo não exclui a infecção (Britto 2009).

No caso de resultados inconclusivos dos testes sorológicos, a Diretriz Brasileira para o Diagnóstico da Doença de Chagas crônica determina que seja realizada a metodologia da PCR para a confirmação dos resultados (MS 2005). Um estudo recente realizado na Colômbia para determinar o grau de concordância entre testes sorológicos e a PCR, aplicados em 658 doadores de sangue, demonstrou uma maior sensibilidade do ensaio molecular (1,8%) comparado ao uso simultâneo de dois kits comerciais baseados no ensaio de ELISA (0,3%), os quais demonstraram 100% de especificidade. Todas as amostras soropositivas foram detectadas pela PCR (García *et al.*, 2021).

A PCR tem sido valorizada para aplicação no monitoramento da eficácia de tratamento tripanocida, e um resultado positivo ao final do uso da droga indica falha terapêutica, neste caso (Molina *et al.*, 2014). A PCR quantitativa em tempo-real (qPCR) foi desenvolvida possibilitando a detecção e quantificação do DNA

parasitário a partir de amostras clínicas, através do uso de corantes intercalantes ou sondas marcadas, na presença de curvas padrão com concentrações conhecidas do parasito (Piron *et al.*, 2007; Duffy *et al.*, 2009, 2013; Moreira *et al.*; 2013). Esta metodologia, assim como a PCR convencional, apresenta níveis variáveis de confiabilidade analítica, especificidade e sensibilidade (Piron *et al.*, 2007; Duffy *et al.*, 2009; Qvarnstrom *et al.*, 2012), fazendo com que sua aplicação na rotina clínica requeira estudos prévios de validação analítica e clínica (Burgos *et al.*, 2010, Schijman *et al.* 2011).

Desta forma, após a padronização e validação analítica (Ramírez *et al.*, 2015), protocolos de qPCR baseados nos sistemas SybrGreen ou TaqMan em formato duplex, direcionados para a amplificação de DNA nuclear satélite (SatDNA) ou moléculas de minicírculos do kDNA de *T. cruzi*, incluindo um controle interno de amplificação, têm sido frequentemente usados, particularmente para o monitoramento de tratamento tripanocida (Duffy *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2013). Duffy e colaboradores (2009), aprimoraram o sistema qPCR TaqMan originalmente desenvolvido por Piron e colaboradores (2007), incluindo um controle interno de amplificação, o Controle Interno de Amplificação (IAC) ; um plasmídeo linearizado contendo uma sequência de *Arabidopsis thaliana*, que pode ser usado em formato duplex, simultaneamente ao alvo de detecção de *T. cruzi* (Duffy *et al.*, 2009, 2013). Assim, a qPCR duplex usando sondas de hidrólise (sistema TaqMan) tem a vantagem de possibilitar o uso de um controle interno para checar a qualidade do DNA e/ou inibição da reação de PCR, em um mesmo tubo de reação, o que não pode ser realizado usando SybrGreen ou outros corantes intercalantes de DNA.

Nos ensaios de qPCR duplex padronizados, a sensibilidade analítica para o alvo kDNA foi um pouco mais alta do que a observada para a qPCR-SatDNA, sendo os limites de detecção de 0,234 e 0,698 equivalentes de parasitos (Eq. parasitos)/mL, respectivamente. Nestes ensaios foi observada uma elevada concordância entre os dois protocolos, quando foram usados painéis de proficiência e amostras clínicas obtidas de pacientes, previamente diagnosticados por testes sorológicos (Ramírez *et al.*, 2015). Curiosamente, a qPCR para o satDNA foi menos sensível do que o alvo de kDNA em cepas TcI de *T. cruzi*, o que indica uma dosagem mais baixa das repetições de DNA satélite em seus genomas (Ramírez *et al.*, 2015; Duffy *et al.*, 2009). De acordo com Seiringer e colaboradores (2017), o uso de dois métodos simultâneos, um direcionado para o kDNA e o outro para o satDNA,

deve ser estimulado para gerar um diagnóstico mais acurado (Seiringer e cols., 2017). Essa proposta foi aplicada em um estudo prospectivo de quimioterapia com Benznidazol para monitorar pacientes com DC crônica e um único resultado positivo entre os dois testes já foi considerado como falha terapêutica (Álvarez *et al.*, 2017).

Em áreas onde *Trypanosoma rangeli* pode ser a causa de diagnósticos conflitantes com *T. cruzi*, a utilização de qPCR para a amplificação de kDNA pode levar a resultados falso-positivos, devido ao fato dos iniciadores e sondas anelarem em regiões altamente conservadas das moléculas de minicírculos, que estão presentes em ambos os tripanosomatídeos. Mesmo considerando que o alvo satDNA também detecte DNA de *T. rangeli*, tem sido proposto o uso da qPCR direcionada para as sequências de DNA satélite presentes no genoma nuclear, nas áreas de co-existência de ambas as espécies de parasitos, visto que *T. rangeli* apresenta números reduzidos de cópias dessas sequências, comparado ao *T. cruzi* (Guhl & Vallejo 2003; Schijman 2018).

Em comparação a PCR convencional (qualitativa), o ensaio de qPCR fornece resultados quantitativos em um tempo menor e é mais adequado quando se quer aumentar a escala de produção de resultados, pois não necessita da etapa posterior de eletroforese para a visualização dos produtos amplificados em gel de agarose. No cenário de diagnóstico clínico, o uso de qPCR em substituição à PCR convencional está relacionado à disponibilidade do equipamento, considerando o custo maior dos termocicladores em tempo real comparado aos convencionais (Alonso-Padilla *et al.*, 2017).

Uma metodologia alternativa de amplificação de ácidos nucleicos que vem sendo explorada, a técnica de *Loop-mediated amplification* (LAMP). Neste caso, por conta da amplificação ser isotérmica (sem alternância de temperaturas), não requer o uso de termocicladores, e sim de um termobloco ou banho-maria e também, não necessita de equipamento de imagens para a leitura de resultados; uma vez que o resultado é visual, a olho nu, podendo ser monitorado em tempo-real pela medida de turbidez ou fluorescência com o uso de corantes intercalantes (Notomi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2001; 2013; James & Macdonald 2015). A técnica de LAMP é capaz de amplificar o DNA em 30-60 minutos de incubação à uma temperatura entre 60 a 65°C, utilizando um complexo de diferentes iniciadores, através da síntese de DNA por deslocamento das cadeias com o uso da DNA polimerase Bst (Schijman 2018). Os reagentes para o LAMP são estáveis à temperatura ambiente até 37 °C, evitando

a necessidade de uma cadeia de frio (Njiru *et al.*, 2008). Um kit comercial baseado em LAMP, para a detecção de satDNA de *T. cruzi* em amostras de sangue humano, forneceu elevada sensibilidade em pacientes com DC aguda, congênita e em casos de reativação, porém foi menos sensível na DC crônica, em concordância com a qPCR-SatDNA realizada nas mesmas amostras (Besuschio *et al.*, 2017, 2020). Devido às suas propriedades intrínsecas, a metodologia de LAMP é mais adequada para laboratórios com recursos limitados, comparada por exemplo, aos ensaios baseados na PCR.

Perfis de Produto Alvo (*Target Product Profiles* ou TPPs) para o diagnóstico molecular da DC têm sido propostos e foram direcionados para os casos agudos, congênitos, para a fase crônica e para o monitoramento de resposta ao tratamento tripanocida (Pinazo *et al.*, 2014; Porrás *et al.*, 2015). Estes TPPs levaram em consideração: (i) as necessidades “mínimas” e “ótimas” que foram relacionadas com as características epidemiológicas dos pacientes e os grupos clínicos, (ii) sensibilidade e especificidade do ensaio diagnóstico, (iii) volume da amostra, (iv) os tipos de espécimes clínicos, (v) as condições de conservação, transporte e estocagem, (vi) a infraestrutura necessária, (vii) o grau de habilidade técnica dos operadores, e (viii) a necessidade de reportar resultados qualitativos ou quantitativos e a genotipagem do parasito (Schijman 2018).

A necessidade de se desenvolver testes diagnósticos de ponto de atendimento (*point-of-care*, POC) tem sido destacada nos últimos anos. Estes ensaios deveriam conter insumos estáveis para a coleta de amostras e a habilidade de realização dos testes nas condições climáticas prevalentes. Métodos de extração de DNA mais simples e mais rápidos ainda são necessários para aplicação no diagnóstico molecular no ponto de atendimento. Estudos de campo são essenciais para estabelecer o potencial das estratégias POC para o diagnóstico de infecção aguda pelo *T. cruzi*, incluindo a transmissão congênita (Benatar *et al.*, 2017). Neste sentido, a coleta de gota de sangue em papel-filtro para uso como “spots” de sangue seco, frequentemente empregado na triagem neonatal de doenças genéticas, como discutido por Besuschio *et al.* (2020), seria interessante para dar suporte aos ensaios de diagnóstico molecular de ponto de atendimento na DC. Para aplicações em saúde pública, algumas características de ensaios diagnósticos devem ser levadas em consideração, tais como: baixo custo,

procedimentos simples para fabricação e distribuição, produção sustentável e requerimentos para abastecimento (Schijman 2018).

A detecção molecular de *T. cruzi* também é frequentemente abordada em estudos eco-epidemiológicos (Bern *et al.*, 2011), considerando que para a grande maioria de animais reservatórios, existe uma disponibilidade reduzida de ferramentas sorológicas desenhadas especificamente para identificar anticorpos produzidos contra o parasito. Como resultado, a detecção molecular em reservatórios e insetos vetores torna-se necessária para a melhor compreensão dos ciclos domésticos, peri-domésticos e silvestres do *T. cruzi*, bem como suas naturezas sobrepostas ou não sobrepostas, podendo por fim se traduzir em uma melhor implementação de programas de controle vetorial em áreas endêmicas da DC (Tarleton *et al.*, 2007; Sosa-Estani & Segura 2015).

1.1 Tratamento antiparasitário

O tratamento de pacientes infectados, com drogas tripanocidas, tem sido promovido para reduzir morbidade e mortalidade associadas com a DC (Marin-Neto *et al.*, 2007). Os compostos nitroheterocíclicos Benznidazol (BNZ) (Richle, 1973), um nitroimidazol e Nifurtimox (Nif) (Bock *et al.*, 1969), um nitrofurano, foram desenvolvidos há mais de quatro décadas e demonstraram ser altamente efetivos na fase aguda, na DC congênita e na fase crônica recente da doença (Sales *et al.*, 2017). Os principais benefícios esperados do tratamento são a redução da parasitemia e da reativação da doença, melhora dos sintomas clínicos, aumento da expectativa de vida, redução de complicações clínicas (tanto na fase aguda quanto na crônica) e aumento da qualidade de vida (Bern 2011; Rassi *et al.*, 2010; CONITEC/MS- PCDT 2018). Porém, o tratamento requer longos períodos de administração e é contra-indicado em casos insuficiência renal e/ou hepática, sendo que a eficácia também varia de acordo com: (i) a idade e estado imunológico do paciente, (ii) a cepa do parasito e (iii) a fase da doença, uma vez que na fase crônica tardia, esse medicamento possui baixos índices de cura (8 - 30%) (Coura & De Castro, 2002; Bern, 2011; Jannin & Villa, 2007).

Estudos recentes realizados com adultos na fase crônica da doença, demonstraram menor eficácia do tratamento etiológico e efeitos adversos frequentes. Cerca de 53% dos pacientes tratados com BNZ apresentam algum efeito colateral; enquanto que para o tratamento com Nif esse número pode chegar a 85% (Morillo *et al.*, 2015; 2017; CONITEC/MS 2018). As poucas publicações avaliando o uso do Nif, e também devido a maior ocorrência de eventos adversos, fazem com que seu uso não seja recomendado no Brasil (Dias *et al.*, 2016). Contudo, este fármaco pode ser considerado em casos excepcionais quando demonstrarem maior benefício, como em crianças, adolescentes e adultos jovens com infecção recente e intolerância ao BNZ. Uma das limitações do tratamento com BNZ está associada à presença de reações adversas. Dos pacientes tratados, 53% apresentam reações adversas e aproximadamente 16% abandonam o tratamento devido aos efeitos tóxicos do fármaco, como dermatites alérgicas, anorexia e perda de peso, náusea e vômito (Pérez-Molina & Molina 2018).

No Brasil, a dose preconizada de BNZ é de 5 a 7 mg/kg/dia (comprimidos de 100 mg), dividida em duas ou três tomadas diárias, mantida por 60 dias, sendo este

esquema fruto de estudos realizados ao final da década de 70 (Ferreira 1976). Esta mesma dosagem é a que vem sendo recomendada de maneira sistemática até o presente momento. Porém, dados de estudos pré-clínicos e de farmacocinética populacional, sugerem que a dose de BNZ poderia ser aperfeiçoada, fixando a dose máxima diária em 300 mg e estendendo-se o tempo do tratamento, em dias, de acordo com o peso do indivíduo (Dias *et al.*, 2016). Os resultados preliminares do BENDITA (*Benznidazole New Doses Improved Treatment and Associations*), ensaio randomizado, duplo-cego, de fase II, controlado por placebo e realizado na Bolívia, entre 2016 e 2018, em adultos com DC na fase crônica, apontam que, mesmo com a redução do tempo de tratamento (de 8 para 2 semanas) e da dose administrada (de 300 para 150 mg), o BNZ ainda é capaz de reduzir a carga parasitária, sem apresentar efeitos colaterais e com menores taxas de descontinuação do tratamento (Torrice *et al.*, 2021). O estudo MULTIBENZ (Multibenz 2017) iniciado em 2018 e ainda não concluído, também foi desenhado com o intuito de esclarecer a eficácia e segurança de uma dose sub-ótima de BNZ em adultos na fase crônica da DC de quatro países diferentes: Argentina, Brasil, Colômbia e Espanha (Molina-Morant *et al.*, 2020).

Uma vez que a criança é diagnosticada com a DC, esta deve ser tratada com 10-15 mg/kg/dia de BZN em duas ou três doses por 60 dias, sendo que é um esquema com boa tolerância. Atualmente foi desenvolvida a formulação pediátrica de 12,5 mg em comprimido solúvel, podendo este ser dissolvido em água, suco de laranja ou leite (Dias *et al.*, 2016).

O tratamento também é indicado para bebês, quando diagnosticados positivos para a DC, ainda no seu primeiro ano de vida, podendo chegar a 100% de cura nestes casos (de Andrade *et al.*, 1996; Russomando *et al.*, 1998; Altchek *et al.*, 2014). O tratamento de mulheres em idades férteis tem sido indicado para prevenir a transmissão congênita (Fabbro *et al.*, 2014; Murcia *et al.*, 2017). Porém, o seu uso na fase crônica ainda é questionável, considerando que o fármaco pode reduzir a parasitemia, mas não têm ação comprovada na melhora da função cardíaca (Pecoul *et al.*, 2016; Rassi *et al.*, 2017; Morillo *et al.*, 2015). . Apesar das discretas taxas de cura na fase crônica e todo o debate acerca do tratamento, as recomendações atuais defendem o tratamento para os pacientes crônicos desde que as vantagens do tratamento superem as desvantagens, mediante a avaliação do perfil do paciente (Rassi *et al.*, 2017; CONITEC/MS- PCDT 2018). Este consenso é baseado

principalmente na redução da progressão clínica, a longo prazo, observada em pacientes tratados com BNZ, após um acompanhamento médio de 10 anos (Viotti *et al.*, 2006). Entretanto na fase crônica com manifestação digestiva, a fisiopatologia da doença aponta para uma provável ausência de efeitos do tratamento antiparasitário na evolução natural da doença digestiva (Bern *et al.*, 2007; 2011). O tratamento de indivíduos assintomáticos é recomendado para pacientes abaixo dos 50 anos (Bern *et al.*, 2007, Andrade *et al.*, 2011).

A imunossupressão associada à co-infecção por HIV representa um fator de risco importante para a reativação da DC (Bern 2015), caracterizada pelo aumento da parasitemia, semelhante ao que ocorre na fase aguda, decorrente da incapacidade do sistema imune controlar a infecção (Sartori *et al.*, 2007). Os medicamentos antiparasitários podem exercer efeito no manejo, no controle e na prevenção da reativação, apesar das evidências limitadas. Deve-se considerar o status imunológico do paciente, devido ao risco aumentado para síndrome inflamatória de reconstituição imunológica (CONITEC/MS 2018). Em pacientes transplantados e com reativação da doença, o tratamento é indicado (Dias *et al.*, 2016).

Para as gestantes com quadro clínico agudo grave (miocardite ou meningoencefalite) de DC, o tratamento deve ser realizado independentemente da idade gestacional, devido à alta morbimortalidade materna. Uma vez que o número de casos relatados de tratamento na gestação é pequeno, evidências de malformações nos neonatos são escassas. Entretanto, existe um alto risco de transmissão congênita da doença (entre 22 a 71%), com potencial impacto na saúde dos neonatos afetados, fato que reforça a importância da triagem pré-natal em contextos de maior vulnerabilidade para a DC. Assim, é recomendado o tratamento com BNZ em gestantes com DC aguda, preferencialmente a partir do segundo trimestre de gestação, quando o risco de malformações parece ser menor (CONITEC/MS 2018). Em gestantes portadoras da DC na fase crônica, o tratamento não deve ser realizado, uma vez que o risco de transmissão congênita é baixo (Rassi *et al.*, 2010).

1.7 Resposta imune, citocinas e patogenia da doença de Chagas

Vários estudos vêm abordando uma questão importante sobre quais eventos direcionam a evolução clínica diferencial da DC, porém, como esperado, a resposta

é multifatorial (Fuenmayor *et al.*, 2005; Cunha-Neto *et al.*, 2006; Krettli 2009; Dutra *et al.*, 2014). Visto que a doença é resultante de uma interação complexa entre parasito e hospedeiro, é natural (e necessário) considerar fatores relacionados a ambos para melhor compreender a patogênese da DC, não sendo, portanto, uma tarefa simples. A seguir, são apresentadas as teorias relacionadas ao desenvolvimento da patologia e resposta imune associada com a patologia ou com a proteção de progressão da doença.

Quatro hipóteses foram formuladas buscando explicar o desenvolvimento de lesões severas nos tecidos de um paciente com DC, principalmente as lesões no coração, sistema nervoso periférico e tubo digestivo (revisto por Teixeira *et al.*, 2011). Seriam elas: (i) dano tecidual causado diretamente pelo parasito (persistência do parasito); (ii) resposta inflamatória elevada; (iii) dano microvascular; e (iv) disfunção autonômica. Evidências indicam que o infiltrado inflamatório é o principal efetor do dano cardíaco (Bocchi *et al.*, 2017).

A lise de células infectadas parece ser mais relevante durante a fase aguda, quando os parasitos são abundantes. Em modelo murino experimental durante a infecção crônica, apesar de existir uma correlação direta entre carga parasitária/parasitemia e progressão da cardiomiopatia; em humanos, mesmo com a persistência da parasitemia de baixo-grau no tecido cardíaco, esta associação ainda não foi evidenciada (Marinho *et al.*, 1999; Marin-Neto *et al.*, 2007; Lannes-Vieira *et al.*, 2009; Melo *et al.* 2015; Rodrigues-dos-Santos *et al.* 2018).

Evidencia-se as hipóteses da persistência do parasito no hospedeiro como causa fundamental da patologia, e a da resposta inflamatória elevada (autoimune), como sendo responsável pelo dano tecidual observado nos órgãos afetados de pacientes acometidos pela DC, decorrente de uma resposta imune exacerbada contra antígenos próprios do hospedeiro (Kierszenbaum 2005; Hyland & Engman 2006; Dutra & Gollob 2008).

A teoria da persistência do parasito é apoiada pela evidência da presença de *T. cruzi* em áreas lesionadas do miocárdio (Fuenmayor *et al.*, 2005). As técnicas de imunohistoquímica/histologia podem não revelar a presença de parasitos nos sítios de lesão; por outro lado, estudos que empregaram metodologias de maior sensibilidade, como a PCR e hibridização *in situ*, possibilitaram confirmar a persistência de *T. cruzi* nos órgãos afetados (Jones *et al.*, 1993; Vago *et al.*, 1996). Viotti e colaboradores (2006) observaram que pacientes com CCC e sem IC,

tratados com BNZ, apresentaram uma redução na progressão da doença e aumento no percentual de soronegativação.

Isto posto, parece ser inquestionável que a presença do parasito esteja fortemente atrelada ao desencadeamento da patologia. No entanto, outros ensaios clínicos, como o BENEFIT (Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis), envolvendo maior número de pacientes com CCC da América do Sul, demonstrou uma redução significativa na parasitemia, quando tratados com BNZ, porém, não foi observado o desfecho clínico de redução da progressão da doença cardíaca quando comparados com o grupo que recebeu placebo (Morillo *et al.*, 2015). O contraste entre a severidade das lesões ao longo da fase crônica da DC cardíaca e a baixa quantidade de parasitos presentes no sangue e nos tecidos sugere que apenas, a resposta ao parasito, não seja suficiente para justificar a patologia observada e que a autoreatividade deva contribuir para o agravamento da doença.

Esta ideia leva à hipótese de que respostas autoimunes ocorrem durante o desenvolvimento da patologia. Favorecendo esta teoria está o fato de que epitopos antigênicos do parasito estariam frequentemente estimulando uma resposta humoral do hospedeiro, levando ao desencadeamento de reações cruzadas com os epitopos presentes nos tecidos do hospedeiro (Girones *et al.*, 2005; Cunha-Neto *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que anticorpos anti-*T. cruzi* podem mediar uma reatividade celular (Gazzinelli *et al.*, 1990; Reis *et al.*, 1993; Dutra *et al.*, 2000; Cunha-Neto *et al.*, 2006). Os linfócitos T atuam no controle do parasito, através da ativação de citocinas inflamatórias, predominantemente, Interferon gamma (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), importantes na fase aguda; entretanto, uma resposta inflamatória prolongada pode contribuir para o desenvolvimento de alterações cardíacas, em uma fase mais posterior (Mangini *et al.*, 2015). A miocardite pode ser devida tanto aos infiltrados cardíacos contendo linfócitos T-*T. cruzi* específicos, quanto àqueles decorrentes de respostas autoimunes (Nogueira *et al.*, 2014).

Embora as teorias que buscam explicar os mecanismos implícitos na patogênese da DC sejam controversas, ambas as hipóteses de autoreatividade e de persistência do parasito não são mutuamente excludentes. Assim, ambas devem ser consideradas na tentativa de se compreender o estabelecimento e a manutenção da patologia da DC (Dutra *et al.*, 2009).

Durante a fase aguda, a ativação de populações específicas de células do sistema imune que irão operar funções efetoras, é crucial para o controle do parasito. Poucos estudos estão disponíveis na literatura, referentes a análises qualitativas da resposta imune humana durante a infecção aguda pelo *T. cruzi* (Gazzinelli *et al.*, 1991; Kretzli 2009; Alarcón de Noya *et al.*, 2016). Todavia, tem sido demonstrado que, a produção de anticorpos, assim como a ativação dos mecanismos imunes inatos, parecem ser importantes para o controle do parasito durante a fase inicial da infecção (Kretzli 2009).

Estudos em modelos experimentais de fase aguda da DC demonstram uma resposta inflamatória robusta, com produção de citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α , as quais irão ativar macrófagos para a eliminação do parasito (Teixeira *et al.*, 2002). Esta premissa tem como base os achados em animais nocautes para IFN- γ e TNF- α , que são fortemente suscetíveis à infecção por *T. cruzi*, da mesma forma que o observado em camundongos deficientes em óxido nítrico (Silva *et al.*, 1995). Os estudos realizados no decurso da fase aguda da doença vêm demonstrando a produção de citocinas inflamatórias, que têm sido associadas ao controle da parasitemia.

A transição da fase aguda para a crônica é acompanhada por um decréscimo na parasitemia, assim como no controle da resposta inflamatória observada na fase aguda. Isto sugere a presença de mecanismos imunoregulatórios que atuam no controle desta resposta inflamatória. É reconhecida a função das citocinas anti-inflamatórias no controle da produção de citocinas inflamatórias, dentre essas destaca-se a IL-10, proteína produzida por células do sistema imune, tais como monócitos e células T (Machado *et al.*, 2012; Dutra *et al.*, 2014; Pérez-Molina & Molina 2018). Na fase aguda da DC, pouco se sabe sobre a produção de IL-10; enquanto que já foi identificada a sua produção em pacientes crônicos desde os estágios iniciais até os mais tardios da fase crônica (Sathler-Avelar *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2004; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008). Por conseguinte, é possível que o controle da intensa reação inflamatória, observado na fase aguda, seja devido à produção de IL-10. Interessantemente, este controle aparenta estar bem equilibrado, levando em consideração que a produção de IL-10 na fase inicial da infecção, não imunossuprime a resposta celular, suficientemente, a ponto de permitir o aumento dos níveis de parasitos; no entanto, parece ser suficiente para controlar o estabelecimento da infecção no curso da fase crônica, ao menos em pacientes

indeterminados (Dutra *et al.*, 2014). A IL-10 tem sido apontada como um bom marcador prognóstico da DC, uma vez que pacientes crônicos com a forma indeterminada apresentam maior concentração dessa citocina (Dutra *et al.*, 2009; Dutra & Gollob, 2008; Machado *et al.*, 2012).

Na maior parte dos pacientes que seguem para a fase crônica, a doença é silenciosa. Esses indivíduos apresentam sorologia positiva anti-*T. cruzi*, além de uma resposta ativa de células T contra o parasito e até mesmo contra os seus próprios antígenos (Dutra *et al.*, 2000), porém são classificados como indeterminados, isto é, não apresentam sinais clínicos da doença. A forma clínica indeterminada da DC representa um balanço ideal da interação parasito e hospedeiro, tendo em vista a persistência do parasito durante anos, na ausência de desenvolvimento da doença (Validade do conceito de forma indeterminada de doença de Chagas 1985; Macêdo 1999; Prata 2001; MS 2005).

Estudos abordando os mecanismos imunoregulatórios em pacientes com a forma indeterminada têm mostrado que, da mesma forma que esses indivíduos produzem citocinas inflamatórias, tais como TNF- α e IFN- γ (provavelmente importantes para manter o parasito sob controle), eles também produzem citocinas anti-inflamatórias, em especial a IL-10. De fato, uma maior frequência de células T reguladoras (de Araújo *et al.*, 2007, 2012), monócitos e linfócitos produtores de IL-10 (Souza *et al.*, 2004) pode ser encontrada em pacientes com a forma clínica indeterminada, quando comparados aos pacientes na forma crônica cardíaca. O equilíbrio entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias é deslocado, consideravelmente, em direção ao braço anti-inflamatório da resposta imune nos pacientes com a forma indeterminada (Souza *et al.*, 2004). Estudos mais recentes observaram que a IL-17 desempenha um papel protetor na DC humana, bem como em modelos de infecção experimental (Miyazaki *et al.*, 2010; Magalhães *et al.*, 2013). Trabalhos sobre a expressão de IL-17 em pacientes com DC demonstraram que aqueles, na forma indeterminada, exibem uma frequência mais alta de células T IL-17+ quando comparados aos pacientes com a doença cardíaca (Magalhães *et al.*, 2013).

A CCC está associada à presença de um intenso infiltrado inflamatório no miocárdio, composto, especialmente, por células T CD8⁺. Enquanto que pacientes com a forma indeterminada exibem um perfil modulatório de células T ativadas, observa-se em pacientes cardiopatas, com perfil de células T CD28-, uma

associação com a expressão de citocinas inflamatórias, como TNF- α (Menezes *et al.*, 2004). Tem sido demonstrado que a principal fonte de IFN- γ , em pacientes portadores da doença, são as células T CD4+ (Gomes *et al.*, 2003). Esta citocina possui níveis mais altos em pacientes com CCC em relação aqueles na forma indeterminada, e pode ser o fator-chave para o desenvolvimento da cardiomiopatia severa. Monócitos de pacientes com cardiopatia também produzem TNF- α e IL-10; sendo esta última, encontrada em níveis mais reduzidos nestes pacientes (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1999).

Publicações recentes demonstraram que a elevada produção de IL-10 ou IL-17 está correlacionada ao melhor funcionamento cardíaco nos pacientes com DC, enfatizando o papel protetor destas citocinas (Costa *et al.*, 2009; Villani *et al.*, 2010; Magalhães *et al.*, 2013; Vasconcelos *et al.*; 2015, Sousa *et al.*, 2017). Porém, ainda se faz necessário o entendimento dos mecanismos que controlam a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10, nos indivíduos portadores de formas mais brandas da DC cardíaca.

As formas digestivas (megaesôfago e megacólon) também são causas de morbidade na fase crônica da DC. Infiltrados inflamatórios e fibrose são encontrados associados às lesões de células musculares e do sistema nervoso intramural. Os infiltrados são compostos, majoritariamente, por linfócitos T CD3+CD4+, linfócitos B CD20+, células NK CD57+ e células macrófagos-like CD68+ (d'Ávila Reis *et al.*, 2001). Corrêa-Oliveira e colaboradores (1999) observaram que pacientes com a forma gastrointestinal da DC, demonstraram uma diminuição significativa no número absoluto de células T CD3+, linfócitos B CD19+ e uma inversão na proporção de CD4/CD8, contrastando com os resultados obtidos de pacientes com CCC que apresentaram uma proporção normal dessas células. Pacientes portadores de megacolon apresentam um aumento no número de eosinófilos e células mononucleadas (da Silveira *et al.*, 2007). Estas células estão associadas ao processo inflamatório e podem contribuir com a injúria tecidual, por meio da secreção de citocinas, tais como IL-1, TNF- α e IL-6, as quais ativam o processo citotóxico (Cardoso *et al.*, 2006).

Outras citocinas também já tiveram seu papel bem caracterizado na patogênese da DC. A inibição do Fator transformador de crescimento beta (TGF- β) em modelos experimentais de fases aguda e crônica evidenciou a contribuição desta

citocina no aumento da deposição de colágeno no tecido cardíaco, gerando a fibrose desse órgão (Waghbi *et al.*, 2009; de Oliveira *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2019).

A “hipótese neurogênica” (disfunção autonômica) é suportada pelo achado de depleção neuronal ganglionar intracardíaca e disautonomia, porém não foi possível correlacionar com a disfunção ventricular nos pacientes com CCC (Andrade *et al.*, 2011). Ainda assim, pode ser apontada como um dos fatores que contribuem para a progressão da CCC, além de ser um dos fatores de risco para a indução de morte súbita em pacientes portadores da DC (Marin-Neto *et al.*, 2007). Lesões microvasculares também estão associadas a infecção pelo *T. cruzi* e têm sido registradas em pacientes com CCC; o que leva ao dano endotelial e consequente formação de trombos gerados também por mediadores inflamatórios, potencializando o dano inflamatório no tecido miocárdico (Marin-Neto *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2011).

Considerando os pacientes que desenvolvem CCC, a evolução da doença cardíaca leva muitos anos, sugerindo que exista algum nível de controle imunoregulatório. Dutra e colaboradores (2014) levantaram a hipótese de que a forma indeterminada da DC está associada à predominância de um ambiente anti-inflamatório, enquanto a forma cardíaca se associa à um perfil inflamatório predominante. Assim, por mecanismos ainda não identificados, a evolução da forma clínica cardíaca pode estar relacionada à perda da habilidade do controle da resposta imune inflamatória, levando ao dano tecidual. A suscetibilidade genética do hospedeiro aparenta desempenhar um importante papel neste processo, porém outros mecanismos, ainda desconhecidos, tais como eventos epigenéticos e pós-translacionais, também podem ser importantes. A **Figura 1.5** sintetiza os dados que corroboram a hipótese de Dutra e colaboradores (2014).

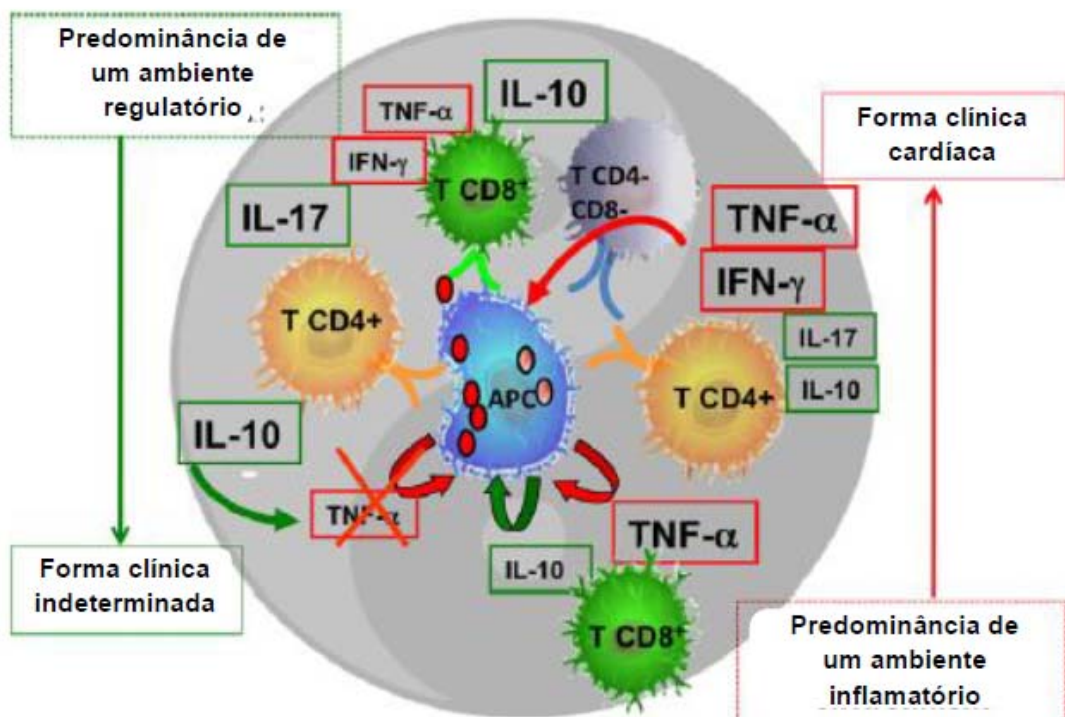


Figura 1.5: Citocinas desempenhando um papel na orquestração da resposta imune na doença de Chagas: o yin/yang da imunoregulação. Após a infecção, a produção de citocinas, tais como IFN- γ e TNF- α , é importante para a ativação dos macrófagos na extinção dos parasitos intracelulares. Estas citocinas favorecem o estabelecimento de um ambiente inflamatório que, se não controlado, pode levar ao dano tecidual e, ainda, ao estabelecimento da forma clínica cardíaca. Em contrapartida, se a inflamação inicial for controlada pela expressão de citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10, pode levar ao balanço da resposta imune e à manutenção da forma clínica indeterminada. Diversos estudos têm demonstrado que TNF- α e IL-10 são produzidos, principalmente, por células T CD4+; porém, células T CD8+ e CD4-CD8- também expressam porcentagens significativas destas citocinas. Em ambas as formas clínicas, indeterminada e cardíaca, podem ser identificadas citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, sendo que a predominância de um ambiente inflamatório é observada nos pacientes com a forma cardíaca, enquanto um ambiente anti-inflamatório predomina naqueles pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas.

Fonte: Adaptado de Dutra *et al.*, 2014.

1.7.1. Polimorfismos de base única em genes de citocinas

Ao longo dos anos, a apreciação pela complexidade da resposta imune e como ela é regulada tem sido amplamente conduzida através de grandes avanços na biologia de citocinas e genética molecular. Atualmente, muitas centenas de moléculas de peptídeos imunoregulatórias e modulatórias têm sido identificadas e caracterizadas juntas com seus receptores e ligantes. Sabe-se que algumas moléculas exibem efeitos sistêmicos, enquanto que outras atuam somente em nível local (Borish & Steinke 2003; Ollier 2004).

Citocinas são um grupo de proteínas ou glicoproteínas que se ligam aos seus respectivos receptores em resposta a uma variedade de estímulos, resultando na ativação de vias relacionadas a segundos mensageiros e à transdução de sinal dentro de uma célula (Smith & Humphries 2009). Neste contexto, está claro que algumas moléculas de citocinas exibem um alcance determinado de especificidade para tipos celulares, ao passo que outras são altamente pleiotróficas e afetam múltiplas células e tecidos (Borish & Steinke 2003; Ollier 2004). Toda esta variabilidade, em termos de especificidade das citocinas, levou a uma complexa rede regulatória que exhibe um nível de redundância elevado entre algumas citocinas, resultando, diretamente, em efeitos antagônicos. Consequentemente, estas interações levam a um controle efetivo da resposta imune, através de um mecanismo que é tanto, dinamicamente responsivo quanto auto-regulatório, ou seja, a rede de citocinas é um sistema altamente regulado, pelo qual, mudanças significativas, observadas nos níveis de secreção de citocinas celulares, podem retornar aos níveis basais após o estímulo ser removido (Baker *et al.*, 2003; Smith & Humphries 2009; Toomer & Malek 2018).

Levando-se em consideração que as citocinas são as chaves reguladoras dos mecanismos homeostáticos, tais como resposta imune, inflamação, resposta na fase inicial de uma infecção e reparação tecidual, não é surpreendente que as variações de seus níveis (quantitativa) e suas estruturas (qualitativa), podem ser associadas aos processos de doença ou susceptibilidade, além de poderem contribuir para a etiopatogenia (Stoeger *et al.*, 2009; Dutra *et al.*, 2014; Toomer & Malek 2018). Além disso, os níveis de citocinas basais e aqueles sob efeitos de estímulos, variam entre indivíduos e ambas, as influências genética e ambiental, têm demonstrado desempenhar papéis importantes para essa variação (Smith & Humphries 2009).

Uma questão fundamental é se a variação no nível de uma citocina corresponde a uma causa primária para uma doença ou somente reflete um efeito negativo secundário da inflamação. Uma abordagem para desvendar esta questão tem sido investigar polimorfismos em genes de citocinas, através de estudos de ligação gênica ou de associação caso-controle (Zeggini *et al.*, 2002, Donn *et al.*, 2004). Este último provou ser uma abordagem investigativa mais frequentemente empregada para identificar susceptibilidade a uma doença, bem como, prover uma justificativa para explicar a severidade e a heterogeneidade de quadros clínicos observados. Vários estudos de caso-controle envolvendo a associação de genes que codificam citocinas vêm sendo descritos na literatura, sendo que alguns descrevem o aumento do risco a uma doença por certas variantes genéticas (Yang 2014; Montoya-Ruiz *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2017).

Em geral, os polimorfismos genéticos (variações genéticas decorrentes de mutações em um determinado genes[s]) se apresentam sob três formas principais: Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (categoria de polimorfismo originada de uma simples mutação, ocorre quando há troca de um único nucleotídeo por outro), Número variável de repetições em *tandem* (VNTR) (categoria de polimorfismos na qual há um padrão de nucleotídeos repetidos na sequência genética, também conhecida como minissatélites) e microssatélites (categoria de polimorfismos caracterizada pela presença de bases nitrogenadas repetidas no DNA, que podem ser duas, três ou quatro, também definida como STR [Repetição simples em tandem]). A extensão do polimorfismo varia amplamente. Genes bem caracterizados, tais como *TNFA* e *IL10* possuem um grande número de SNPs e microssatélites descritos (Udalova *et al.*, 1993; Eskdale & Gallagher 1995; Ugliodoro *et al.*, 1998; Gibson *et al.*, 2001; Hollegaard & Bidwell 2006), ao modo que os genes de *IL12* e *IL2* que pensava-se, originalmente, que fossem não polimórficos, já foram encontrados polimorfismos nestes genes (John *et al.*, 1998; Pravica *et al.*, 2000).

Os marcadores genéticos utilizados na maioria dos estudos são os microssatélites (Weber & May 1989) ou SNPs (Kruglyak 1999). Sendo que os primeiros tendem a ser mais comumente investigados em estudos de ligação (ou de desequilíbrio de ligação) com material genético de indivíduos proximalmente relacionados, enquanto que os SNPs são usualmente os marcadores escolhidos para estudos caso-controle de associação de amostras, tendo como base uma determinada população (Keen 2002; Ollier 2004).

Ambos os estudos de ligação e de associação de genes de citocinas a doenças vêm sendo realizados (Hajeer *et al.*, 1996; John *et al.*, 1998; Zeggini *et al.*, 2002), com o intuito de se entender em que proporção os polimorfismos específicos influenciam direta ou indiretamente os níveis de expressão e produção das citocinas, e até então, os resultados foram conflitantes (Turner *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1997). Alguns loci polimórficos parecem modificar, consistentemente, a produção de citocina, entretanto, a maioria dos polimorfismos em genes de citocinas parece ter pouca ou nenhuma influência na produção e expressão destas moléculas (Jordanides *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 2001).

Atualmente, SNPs bialélicos são frequentemente utilizados em estudos de associação, sendo bem abundantes por todo o genoma, com mais de 5 milhões de SNPs identificados (NCBI – dbSNP 2020). Os SNPs podem ser localizados em regiões exônicas de genes de citocinas, podendo resultar em mudanças não-sinônimas (afetando a sequência de aminoácidos) ou em mudanças sinônimas (sem afetar a sequência de aminoácidos). Vários SNPs de citocinas são prováveis de serem encontrados nas regiões reguladoras do gene. Nestes casos, os SNPs podem estar localizados na região promotora, em sítios que irão afetar a função dos fatores de transcrição, ou nas regiões 3'UTR, onde irão influenciar a meia-vida dos transcritos de RNA. Outros SNPs podem estar localizados nas regiões intrônicas dos genes, podendo não causar efeitos no nível e na qualidade da proteína produzida, ou se estiverem posicionados em uma região que influencia o *splicing* do RNA mensageiro (mRNA), estes SNPs podem levar à variantes diferentes de *splicing* ou *splicing* alternativo (**Figura 1.6**) (Ollier 2004).

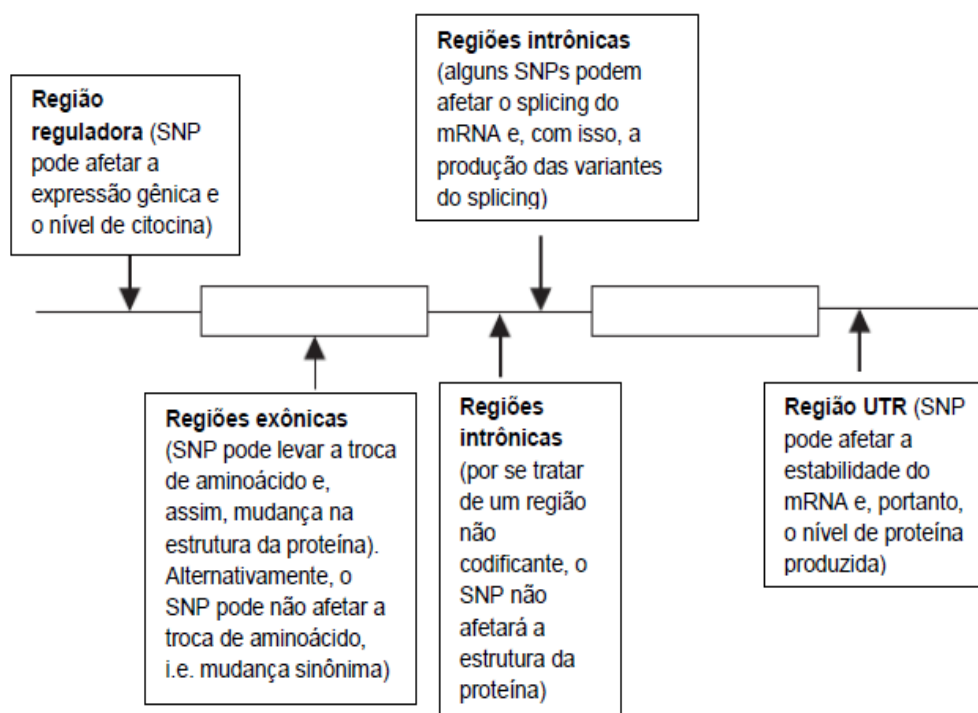


Figura 1.6: SNPs em genes que codificam citocinas e seus possíveis desfechos.

Fonte: Adaptado de Ollier 2004.

Sendo assim, múltiplos SNPs podem ser, muitas vezes, encontrados ao longo de toda a estrutura de um gene, sendo a maioria destes, provavelmente não-funcionais. Contudo, dada a proximidade física entre os SNPs, muitos deles podem estar em desequilíbrio de ligação um com o outro, tornando possível a formação de múltiplos haplótipos de SNPs (Weiss 1998). Os diversos estudos de associação de genes de citocinas analisaram somente posições únicas de SNPs e, se o SNP testado está de alguma forma distanciado da origem da mutação ou não está em desequilíbrio de ligação com a mutação, o que pode levar a não identificação de associação dos genes. Apesar da construção de haplótipos de SNPs requerer um custo maior, devido à necessidade da genotipagem, atualmente é reconhecido que uma melhor abordagem incide em se testar genes candidatos nos estudos de associação, através da comparação das frequências dos haplótipos de SNPs entre os casos e controles, do que em relação à pesquisa de SNPs únicos (Johnson *et al.*, 2001; Ackerman *et al.*, 2003).

1.7.2. Estudos de associação entre SNPs em genes de citocinas e doença de Chagas

Um vasto número de estudos caso-controle vem encontrando sinais de associação entre polimorfismos gênicos e progressão da doença. Costa e colaboradores (2009) e Frade-Barros e colaboradores (2020), observaram uma associação entre a ocorrência do polimorfismo -1082G/A (rs1800896) com o risco de desenvolvimento da forma cardíaca da DC, na população brasileira (Costa *et al.*, 2009; Frade-Barros *et al.*, 2020). Este polimorfismo também foi relacionado com a produção reduzida de IL-10 (Turner *et al.*, 1997), possivelmente associada a um pior prognóstico da evolução da DC, como visto anteriormente por diferentes autores (Dutra *et al.*, 2009; Dutra & Gollob, 2008; Machado *et al.*, 2012). Ressaltando que o polimorfismo em questão integra os alvos de estudo do presente trabalho.

Genes na região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe III/*TNFA*, também foram sondados quanto a possíveis associações com a progressão da DC. Um estudo realizado com uma população mexicana identificou esta associação em relação ao polimorfismo *TNFA*-308A/G (rs1800629), podendo alterar a sua transcrição (Rodríguez-Peréz *et al.*, 2005). Este polimorfismo também é objeto de estudo do presente trabalho.

Como visto, o espectro de expressão da DC traz fortes evidências da influência dos fatores genéticos do hospedeiro, no decorrer do desenvolvimento da patologia. Ayo e colaboradores (2013) sumarizaram os dados prévios de estudos de associação de SNPs em genes de citocinas à DC, seguindo critérios propostos pelos próprios pesquisadores (**Tabela 1.2**). Até o presente momento, outros estudos foram publicados com esta mesma temática, incluindo novas abordagens, como por exemplo, a identificação de SNPs no gene *IL18* que foram relacionados à suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* e/ou à progressão da CCC (Leon Rodriguez *et al.*, 2016). Outro estudo recente envolvendo os polimorfismos no gene *IL17A* e no gene *IL17F*, foi observado um possível envolvimento destes SNPs com suscetibilidade à DC crônica e com o desenvolvimento e progressão da CCC, respectivamente (Reis *et al.*, 2017). Além desses estudos, Gomes dos Santos *et al.* (2020) observaram um efeito modulatório do genótipo CG do SNP rs1800795 de *IL6* na detecção da parasitemia, bem como a associação dos genótipos AA do SNP rs2275913 de *IL17A*, AA do SNP rs1946518 de *IL18* e TC do SNP rs1143627 de *IL1B* com o caráter protetor à progressão da cardiomiopatia na DC.

Tabela 1.2: Polimorfismos em genes de citocinas e suas associações à doença de Chagas.

Gene/alelo/genótipo	População	Forma clínica	Associação
^a TNFA -308, -244, -236 e TNFB	Peru	Infecção e CCC	Sem associação
^b TNF -308A	México	Infecção e CCC	Suscetibilidade
TNF -308A	Brasil	CCC	Sem associação
^a TNF -238A	Brasil	Infecção	Suscetibilidade
^a TNF -1031C e -308A	Colômbia	CCC	Suscetibilidade
^a TNFA -1031TT e -308GG	Colômbia	CCC	Proteção
^a TNFA2, TNFa7, TNFa8, TNFb2, TNFb4, TNFd5, TNFd7, TNFe2	Brasil	CCC, DG, ou mista	Proteção
^a TNFb7 e TNFd3	Brasil	CCC e mista	Suscetibilidade
^a TNFA2	Brasil	CCC	Suscetibilidade
^b LTA +80C e LTA +252G	Brasil	CCC	Suscetibilidade
^b LTA +80A +252A	Brasil	CCC	Proteção
haplotype			
IL6 -174GC	Peru/Colômbia	Infecção	Sem associação
^b IL -1RN.4CC	México	CCC	Suscetibilidade
^b IL1B +5810G alelo e IL1B -31 +395 CT genótipo	Colômbia	CCC	Suscetibilidade
^a IL10 -1082A e -1082AA	Brasil	CCC	Suscetibilidade
IL10	Colômbia	Infecção	Sem associação
^a IFNG +874A e +874AA	Colômbia	Infecção	Suscetibilidade
^a IL4 -590T	Bolívia	Infecção	Proteção
^a IL4RA +148AA		CCC	Suscetibilidade
^a TGFB110C e CC	Peru/Colômbia	Infecção	Suscetibilidade
^b IL12B 3 UTR C e CC	Colômbia	CCC	Suscetibilidade
^a CXCL9CC e CXCL10GG	Brasil	CCC	Proteção
CCR5CC		CCC	Suscetibilidade
^a CCR5 -2554T, -2733G, 59029G, 59029AG, 59029GG	Peru/Colômbia/Venezuela	CCC	Suscetibilidade
^a CCL2 -2518A e AA	Brasil	CCC	Suscetibilidade
^a BAT1 22C 348C	Brasil	CCC	Suscetibilidade

^ap value ≤ 0.05; ^bp value ≤ 0.05.

CCC: cardiomiopatia chagásica crônica; DG: forma digestiva; mista: CCC e DG ou CCC + DG.

Fonte: Adaptada e revisada por Ayo *et al.*, 2013.

Dentre os estudos que avaliaram SNPs em indivíduos com DC, pode ser observado que os polimorfismos mais comumente estudados são aqueles localizados nos genes *TNF*, Linfotóxina alfa (*LTA*), *BAT1* (*HLA-B Associated Transcript 1*), *TGFB* e *IL10*, e, apesar de algumas associações ao risco de estabelecimento da DC cardíaca terem sido descritas, ainda existe uma necessidade de replicar tais achados em diferentes populações (Beraún *et al.*, 1998; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2005; Ramasawmy *et al.*, 2006b; Drigo *et al.*, 2007; Calzada *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2009; Flórez *et al.*, 2011; Pissetti *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2019; Frade-Barros *et al.*, 2020).

A identificação de polimorfismos com potencial de atuarem como marcadores de prognóstico para o desenvolvimento das manifestações clínicas da DC seria de grande interesse. Isto é especialmente verdade para a DC, considerando o longo período de tempo para a apresentação clínica dos sintomas de progressão. Portanto, a caracterização de genes de suscetibilidade e suas variantes têm importantes implicações, não somente para uma melhor compreensão da patogênese da DC, mas, também, para o monitoramento dos indivíduos afetados e a possível identificação de novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de estratégias alternativas de tratamento para a DC.

1.7.3. Genotipagem de SNPs por High Resolution Melting (HRM)

HRM é um método relativamente novo para análise de DNA, que foi introduzido em 2002 através de uma parceria entre academia (Universidade de Utah, UT, EUA) e indústria (Idaho Technology, UT, EUA). Considerado ser uma abordagem mais simplificada para estudos de genotipagem, mapeamento de mutações e de complementariedade entre sequências, o seu uso vem sendo ampliado na última década. Após a amplificação por PCR, as curvas de *melting* dos produtos amplificados são geradas a partir do monitoramento da emissão de fluorescência de corantes saturantes (Gundry *et al.*, 2003; Krypuy *et al.*, 2006).

A temperatura de *melting* (dissociação) da dupla fita de DNA foi historicamente monitorada através da medida de absorvância por luz ultravioleta (UV). Para curvas de *melting* de alta qualidade, era necessário o uso de quantidades maiores de DNA (em torno de microgramas) e leituras com intervalos de 0.1–1.0 °C/min (Porter & Guild 1976; Sun *et al.*, 1999). Em contraste à absorvância por UV, a análise da dissociação do DNA por fluorescência é mais sensível e pode ser realizada com quantidades bem menores de DNA, na escala de nanogramas, a partir de fragmentos de DNA previamente amplificados por PCR. Com o advento da qPCR, metodologias que permitem monitorar a cinética de dissociação dos fragmentos de DNA através da emissão de fluorescência, se tornaram disponíveis (Wittwer & Kuskawa 2004) e foram introduzidos com o Light-Cycler® há mais de 20 anos (Ririe *et al.*, 1997; Wittwer *et al.*, 1997a; Wittwer *et al.*, 1997b).

SYBR® Green I é um corante fluorescente com boa sensibilidade e tornou-se conveniente para as análises de dissociação dos produtos de PCR (Wittwer *et al.*, 2003). Na atualidade, existem vários outros, incluindo o LCGreens1 (Idaho

Technology Inc.), Syto9s (Invitrogen, Carlsbad, CA), EvaGreens (Biotium, Fremont, EUA) e LightCyclers 480 ResoLight Dye (Roche, Indianapolis, IN). O custo destes corantes difere significativamente no mercado, e devido às suas características peculiares, as condições de uso e os seus respectivos tampões para a PCR são distintos.

Diversos fornecedores desenvolveram sistemas para análises das curvas de dissociação usando a metodologia de HRM (Herrmann *et al.*, 2006, 2007). Estes sistemas podem ser usados pontualmente para as análises de HRM ou combinados com a qPCR. Como bem demonstrado por Rouleau e colaboradores (2009), a combinação de qPCR com os instrumentos de análise por HRM permite a detecção pontual de alterações nas sequências de DNA, tanto quantitativas (deleção/duplicação) quanto qualitativas (nucleotídeo), em um único ensaio.

A fim de gerar uma curva de *melting*, a amostra é aquecida ao longo de uma faixa de temperaturas, enquanto a fluorescência é continuamente coletada, em tempo real (**Figura 1.7A**). Qualquer dupla fita de DNA (*dsDNA*) terá sua fluorescência aumentada com o decaimento de temperatura. O aumento da temperatura leva a um decaimento gradativo da fluorescência, até atingir uma temperatura específica que faz com que a fluorescência decaia abruptamente, refletindo a dissociação da *dsDNA* em fita simples de DNA (*ssDNA* ()). A temperatura de *melting* (T_m) da *dsDNA* é determinada pelo seu conteúdo de GC, tamanho da sequência e corresponde à temperatura na qual a fluorescência normalizada é de 50% (**Figura 1.7B**).

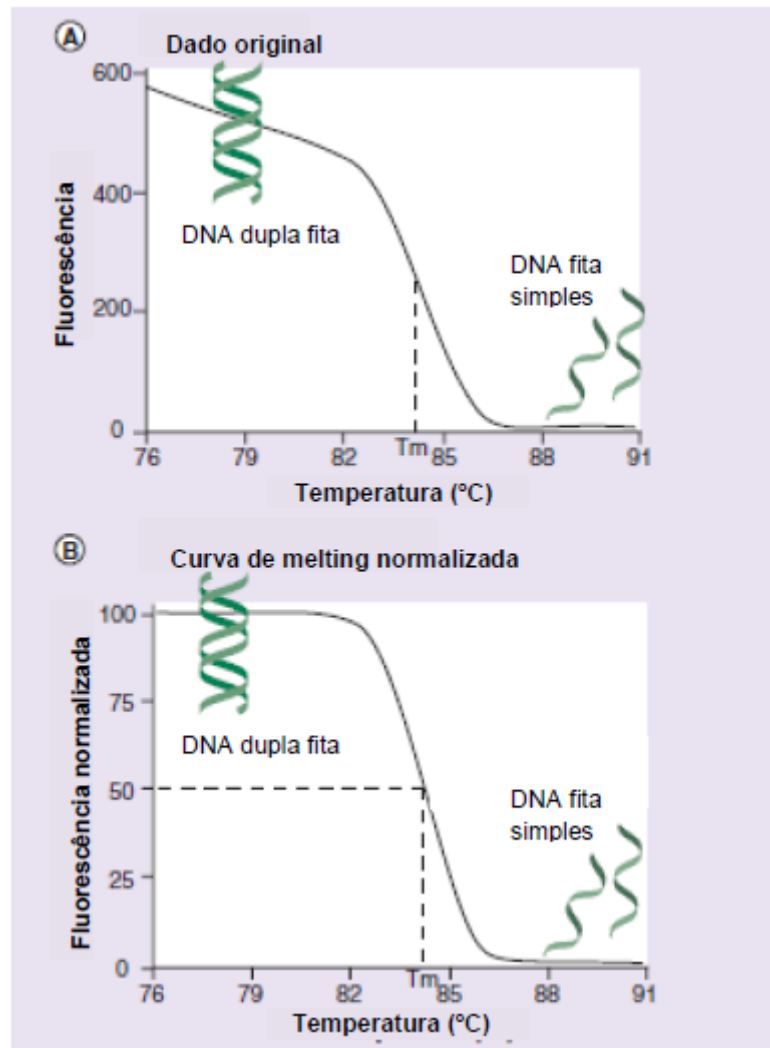


Figura 1.7: Análise da fluorescência de dissociação do DNA. **A-** Dado de fluorescência original mostrando um decréscimo linear da fluorescência em temperaturas mais baixas, seguido por um decaimento abrupto próximo da temperatura de *melting* (T_m). A fluorescência é nula quando o DNA se apresenta como fita simples. **B-** Curva de melting normalizada, na qual o dado original de fluorescência está normalizado entre 0 e 100%.

Fonte: Adaptado de Reed *et al.*, 2007.

A T_m de um produto de PCR representa um dado métrico conveniente, mas não é o único ponto em uma curva de dissociação. Maiores informações estão contidas na curva de *melting* completa. O formato da curva de *melting* é utilizado extensivamente para o mapeamento de mutações e na avaliação de sequências correspondentes, como um indicador de heteroduplexes formados a partir de um DNA heterozigoto (Reed *et al.*, 2007).

Como dito anteriormente, o HRM vem sendo desenvolvido para a detecção de variantes presentes na sequência de DNA, sendo aplicado, inicialmente, para genotipagem de SNPs (Wittwer *et al.*, 2003). Baixo custo, fácil manejo e uma alta sensibilidade/especificidade têm sido os principais parâmetros ressaltados, tornando o HRM uma ferramenta atrativa para genotipagem e aplicação em laboratórios de diagnóstico (Vossen *et al.*, 2009).

As análises por HRM permitem realizar a genotipagem sem o uso de sondas específicas, particularmente quando a alteração na sequência é de base única (SNP). Na **Figura 1.8** observamos um exemplo de variação A>C com os possíveis genótipos A/A, A/C e C/C. Se um pequeno amplicon (± 55 pb) é gerado a partir da amplificação por PCR com iniciadores que flanqueiam o *locus* variável, todos os três genótipos serão facilmente distinguidos. As variantes A/A e C/C geram perfis de dissociação com formatos semelhantes, sendo o T_m do homozigoto C/C aproximadamente 1 °C acima que o T_m do homozigoto A/A. A curva de *melting* do heterozigoto A/C difere no formato das curvas de ambos os homozigotos, apresentando transições graduais sobre uma faixa ampla de temperatura. A maior variedade de resultados dos formatos das curvas de *melting* produz a dissociação de quatro diferentes duplexes: dois homoduplexes (A/A e C/C) e dois heteroduplexes (A/C e C/A) (Reed *et al.*, 2007).

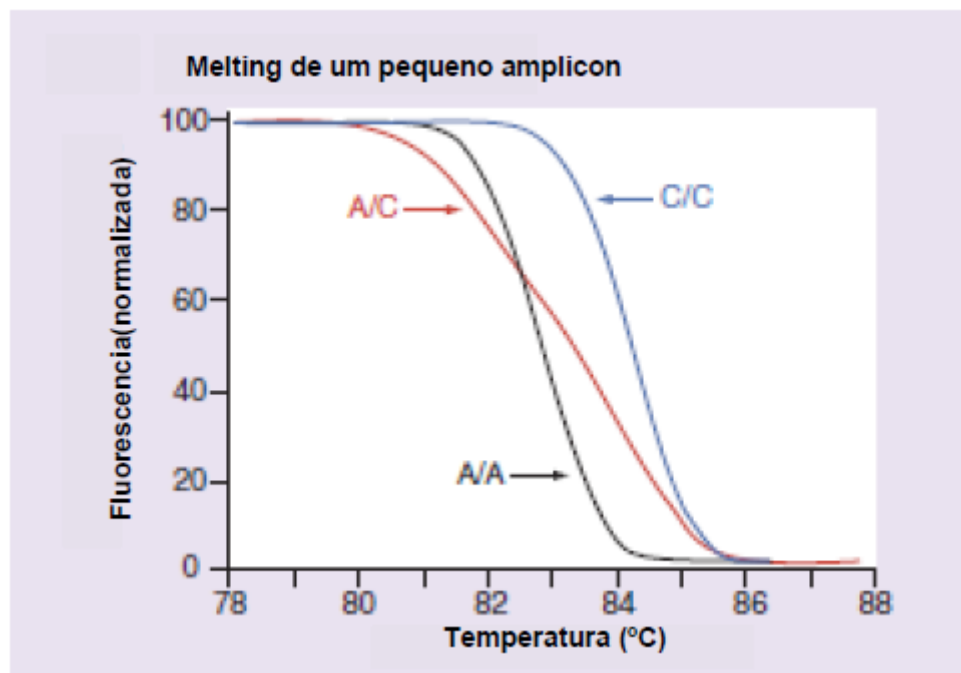


Figura 1.8: Genotipagem de SNP através da dissociação de um pequeno amplicon.

Fonte: Adaptado de Reed *et al.*, 2007.

Uma limitação do HRM é que a técnica não é facilmente aplicada em sistemas multiplex, os quais permitem genotipar variantes em diversos fragmentos de DNA, simultaneamente. Teoricamente, realizar um multiplex com HRM pode ser alcançado pela exploração das diferenças de cores, diferenças nas temperaturas, ou ambas. Seipp e colaboradores (2008) usaram a abordagem mais simples, que foi avaliar a diferença entre $T_m(s)$ para desenhar, com sucesso, um ensaio de genotipagem quadruplex. Contudo, tal desenho é complexo e seu sucesso depende criticamente da alta qualidade das amostras de DNA e da sensibilidade do sistema de HRM utilizado.

Diante disso, pode-se dizer que a metodologia de HRM é atualmente um dos métodos mais adequados e simplificados para mapeamento de mutação e genotipagem de SNPs, uma vez que não necessita de processamento e nem de separação pós-PCR das amostras analisadas, além de um custo mínimo. Quando implementado corretamente, 95–99% dos ensaios não necessitam de sequenciamento (Reed *et al.*, 2007; Higuera *et al.*, 2013).

1.8 Justificativa

A DC é endêmica em áreas tropicais e subtropicais da América do Sul e Central e México, sendo ainda encontrada de forma autóctone no sul dos Estados Unidos. Esta patologia é considerada um problema grave de saúde pública, além de ser uma preocupação global emergente em áreas não endêmicas. Considerada como a terceira mais importante doença tropical negligenciada, esforços ainda se fazem necessários para o acesso a um diagnóstico acurado e tratamento adequado para os pacientes portadores da DC, a fim de melhor controle/monitoramento da infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Outro desafio é a diversidade deste parasito, onde na natureza, suas populações são classificadas em distintas linhagens genéticas. Identificar o genótipo de *T. cruzi* pode ser um determinante importante de forma clínica e prognóstico da DC crônica. No entanto, os papéis específicos das distintas DTUs do parasito e os fatores imunológicos do hospedeiro, relacionados à progressão e prognóstico da DC, ainda são debatidos, e poucos estudos nesta temática foram realizados até o presente momento. Importante ressaltar que as interações complexas entre fatores genéticos do hospedeiro e do parasito, além de fatores ambientais e a epidemiologia determinam o desfecho clínico da DC. Diversos estudos têm reportado SNPs em genes relacionados à resposta imune como marcadores de suscetibilidade genética para DC crônica. Entretanto, estes estudos de associação apresentam resultados, algumas vezes, inconclusivos/discordantes a respeito da progressão da DC crônica, principalmente da forma cardíaca.

Sendo assim, o presente trabalho se propôs a avaliar uma coorte de pacientes crônicos portadores de diferentes formas clínicas da DC, atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fiocruz. Os seguintes parâmetros foram investigados: (i) estimativa da carga parasitária em amostras de sangue; (ii) genotipagem molecular do *T. cruzi* para a identificação dos genótipos do parasito diretamente do sangue dos pacientes; e (iii) a identificação de polimorfismos genéticos (SNPs) em genes de citocinas nestes pacientes, após padronização da metodologia molecular de HRM. O conjunto dos dados foi avaliado na tentativa de estabelecer uma possível associação entre os fatores inerentes ao parasito e os fatores genéticos dos pacientes, em relação às diferentes formas clínicas da DC crônica; sexo, faixa etária e origem geográfica dos indivíduos envolvidos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

A partir de uma coorte de pacientes portadores da doença de Chagas crônica assistidos no INI/Fiocruz, analisar parâmetros relacionados ao *Trypanosoma cruzi* (carga parasitária e genótipo) e aos humanos (SNPs em genes que codificam citocinas), buscando correlacioná-los com as diferentes formas clínicas da doença.

2.2 Objetivos específicos

- 1.** Correlacionar a carga parasitária de *T. cruzi* e o genótipo do parasito (DTU I a VI), determinados por qPCR e PCR multilocus, respectivamente, a partir de amostras de sangue periférico de pacientes crônicos portadores de diferentes formas clínicas da doença de Chagas;
- 2.** Desenvolver metodologia de genotipagem por HRM para a identificação de SNPs em genes de citocinas descritos na literatura;
- 3.** Investigar possível correlação entre os parâmetros analisados relacionados ao parasito e a humanos com as formas clínicas da doença de Chagas crônica, assim como em relação ao sexo, faixa etária e origem geográfica dos indivíduos envolvidos.

3. Material e Métodos

3.1 Considerações éticas

Os procedimentos para a realização do estudo sobre carga parasitária, tipagem molecular de *T. cruzi* e avaliação de SNPs em genes de citocinas/quimiocinas humanos, diretamente do sangue de pacientes infectados pelo parasito, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, sob os números 1.215.633 e 2.222.253 (Anexos 1 e 2). Os indivíduos recrutados foram incluídos no projeto somente após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3), seguindo as normas de Boas Práticas Clínicas.

3.2 População de estudo

Foram recrutados para o presente estudo 351 indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi*, pertencentes à coorte do INI/Fiocruz. Destes, 57 foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão pré-estabelecidos (ver abaixo), além de dois indivíduos cujas amostras de sangue apresentaram coágulos, impossibilitando posterior análises e três desistências. Um total de 87 indivíduos, soronegativos, compuseram o grupo controle. Destes, 26 foram incluídos para as análises de carga parasitária e genotipagem de *T. cruzi*, e 61 indivíduos participaram como controles da etapa seguinte de identificação de polimorfismos em genes de citocinas humanas. Sendo assim, a população de estudo compreendeu 294 pacientes crônicos com sorologia positiva, portadores de diferentes formas clínicas da DC, além de 87 indivíduos soronegativos, que participaram como voluntários para a formação do grupo controle. *Critérios de inclusão:* Pacientes com doença de Chagas crônica, com sorologia positiva em dois testes diferentes (imunofluorescência indireta e ensaio imuno-enzimático por ELISA), de ambos os sexos, com idades ≥ 18 anos. *Critérios de exclusão:* Pacientes que tenham sido tratados com benznidazol, portadores de co-infecções, de doença autoimune, doenças crônicas cujo tratamento requer o uso permanente de anti-inflamatórios ou imunossupressores, pacientes com câncer, gestantes e pacientes com doenças cardiovasculares associadas que dificultam a classificação da forma cardíaca da DC (**Figura 3.1**).

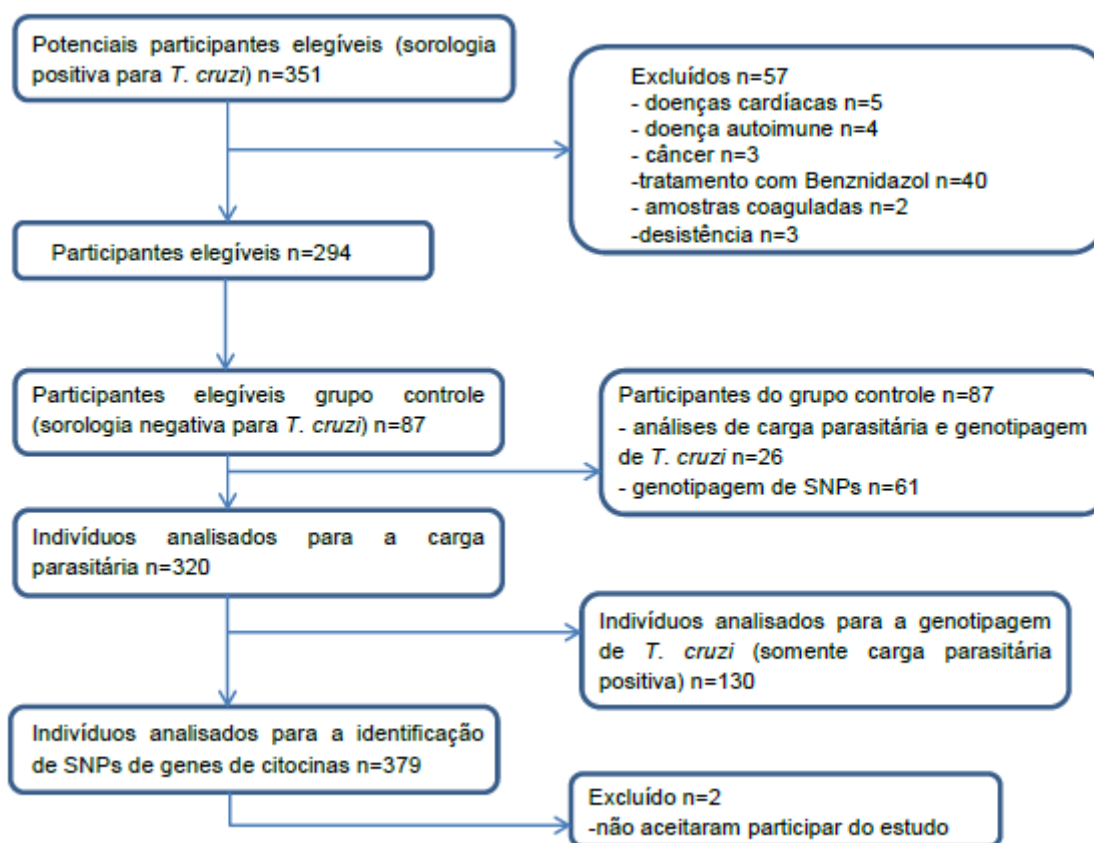


Figura 3.1: Diagrama de fluxo dos pacientes e controles envolvidos no estudo.

A mediana de idade foi 63 [69-56] anos, com o mínimo de 37 e máximo de 87 anos. Dos 294 pacientes analisados, 167 eram mulheres e 127 homens, sendo 47 mulheres e 37 homens com a forma indeterminada da doença, 84 mulheres e 75 homens portadores da forma cardíaca, 28 mulheres e 12 homens com a forma mista, e 8 mulheres e 3 homens portadores da forma digestiva da DC. Assim, do total de pacientes, 84 apresentaram a forma indeterminada da DC (28,6%); 159 eram portadores da forma cardíaca (54,1%) e foram classificados nos estágios A (n=65), B1 (n=48), B2 (n=10), C (n=31), D (n=5); 40 pacientes apresentaram a forma mista (cardíaca + digestiva) (13,6%) e 11 eram portadores da forma digestiva (3,7%). Participaram desse estudo pacientes oriundos de todas as regiões geográficas do Brasil, sendo, em sua maioria, provenientes da região nordeste (n=203), seguido da região sudeste (n=77), região sul (n=5), centro-oeste (n=4) e região norte (n=3); além da participação de um indivíduo procedente do Peru e outro

do Chile (**Tabela 3.1**). A distribuição dos pacientes quanto à classificação dos estágios de cardiomiopatia da DC está apresentada na **Tabela 3.2**.

Tabela 3.1: Características da população de estudo e manifestação clínica.

Dados gerais		Manifestação clínica			
		Indeterminada (%)	Cardíaca (%)	Mista (%)	Digestiva (%)
Idade, mediana [Q1-Q3]	63 [69 – 56]				
Sexo					
Mulher	167 (56,8%)	47 (56,0)	84 (52,8)	28 (70,0)	8 (72,2)
Homem	127 (43,2%)	37 (44,0)	75 (47,2)	12 (30,0)	3 (27,3)
Total	294	84 (28,6)	159 (54,1)	40 (13,6)	11 (3,7)
Naturalidade					
Norte	3 (1,0%)	2 (66,7)	1 (33,3)	-	-
Nordeste	203 (69,0%)	51 (25,1)	111 (54,7)	32 (15,8)	9 (4,4)
Centro Oeste	4 (1,4%)	1 (25,0)	3 (75,0)	-	-
Sudeste	77 (26,2%)	24 (31,2)	44 (57,1)	8 (10,4)	1 (1,3)
Sul	5 (1,7%)	5(100,0)	-	-	-
Outros países					
Peru	1 (0,3%)	-	-	-	1 (100,0)
Chile	1 (0,3%)	1 (100,0)	-	-	-

Tabela 3.2: Distribuição dos diferentes estágios de cardiomiopatia chagásica crônica.

Dados gerais	A(%)	B1(%)	B2(%)	C(%)	D(%)
Sexo					
Mulher (n=84)	41 (48,8)	24 (28,6)	3 (3,6)	12 (14,3)	4 (4,8)
Homem (n=75)	24 (32)	24 (32)	7 (9,3)	19 (25,3)	1 (1,3)
Total (n=159)	65 (40,9)	48 (30,2)	10 (6,3)	31 (19,5)	5 (3,1)
Naturalidade					
Norte (n=1)	-	-	-	1 (100,0)	-
Nordeste (n=111)	43 (38,7)	34 (30,6)	6 (5,4)	24 (21,6)	4 (3,6)
Centro Oeste (n=3)	-	2 (66,7)	-	1 (33,3)	-
Sudeste (n=44)	22 (50,0)	12 (27,3)	4 (9,1)	5 (11,4)	1 (2,27)
Sul (n=0)	-	-	-	-	-

3.3 Cultivo de células

Para a obtenção das formas epimastigotas de *T. cruzi* utilizadas para a construção da curva padrão nos ensaios de qPCR, bem como para gerar o painel de cepas/isolados de referência para genotipagem de *T. cruzi*, parasitos pertencentes às 6 DTUs - Dm28c (TcI), Y (TcII), INPA 3663 (TcIII), INPA 4167 (TcIV), LL014 (TcV) e CI Brener (TcVI), foram cultivados à 28 °C, em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino termodesativado. Na fase logarítmica de crescimento, as células foram recolhidas por centrifugação à 3500 rpm, por 10 min, à 4 °C, lavadas três vezes com PBS (Salina tamponada com fosfato) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) pH 7.4 e ressuspensas na mesma solução. O crescimento celular foi estimado por contagem de células em câmara de Neubauer, no microscópio Axio Vert.A1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.4 Extração de DNA a partir de amostras de sangue periférico e de cultura de parasitos

Um volume de 10 mL de sangue venoso foi coletado de cada indivíduo participante do estudo e imediatamente misturado ao mesmo volume de solução de lise Guanidina-HCl 6 M contendo EDTA 0,2 M pH 8,0 (*GEB: Guanidine/EDTA Blood*). As amostras GEB foram fervidas por 15 min a 100 °C, mantidas a temperatura ambiente por 48 a 72 h e posteriormente armazenadas a 4° C até o momento da extração de DNA para as análises moleculares (qPCR, PCR multilocus e HRM). O DNA foi extraído em colunas de sílica, a partir de 300 µL de GEB, utilizando o Kit "*High Pure PCR Template Preparation*" (Roche, Mannheim, Alemanha), seguindo o protocolo descrito por Duffy e colaboradores (2013). O material genômico foi dosado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Nanodrop™, Thermo Fisher Scientific, DE, EUA) e armazenado a -20 °C para posterior uso. Para a extração de DNA da massa celular do parasito, foi utilizado o mesmo protocolo descrito acima para GEB. O DNA foi extraído a partir da concentração de 10⁸-10⁶ parasitos/mL.

3.5 Quantificação da carga parasitária de *T. cruzi* por PCR em Tempo Real (qPCR)

A carga parasitária das amostras de sangue coletadas foi estimada através de ensaios de quantificação absoluta por qPCR, em sistema TaqMan, de acordo com Ramírez e colaboradores (2015). Foram realizados ensaios em multiplex com um alvo para o DNA nuclear satélite de *T. cruzi* (Cruzi1: 5'-ASTCGGCTGATCGTTTTCGA-3', Cruz12: 5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3, Cruz1 3: 6FAM-CACACACTGGACACCAA-MGB) e um alvo para o controle interno exógeno de amplificação (IAC Fw: 5'-ACCGTCATGGAACAGCACGTA-3', IAC Rv 5'-CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT-3', IAC Tq 5'-VIC-AGCATCTGTTCTTGAAGGT-NFQ-MGB-3'). O controle interno de amplificação (IAC) consiste em um plasmídeo pZErO-2 contendo um inserto do gene de aquaporina de *Arabidopsis thaliana*, que foi adicionado a cada amostra GEB antes da extração de DNA (5 µL de plasmídeo purificado, na concentração de 40 pg/µL). As reações ocorreram em um volume final de 20 µL contendo 5 µL de DNA (cerca de 10 ng/µL), 10 µL do tampão Taqman® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), os iniciadores Cruz1 e Cruz12 (750 nM) e sonda Cruz1 3 (FAM/NFQ-MGB - Applied Biosystems) (50 nM), os iniciadores IAC Fw e IAC Rv (100 nM) e sonda IAC Tq (VIC/NFQ-MGB - Applied Biosystems) (50 nM), e água ultra-pura para completar o volume final.

A curva padrão de quantificação contendo as amostras calibradoras foi construída a partir da contaminação artificial de GEB (de indivíduo soronegativo para *T. cruzi*) com epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y, TcII), seguido de diluições seriadas para obter as concentrações variando de 10^4 a 0,5 equivalentes de parasito/mL (Eq. par.). O DNA das amostras reconstituídas foi extraído de acordo com a metodologia descrita acima. Cada diluição correspondeu a um ponto da curva padrão para quantificação absoluta de *T. cruzi* nas amostras de sangue dos pacientes crônicos. A curva padrão foi incluída em todos os ensaios quantitativos, em duplicatas para cada ponto da curva. Todas as amostras foram quantificadas em duplicatas e em cada placa (corrida) foram incluídas duas concentrações de controle positivo (1 fg/µL e 10 fg/µL DNA de *T. cruzi* cepa Y) e controle negativo (NTC: *Negative Template Control* da reação de qPCR – 5 µL de água ultrapura ao invés de DNA).

As reações de qPCR foram processadas em equipamento ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), da plataforma PDTIS/Fiocruz de PCR em Tempo Real RPT-09A, com a seguinte programação: atividade inicial da enzima

amperase (5 min, 50 °C), desnaturação inicial/ativação AmpliTaq Gold DNA Polimerase (10 min, 95 °C), 40 ciclos de desnaturação (15s, 95 °C) e anelamento/extensão (1 min, 58 °C).

Os dados da qPCR foram expressos como médias aritméticas ou mediana \pm desvio padrão. Foram utilizados os testes Mann–Whitney Rank Sum ou One-way ANOVA, admitindo-se um índice de significância de 5%. Todas as análises foram conduzidas com o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

3.6 Genotipagem de *T. cruzi* em amostras de sangue periférico

A caracterização molecular do *T. cruzi* em DTUs de I a VI foi realizada seguindo a metodologia descrita por Moreira & Ramirez (2019), baseada em reações de PCR convencional multilocus. A identificação subsequente dos genótipos se baseia no conjunto dos perfis dos produtos de PCR apresentados para cada alvo, utilizando os seguintes marcadores moleculares (**Figura 3.2**): (i) Região intergênica ac do gene de *Spliced Leader*, utilizando os iniciadores uTCC e TCac, diferenciando TcI (150 pb), TcII, V e VI (157 pb) e TcIII e IV (200 pb); (ii) Região intergênica I e II do gene de *Spliced Leader* utilizando os iniciadores TCC, TC1 e TC2 (descrito por Souto e cols., 1996; adaptado por Marcet e cols., 2006), diferenciando TcI (350 pb), TcII, V e VI (300 pb) e Tc III e IV (ausência de amplificação); (iii) Domínio variável D7 do gene da subunidade 24S α do RNA ribossomal, utilizando os iniciadores D75, D76 e D71 em *semi-nested* PCR, para distinguir TcII e VI (140 pb), TcIII (125 pb), TcIV (140/145 pb) e TcV (125 ou 125+140 pb) (Brisse *et al.*, 2000a); (iv) Região do fragmento nuclear A10 utilizando, em *semi-nested*, os iniciadores Pr1, P6 e Pr3 (Brisse *et al.*, 2000b) para diferenciar TcII (690/580 pb) e TcVI (630/525 pb). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 μ L, contendo 12,5 μ L de Master mix Go Taq Green 2X (Promega, Madison, EUA), 5 μ L de DNA, além dos iniciadores descritos para cada alvo (**Tabela 3.3**), obedecendo as mesmas concentrações e ciclagem de PCR previamente estabelecidas (Moreira & Ramirez 2019). As reações foram processadas no equipamento modelo GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies, Califórnia, USA).

Os isolados de referência utilizados como controles positivos nas reações foram: Dm28c (TcI), Y (TcII), INPA 3663 (TcIII), INPA 4167 (TcIV), LL014 (TcV) e CL Brener (TcVI), provenientes da Coleção de Protozoários do Instituto Oswaldo Cruz

(COLPROT); além de controle negativo (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA).

Após cada ensaio de PCR, 12 µL dos produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 2-3% (dependendo do tamanho do produto a ser observado), imerso em tampão TBE 1X (Trizma base a 89 mM, Ácido Bórico a 88 mM e EDTA a 2 mM, pH 8,0) e corado com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, CA, USA) [0,1X]. A eletroforese foi realizada por cerca de 10 min a 80V (até todo o conteúdo amostral sair do poço de aplicação), seguida de 80 min a 1h20 min, a 90V. O tamanho dos produtos da PCR foi determinado em comparação ao marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder - Invitrogen, Califórnia, EUA) incluído nos géis. Os fragmentos amplificados foram visualizados por transiluminação em luz UV e registrados digitalmente pelo sistema de fotodocumentação de imagens em gel – UVP Bioimaging Systems (Upland, Califórnia, EUA).

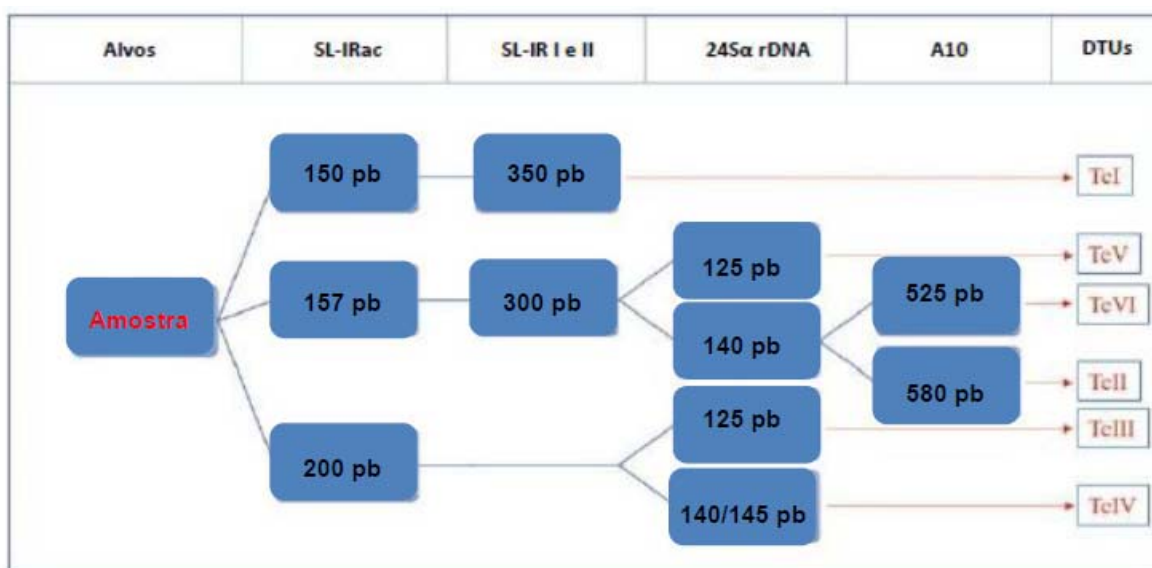


Figura 3.2: Fluxograma para genotipagem de *T. cruzi* diretamente de amostras clínicas. A figura mostra os tamanhos dos amplicons esperados para cada alvo da PCR (indicado no topo), em pares de bases (pb). SL-IRac: região Ac do gene *spliced leader*, SL-IR I e II: regiões do gene *spliced leader*, 24Sα rDNA: domínio divergente D7 do gene 24Sα, A10: fragmento nuclear A10.

Fonte: Adaptado de Moreira & Ramirez 2019.

Tabela 3.3: Sequência dos oligonucleotídeos para a genotipagem de *T. cruzi*.

Alvos	Primers	Sequencia (5' – 3')
SL-IRac	UTCC	CGT ACC AAT ATA GTA CAG AAA CTG
	TCac	CTC CCC AGT GTG GCC TGG G
SL-IR I e II	TCC	CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG
	TC1	GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG GCC
	TC2	CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G
24Sα rDNA	D71	AAG GTG CGT CGA CAG TGT TGG
	D75	GCA GAT CTT GGT TGG CGT AG
	D76	GGT TCT CTG TTG CCC CTT TT
A10	Pr1	CCG CTA AGC AGT TCT GTC CAT A
	Pr3M	CGT GGC ATG GGG TAA TAA AGC A
	P6	GTG ATC GCA GGA AAC GTG A

Legenda: *SL-IRac*: região Ac do gene *spliced leader*, *SL-IR I e II*: regiões do gene *spliced leader*, *24Sα rDNA*: domínio divergente D7 do gene *24Sα*, *A10*: fragmento nuclear A10.

3.7 Genotipagem de SNPs por HRM (High Resolution Melting)

Os pares de iniciadores que foram usados para as regiões de SNPs dos genes de *TNFA* (-1031T/C, rs1799964), *IL18* (-1297T/C, rs360719 e rs2043055A/G/T), *IL4* (-509C/T, rs2243250), *IL1B* (-511A/G, rs16944), *IL1RN* (+11100T/C/A, rs315952), *IL12B* (+1188A/C, rs3212227), *IFNG* (+874T/A, rs2430561), *MIF* (-173G/C, rs755622), *IL17A* (G197A/G, rs2275913) e *IL17F* (T7488C/T, rs763780), foram desenhados pelo nosso grupo utilizando o *software* Primer Express version 3.0 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), de forma a amplificarem regiões pequenas, com tamanhos abaixo de 70 pb, flanqueando cada SNP a ser estudado. Para alguns SNPs utilizamos iniciadores já descritos, a seguir: *IL10* (-1082G/A, rs1800896), retirado de Chagas *et al.* (2013), *TNFA* (-308G/A, rs1800629 e -238G/A, rs361525) que foram publicados por You *et al.* (2013) e *TGFβ1* (códon 10 ou +869T/C/G, rs1800470) visto por Panek *et al.* (2014). O conjunto das sequências de iniciadores utilizados no presente estudo e os respectivos tamanhos de produtos gerados estão descritos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Sequências dos oligonucleotídeos e tamanhos dos produtos gerados da amplificação dos 15 SNPs em genes de citocinas humanos avaliados por HRM.

Genes	Alvos	Sequências dos oligonucleotídeos	Tamanho do produto (pb)	Referências
IL10	SNP -1082G/A, rs1800896	Fw: 5'-GAC AAC ACT ACT AAG GCT TCT TTG G-3' Rv: 5'-AGA TGG GGT GGA AGA AGT TG-3'	131	Chagas <i>et al.</i> (2013)
	SNP -1031T/C, rs1799964	Fw: 5'-GGA AGC AAA GGA GAA GCT GAG A-3' Rv: 5'-CCC TCC AGA CCC TGA CTT TTC C -3'	50	Presente trabalho
TNFA1	SNP -238G/A, rs361525	Fw: 5'-GGG TCC TAC ACA CAA ATC AGT CAG T-3' Rv: 5'-CCC CTC ACA CTC CCC ATC C-3'	79	You <i>et al.</i> (2013)
	SNP -308G/A, rs1800629	Fw: 5'-CCC CAA AAG AAA TGG AGG CAA TAG G-3' Rv: 5'-GTA GGA CCC TGG AGG CTG AAC-3'	68	You <i>et al.</i> (2013)
IL18	SNP -1297T/C, rs360719	Fw: 5'-CTA CTT GAT CCC ACT TCG TGC TTT C-3' Rv: 5'-TTC ACC TTC CAA CTG TAG AGT CCA-3'	66	Presente trabalho
	SNP rs2043055A/G/T	Fw: 5'-CTT ACA ATT CTT CTT GTT AGT TCT C-3' Rv: 5'-CAC TAC TTG TAA TCA GTC ATA GAT G-3'	54	Presente trabalho
IL4	SNP -509C/T, rs2243250	Fw: 5'-CAC CTA AAC TTG GGA GAA CAT TG-3' Rv: 5'-CTC TCC TAC CCC AGC ACT-3'	47	Presente trabalho
TGFB1	SNP códon 10 ou +869T/C/G, rs1800470	Fw: 5'-CTG TTC GCG CTC TCG GCA G-3' Rv: 5'-CCA GTA GCC ACA GCA GCG G-3'	100	Panek <i>et al.</i> (2014)
IL1B	SNP -511A/G, rs16944	Fw: 5'-TAC CTT GGG TGC TGT TCT CTG-3'	50	Presente trabalho

		Rv: 5'-CTC CTG CAA TTG ACA GAG AGC T-3'		
IL1RN	SNP +11100T/C/A, rs315952	Fw: 5'-TTC GCC TTC ATC CGC TCA GAC-3' Rv: 5'-AGA CTC AAA ACT GGT GGT GGG-3'	48	Presente trabalho
IL12B	SNP +1188A/C, rs3212227	Fw: 5'-ATA TCT TTG CTG TAT TTG TAT AGT-3' Rv: 5'-ATT GTT TCA ATG AGC ATT TAG CA-3'	51	Presente trabalho
IFNGF	SNP +874T/A, rs2430561	Fw: 5'-CAA ACA TGT GCG AGT GTG TG-3' Rv: 5'- ATT TTA TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA T-3'	64	Presente trabalho
MIF	SNP -173G/C, rs755622	Fw: 5'-TAA GCC CGG CGC ACC GCT C-3' Rv: 5'-ATT TCT AGC CGC CAA GTG GAG AA-3'	49	Presente trabalho
IL17A	SNP G197A/G, rs2275913	Fw: 5'-CCC TTC CCA TTT TCC TTC AGA A-3' Rv: 5'-CCC CCA ATG AGG TCA TAG AAG AAT-3'	52	Presente trabalho
IL17F	SNP T7488C/T, rs763780	Fw: 5'-GAT ATG CAC CTC TTA CTG CAC-3' Rv: 5'-CTG CGT CAC CCC TGT CAT-3'	46	Presente trabalho

Legenda: pb- pares de bases; F-*forward*; R-*reverse*.

As reações de HRM foram realizadas em volume final de 10 μ L, contendo 5 μ L de mastermix HRM MeltDoctor [2X] (Life Technologies) e 1 ng/ μ L de DNA de cada paciente (2 μ L por reação). Diferentes concentrações de *primers* foram testadas, assim como, as condições de ciclagem, que foram padronizadas de acordo com as temperaturas de anelamento ótimas para cada conjunto de *primer* (dependente do T_m dos oligonucleotídeos). Para isso, foram realizados ensaios de HRM testando três temperaturas de anelamento (58 °C, 60 °C e 62 °C) e três concentrações de oligonucleotídeos (100/100 nM, 200/200 nM e 300/300 nM) para cada alvo estudado, utilizando a seguinte programação para a amplificação dos alvos: desnaturação inicial (10 min, 95 °C), 40 ciclos de desnaturação (15 s, 95 °C) e anelamento (1 min, temperatura variando de acordo com o teste). Após a amplificação dos produtos, as análises das curvas de dissociação de alta resolução foram realizadas através do decaimento da fluorescência, concomitante ao aumento da temperatura final do anelamento para 95 °C por 10 s (usando incrementos de 1,6 °C/s), de 95 °C para 60 °C por 1 min (com incrementos de 1,6 °C/s), para 95 °C por 15 s (incrementos de 0,025 °C/s) e para 60 °C por 15 s (com incrementos de 1,6 °C/s). As curvas de dissociação em alta resolução foram realizadas e analisadas no módulo do HRM do software ViiA7 RUO (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), pelo software Quantstudio™ Real-Time PCR v1.3 (Applied Biosystems) da Plataforma Fiocruz de PCR em Tempo Real RPT09A.

3.8 Sequenciamento de DNA

3.8.1. Obtenção das referências para HRM: padronização por PCR Gradiente

Para a obtenção dos controles, que foram usados como referências nos ensaios de HRM, foram desenhados novos pares de iniciadores, de forma a amplificarem uma região de cerca de 300 pb, flanqueado a região do SNP para cada alvo (**Tabela 3.5**). Foram realizados ensaios de PCR gradiente convencional, processados no equipamento Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), variando as temperaturas de anelamento (58 °C; 60 °C; 61,5 °C; 63 °C; 64,5 °C e 66 °C), bem como as concentrações dos oligonucleotídeos (500/500 nM e 600/600 nM). As reações ocorreram em um volume final de 30 μ L contendo 3 μ L de DNA (1 ng/ μ L), 15 μ L de Master mix Go Taq Green 2X (Promega) e água ultra-pura para completar o volume final. As reações de PCR gradiente foram realizadas com a seguinte

programação: desnaturação inicial/ativação da Go Taq DNA Polimerase (10 min, 94 °C), 30 ciclos de desnaturação (30 s, 96 °C), anelamento (30 s, gradiente de temperaturas) e extensão (45 s, 72 °C), seguido da extensão final (10 min, 72 °C).

Tabela 3.5: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a construção dos controles/referências e seus respectivos tamanhos de produtos gerados por PCR convencional.

Genes	Alvos	Sequências dos oligonucleotídeos	Tamanho do produto (pb)
IL10	SNP -1082G/A rs1800896	F: 5'-GAA GAA GTC CTG ATG TCA CTG-3' R: 5'-CTT CTG TGG CTG GAG TCT AA-3'	297
	SNP -1031T/C rs1799964	F: 5'-AGA ACT TCC CAG TCT ATC TAA GG-3' R: 5'-TAG CCC TGG ACA TTC TCC T-3'	317
TNFA	SNP -238G/A rs361525	F: 5'-CAT CCT GTC TGG AAG TTA G-3' R: 5'-TTC AAC CAG CGG AAA AC-3'	328
	SNP -308G/A rs1800629	F: 5'-TTT TCT CTC CCT CAA GGA CTC-3' R: 5'-TGT CTC GGT TTC TTC TCC AT-3'	315
IL18	SNP -1297T/C, rs360719	F: 5'-CTG AGA CAT TTG TTG CTC TAT ATC-3' R: 5'-CCT TCA ACA GTG ATT ACA AAG G-3'	362
	SNP rs2043055A/G/T)	F: 5'-AGC CAA TGA GAA GGA GG-3' R: 5'-CAGT AGT CTG AGA ATT TTA GAT G-3'	344
IL4	SNP -509C/T, rs2243250	F: 5'-AAA AGT CAT TCC TGA AAC-3' R: 5'-GGA AAG ATA GAG TAA TAT CAA-3'	320
TGFB1	SNP códon 10 ou +869T/C/G, rs1800470	F: 5'-GGA CCT CAG CTT TCC CTC G-3' R: 5'-CCG CAG CTT GGA CAG GAT-3'	304
IL1B	SNP -511A/G, rs16944	F: 5'-TTG AGG GTG TGG GTC TCT A-3' R: 5'-CATC CAT GAG ATT GGC TAG G-3'	218
IL1RN	SNP +11100T/C/A, rs315952	F: 5'-ATT TCA TGG CGT GGA GTG G-3' R: 5'-GCA AGA ATG GGA ACA GGC A-3'	330
IL12B	SNP +1188A/C, rs3212227	F: 5'-GGC ATT CTC TTC CAG GTT CT-3'	337

		R: 5'-GAA ACA TTC CAT ACA TCC TGG C-3'	
MIF	SNP -173G/C, rs755622	F: 5'-CCG CCT TTT GTG ACG CCA-3'	346
		R: 5'-GAA CTG GGC TTC ATC TCT GGA AG-3'	
IL17A	SNP G197A/G, rs2275913	F: 5'-CAT AAC TCT TCT GGC AGC-3'	314
		R: 5'-TTG TGC CTG CTA TGA GAT-3'	
IL17F	SNP T7488C/T, rs763780	F: 5'-GTA CAA GCT GGG AAT GCA A-3'	355
		R: 5'-CCA GTT GGA GAA GGT GC-3'	

Legenda: pb- pares de bases; F-*forward*; R-*reverse*.

Ao término da padronização das temperaturas de anelamento para cada conjunto de *primers* pela PCR gradiente convencional, foram realizados ensaios de PCR convencional, seguindo as condições estabelecidas para cada alvo, utilizando por alvo, 5 amostras de pacientes, para posterior sequenciamento visando a validação/obtenção de controles para os ensaios de HRM.

Os produtos obtidos foram purificados utilizando o kit Wizard SV PCR Cleanup System kit (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A reação de sequenciamento pelo método de Sanger (Sanger *et al.*, 1975) foi realizada para ambas as fitas, senso e antisenso, de cada amplicon, com o uso do kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), e os mesmos iniciadores usados na PCR. As corridas foram realizadas no equipamento ABI 3730XL (Applied Biosystem) na Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA RPT01A - PDTIS/Fiocruz. As sequências obtidas foram confirmadas através do programa BLASTN, confrontando-as com as sequências depositadas no GeneBank.

3.9 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas dos dados obtidos da carga parasitária e genotipagem molecular de *T. cruzi*, foram utilizados o Teste t ou Mann–Whitney Rank Sum (entre 2 grupos) e o One Way ANOVA (3 grupos ou mais). As análises foram feitas pelo programa SigmaPlot v14.0 (Systat Software, Inc). Os gráficos foram gerados utilizando o programa GraphPad Prism versão 9.

O equilíbrio de Hardy–Weinberg (EHW) foi determinado comparando o número de genótipos diferentes observados com o número esperado sob EHW para a frequência alélica estimada. Para tanto, os cálculos de EHW foram conduzidos

usando testes de qui-quadrado feitos pelo MS Excel 365 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). O teste de Qui-quadrado foi utilizado para comparar as possíveis divergências entre as frequências observadas e as esperadas para os SNP de *TNFA* (-308G/A rs1800629) e de *IL10* (-1082G/A rs1800896) em estudo. A análise de variâncias (ANOVA) foi aplicada para testar a homogeneidade de médias variáveis quantitativas (sexo, idade, genótipo de *T. cruzi* –DTU e formas da DC) e para testar o modelo linear de regressão (analisando as mesmas variáveis). Foi realizada a Regressão Logística Binomial, em toda população, para avaliar a relação entre a probabilidade de um indivíduo desenvolver a DC e as principais co-variáveis (sexo, idade, SNP de *TNFA* -308G/A rs1800629 e de *IL10* SNP -1082G/A rs1800896).

4. Resultados

4.1 Estratificação da coorte do INI/Fiocruz quanto à idade, sexo e formas clínicas

Como já informado na seção Materiais & Métodos, a população de estudo compreendeu 294 pacientes. Em relação ao sexo e idade, os pacientes portadores de diferentes formas clínicas da DC foram agrupados em faixas etárias: 35-54 anos, 55-74 anos, ≥ 75 anos (**Figuras 4.1 e 4.2 e Tabelas 4.1 e 4.2**). Para aumentar o poder das análises estatísticas, os pacientes com a forma cardíaca classificados nos estágios B1 e B2 foram analisados conjuntamente em um único grupo (B1+B2), bem como os pacientes nos estágios C e D (formando o grupo C+D). No grupo de 35-54 anos, 14 (46,7%) pacientes mulheres apresentaram a forma indeterminada, 11 (36,7%) apresentaram a forma cardíaca da DC com a seguinte distribuição [9 (81,8%) no estágio A, 1 (9,1%) nos estágios B1+B2 e 1 (9,1%) nos estágios C+D], 3 (10,0%) mulheres apresentaram a forma mista e 2 (6,7%) a forma digestiva. No mesmo grupo etário, 11 (35,5%) pacientes homens apresentaram a forma indeterminada, 17 (54,8%) a forma cardíaca com a seguinte distribuição [2 (11,8%) homens no estágio A, 8 (47,1%) nos estágios B1+B2 e 7 (41,2%) nos estágios C+D], 2 (6,5%) homens apresentaram a forma mista e 1 (3,2%) apresentou a forma digestiva. Considerando o grupo de 55-74 anos, 32 (26,0%) mulheres apresentaram a forma indeterminada, 64 (52,0%) a forma cardíaca [27 (42,2%) no estágio A, 26 (40,6%) nos estágios B1+B2 e 11 (17,2%) nos estágios C+D], 21 (17,1%) apresentaram a forma mista e 6 (4,9%) a forma digestiva. Considerando os pacientes do sexo masculino que compõem este mesmo grupo, 24 (28,2%) apresentaram a forma indeterminada, 53 (62,4%) a forma cardíaca [18 (34,0%) classificados no estágio A, 23 (43,4%) nos estágios B1+B2 e 12 (22,6%) nos estágios C+D], além de 6 (7,1%) apresentarem a forma mista e 2 (2,4%) a forma digestiva. Por fim, no grupo com pacientes ≥ 75 anos, 1 (7,1%) mulher apresentou a forma indeterminada, 9 (64,3%) apresentaram a forma cardíaca [4 (44,4%) no estágio A, 1 (11,1%) nos estágios B1+B2 e 4 (44,4%) nos estágios C+D], 4 (28,6%) apresentaram a forma mista e nenhuma a forma digestiva. Avaliando os pacientes homens deste grupo, 2 (18,2%) apresentaram a forma indeterminada, 5 (45,5%) a forma cardíaca [4 (80,0%) no estágio A, nenhum para os estágios B1+B2 e 1 (20,0%) para os estágios C+D], 4 (36,4%) apresentaram a forma mista e nenhum a

forma digestiva. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos comparando as variáveis sexo e formas clínicas da DC, bem como sexo e estágios da DC cardíaca ($p=0,0577$ e $p=0,0240$, respectivamente).

Tabela 4.1: Apresentação numérica das formas clínicas de acordo com o sexo e faixa etária dos pacientes com doença de Chagas crônica pertencentes à coorte do INI.

Formas clínicas da doença de Chagas					
Faixa etária (gênero)	Indeterminada	Cardíaca	Mista	Digestiva	Total (indivíduos)
35-54 anos					
Mulher	14	11	3	2	30
Homem	11	17	2	1	31
55-74 anos					
Mulher	32	64	21	6	123
Homem	24	53	6	2	85
≥75 anos					
Mulher	1	9	4	0	14
Homem	2	5	4	0	11
Total (indivíduos)	84	159	40	11	294

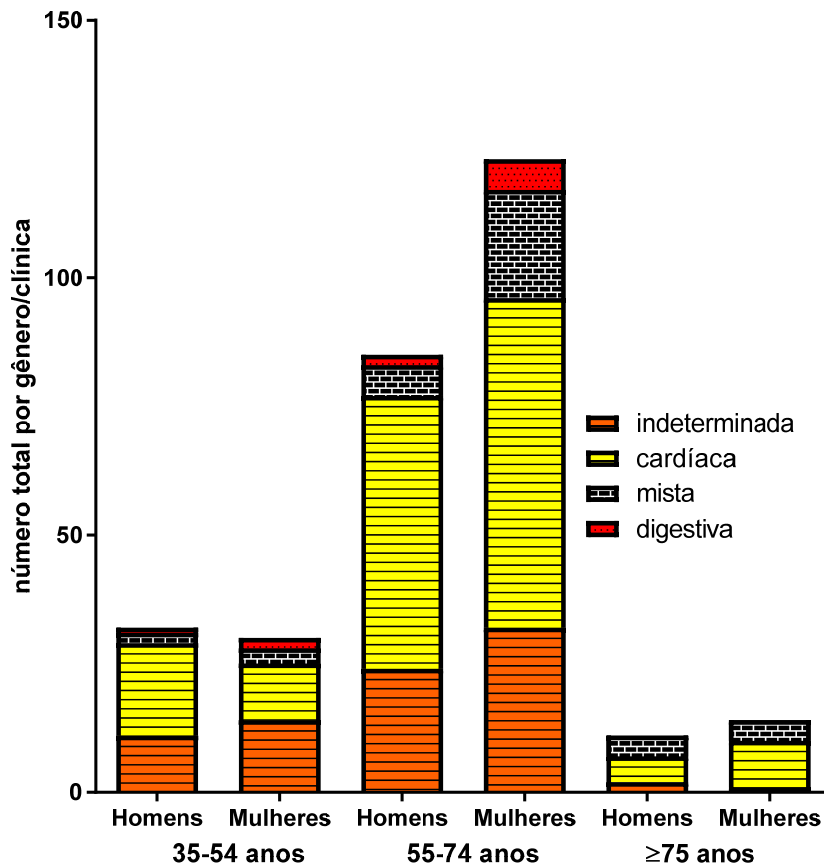


Figura 4.1: Distribuição das formas clínicas de acordo com o sexo e faixa etária dos pacientes com doença de Chagas crônica pertencentes à coorte do INI. Análise estatística foi realizada utilizando o teste χ^2 ($p=0,0577$). Comparação entre os grupos por sexo e faixa etária.

Tabela 4.2: Dados numéricos dos diferentes estágios da forma clínica cardíaca de acordo com o sexo e faixa etária dos pacientes com doença de Chagas crônica pertencentes à coorte do INI.

Estágios da forma cardíaca				
Faixa etária (gênero)	Estágio A	Estágios B1+B2	Estágios C+D	Total (indivíduos)
35-54 anos				
Mulher	9	1	1	11
Homem	2	8	7	17
55-74 anos				
Mulher	27	26	11	64
Homem	18	23	12	53
≥75 anos				
Mulher	4	1	4	9
Homem	4	0	1	5
Total (indivíduos)	64	59	36	159

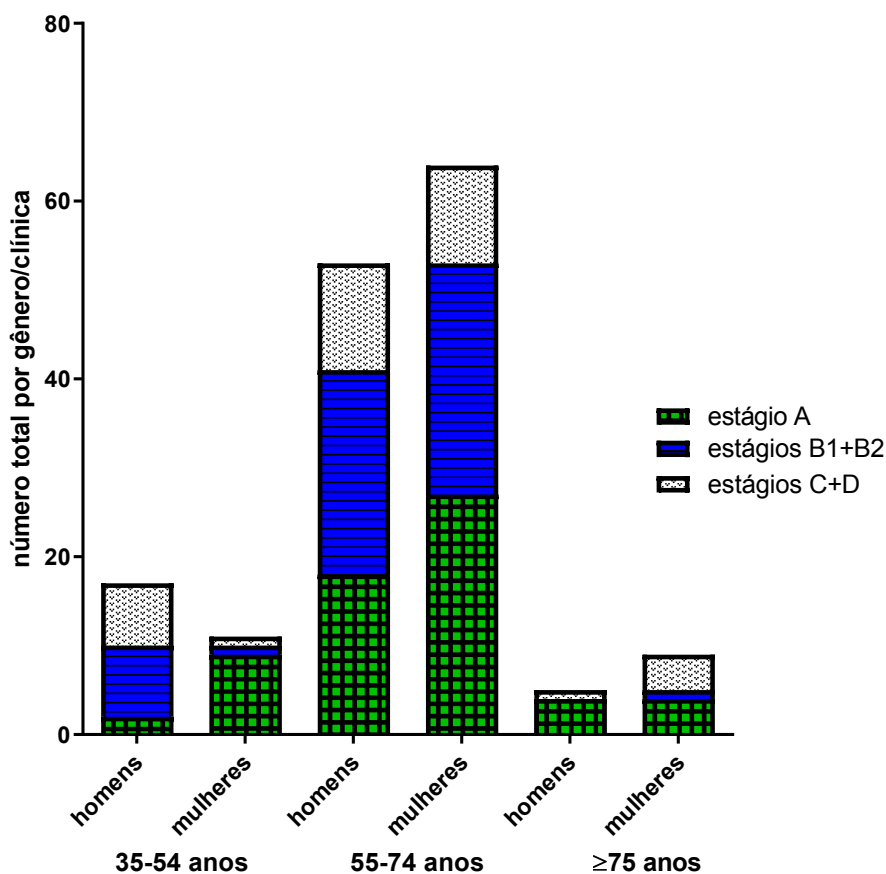


Figura 4.2: Distribuição dos diferentes estágios da forma clínica cardíaca de acordo com o sexo e faixa etária dos pacientes com doença de Chagas crônica pertencentes à coorte do INI. Análise estatística foi realizada utilizando o teste χ^2 Comparação do sexo e diferentes estágios da forma clínica cardíaca ($p=0,240$).

4.2 Medida da carga parasitária de *T. cruzi* por PCR em Tempo Real (qPCR)

A estimativa da carga parasitária de *T. cruzi* em sangue foi realizada em 294 pacientes, além de 26 indivíduos que compuseram o grupo controle. Entre os 294 pacientes avaliados, 130 (44,2%) foram positivos para *T. cruzi*; todos os 26 participantes do grupo controle tiveram confirmada a ausência de parasitos no sangue pela qPCR. A carga parasitária de *T. cruzi* variou entre $0,002 \pm 0,001$ a $72,21 \pm 8,26$ eq. parasitos/mL, com mediana de $0,390 [0,0700 - 2,050]$ eq. de parasitos/mL (**Figura 4.3**).

A distribuição da carga parasitária em função da forma clínica dos 130 pacientes com DC crônica está descrita a seguir. Para os 32 pacientes com a forma indeterminada, foi observada uma mediana de $0,580 [0,110 - 2,260]$ eq. de parasitos/mL; nos 74 pacientes com a forma cardíaca a mediana foi de $0,410 [0,0500 - 2,075]$ eq. de parasitos/mL; nos 18 pacientes com a forma mista foi observada uma mediana de $0,155 [0,0500 - 0,535]$ eq. de parasitos/mL, e a mediana dos 6 pacientes com a forma digestiva foi de $0,630 [0,0650 - 1,585]$ eq. de parasitos/mL (**Figura 4.4**). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos analisados ($p= 0,9204$).

As medianas de carga parasitária dos pacientes portadores da DC cardíaca, em relação à classificação destes, quanto aos diferentes níveis de severidade da doença, foram: de $0,415 [0,0475 - 3,202]$ eq. de parasitos/mL para os 34 pacientes no estágio A; $0,410 [0,0500 - 1,030]$ eq. de parasitos/mL para os 23 pacientes nos estágios B1+B2; e de $0,420 [0,0350 - 1,025]$ eq. de parasitos/mL para os 17 indivíduos nos estágios C+D (**Figura 4.5**). Apesar das variações nas cargas parasitárias observadas entre todos os grupos analisados, não houve diferença estatística significativa ($p=0,8903$).

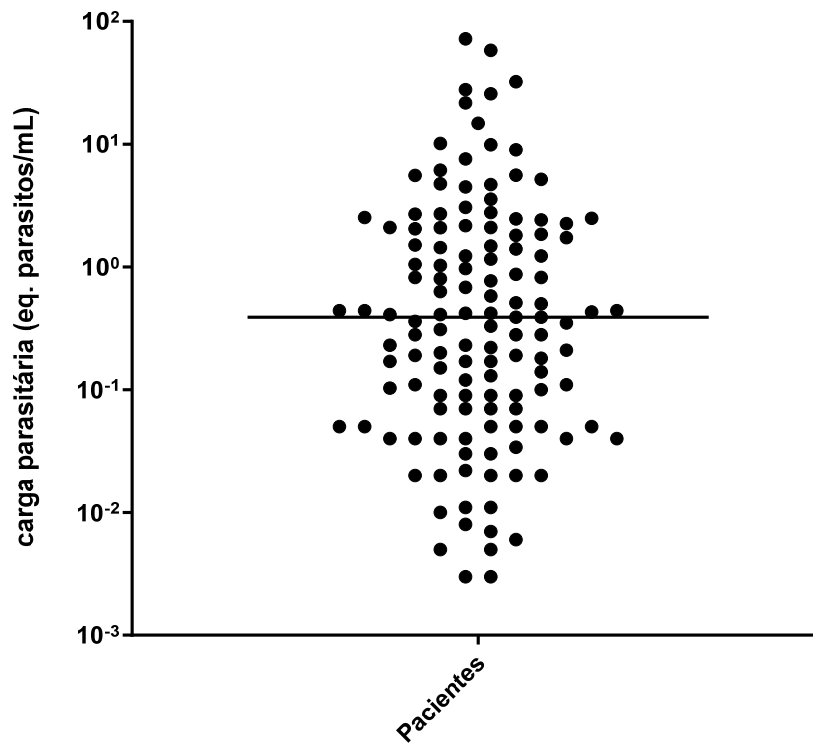


Figura 4.3: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos 130 pacientes com DC crônica que foram positivos pela qPCR, pertencentes à coorte do INI. A linha horizontal representa o valor da mediana das cargas parasitárias.

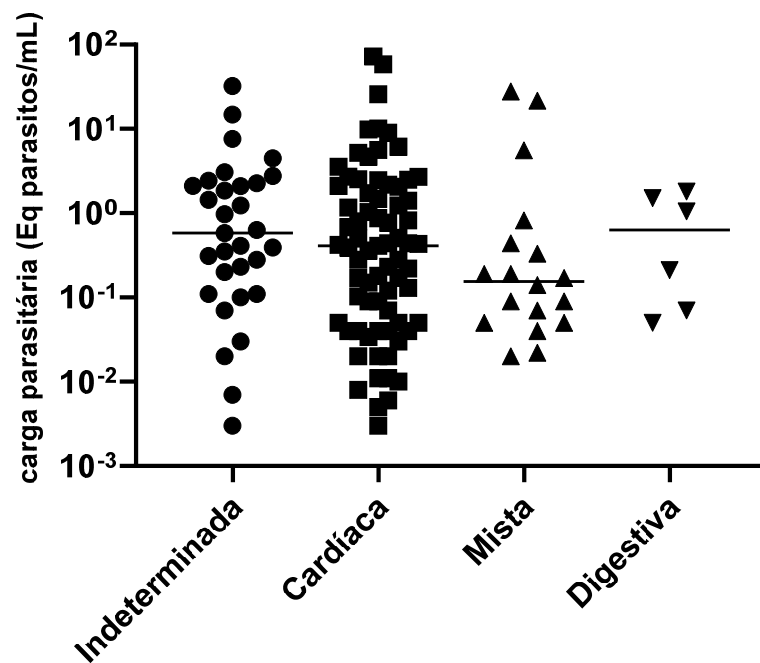


Figura 4.4: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos 130 pacientes pertencentes à coorte do INI, em função das diferentes formas clínicas da

doença de Chagas crônica. As linhas horizontais representam os valores das medianas das cargas parasitárias. Análise estatística foi realizada utilizando o teste One way ANOVA ($p=0,9204$). Comparação entre as formas da DC.

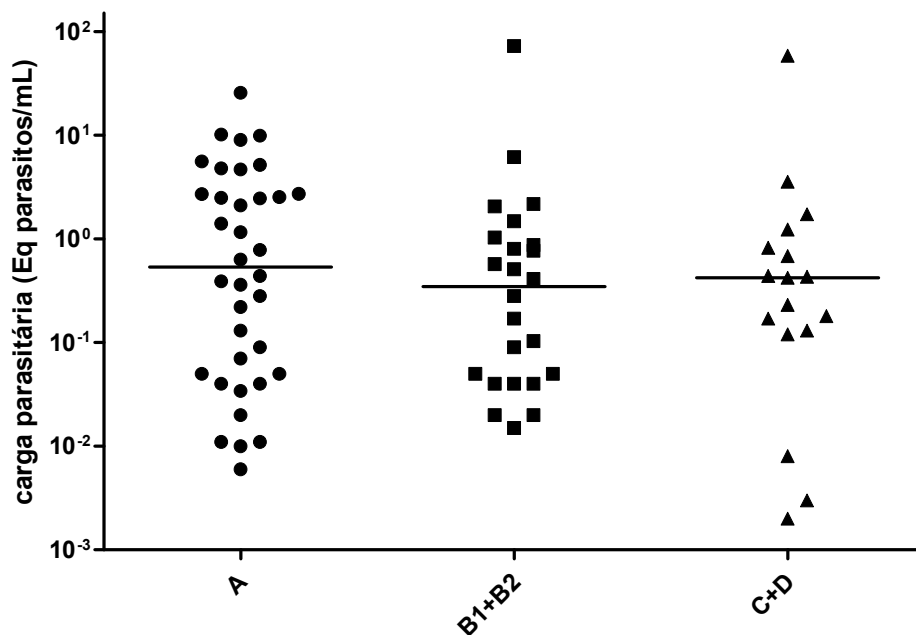


Figura 4.5: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos pacientes com diferentes níveis de severidade da cardiomiopatia chagásica, pertencentes à coorte do INI. As linhas horizontais representam os valores das medianas das cargas parasitárias. Análise estatística foi realizada utilizando o teste One way ANOVA ($p=0,8903$). Comparação entre os estágios da CCC.

Dos 130 pacientes positivos para a presença de *T. cruzi* no sangue, foi possível estimar a carga parasitária em 80 mulheres e 50 homens. Os valores de mediana observados foram de 0,435 [0,0700 – 2,100] e 0,330 [0,0575 – 1,487], respectivamente (**Figura 4.6**). A partir da estratificação desses pacientes por faixa etária e sexo, foram encontrados no grupo de 34-54 anos, valores das medianas das cargas parasitárias de mulheres e de homens iguais a 0,140 [0,0600 - 0,625] e 0,405 [0,198 - 1,440] eq. parasitos/mL, respectivamente. Considerando o grupo de 55-74 anos, os valores das medianas das cargas parasitárias de mulheres e de homens foram de 0,630 [0,0700 - 2,440] e 0,230 [0,0400 - 1,480] eq. parasitos/mL, respectivamente. Para o grupo ≥ 75 anos, o valor da mediana da carga parasitária para as mulheres foi de 0,210 [0,0625 - 6,720] eq. parasitos/mL e para os homens foi de 0,0700 [0,0150 - 9,870] eq. parasitos/mL (**Figura 4.7**). Não houve diferença

estatística significativa entre os grupos comparados ($p=0,1884$). Ao comparar os grupos por faixa etária, independente do sexo, foi observado que para o grupo de 35-54 anos o valor da mediana da carga parasitária foi de 0,310 [0,0950 - 1,025] eq. parasitos/mL, para o grupo de 55-74 anos, o valor da mediana foi de 0,440 [0,0525 - 2,153] eq. parasitos/mL e no grupo ≥ 75 anos, a mediana foi 0,310 [0,0950 - 1,025] eq. parasitos/mL. Não houve diferença estatística significativa ao comparar os três grupos, independente do sexo dos pacientes ($p= 0,432$).

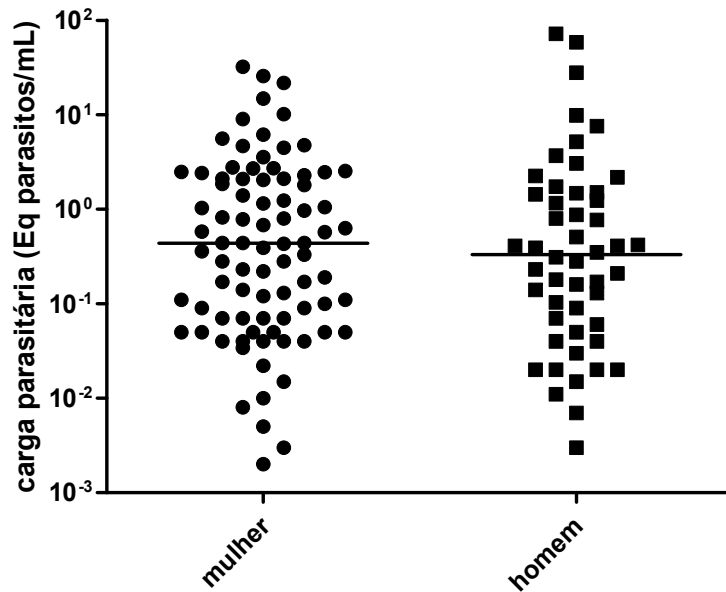


Figura 4.6: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos pacientes pertencentes à coorte do INI de acordo com o gênero. As linhas horizontais representam os valores das medianas das cargas parasitárias. Análise estatística foi realizada utilizando o teste χ^2 ($p= 0,1825$) Comparação entre o sexo dos pacientes.

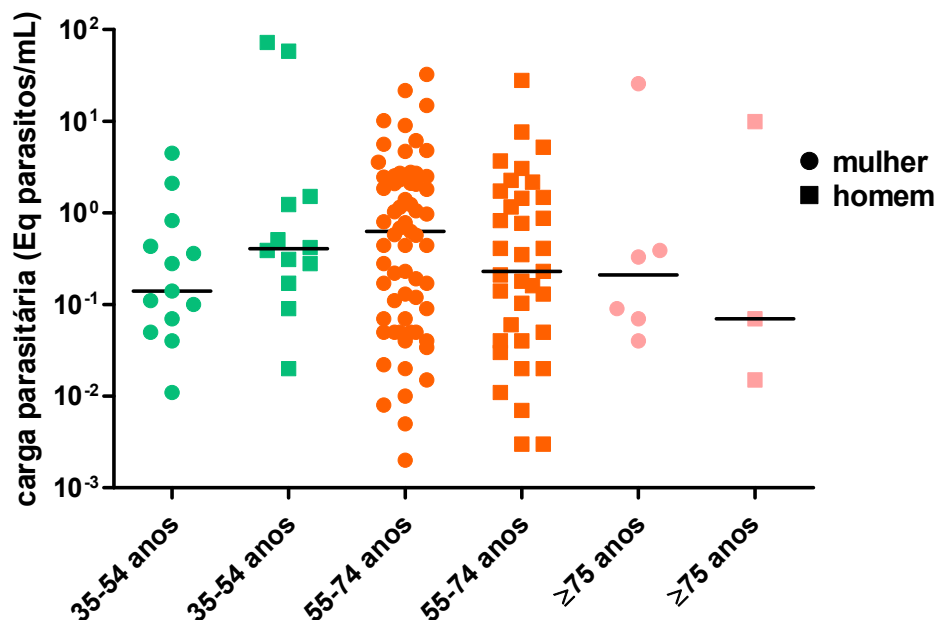


Figura 4.7: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos pacientes pertencentes à coorte do INI de acordo com o gênero e faixa etária. As linhas horizontais representam os valores das medianas das cargas parasitárias.

Análise estatística foi realizada utilizando o teste χ^2 ($p= 0,432$) Comparação entre o sexo e faixa etária dos pacientes.

4.3 Genotipagem molecular de *T. cruzi*

Foi possível identificar o genótipo de *T. cruzi* em todas as 130 amostras positivas por qPCR (Anexo 4). A distinção dos genótipos do parasito foi realizada a partir dos perfis dos tamanhos dos fragmentos amplificados para cada alvo de PCR, visualizados em géis de agarose corados com GelRed™ (Biotium, Inc) (**Figura 4.8**). Os genótipos mais frequentes relacionados à infecção única foram TcII e TcVI, correspondendo a 39,2% e 38,5% das amostras genotipadas molecularmente, respectivamente (**Tabela 4.3**).

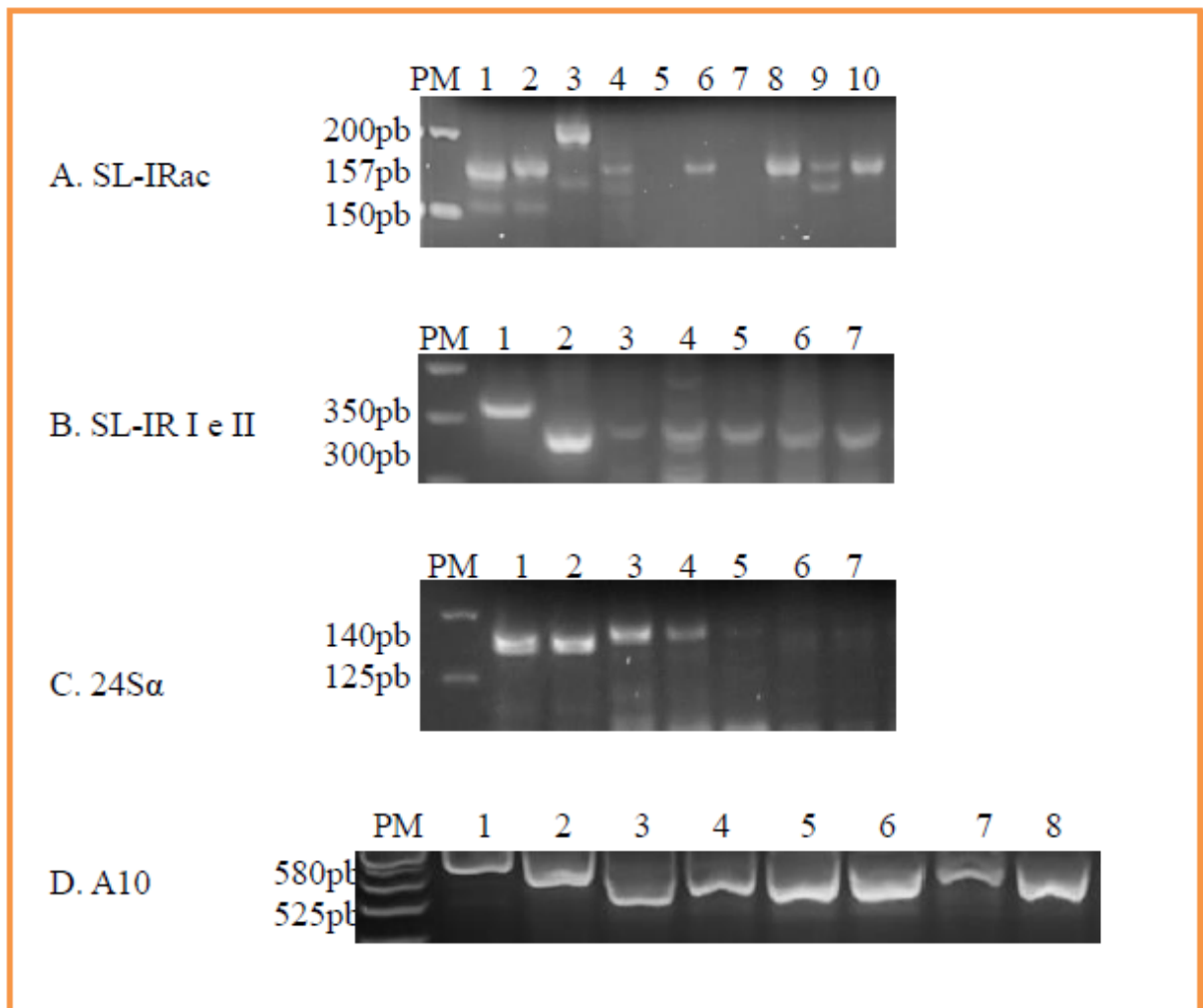


Figura 4.8: Géis de agarose de 2-3% representativos da caracterização molecular de *T. cruzi* em amostras de sangue de pacientes com DC crônica pertencentes à coorte do INI. **A.** Região intergênica ac do gene Spliced Leader (SL-IR ac). PM: marcador de peso molecular 100pb; 1: DM28c (TcI); 2: cepa Y (TcII); 3:

3663 (TcIII); 4-10: amostras de pacientes. **B.** Região intergênica do Spliced Leader (SI-IR I e II). PM: marcador de peso molecular 100pb; 1: DM28c (TcI), 2: cepa Y (TcII), 3-7: amostras de pacientes. **C.** região do gene da subunidade ribossomal 24Sα. PM- marcador de peso molecular 100pb; 1: 3663 (TcIII); 2: LL014 (TcV); 3: cepa Y (TcII); 4-7: amostras de pacientes. **D.** Região correspondente ao fragmento nuclear A10. PM- marcador de peso molecular 100pb; 1: cepa Y (TcII); 2: CL Brener (TcVI); 3-10: amostras de pacientes.

Tabela 4.3: Tipagem molecular de *T. cruzi* nas amostras de sangue dos 130 pacientes positivos por qPCR.

Genótipo de <i>T. cruzi</i>	Número de amostras (%)
TcII	51 (39,2)
TcVI	50 (38,5)
TcII/TcVI	24 (18,5)
TcIV	1 (0,8)
TcV	1 (0,8)
TcII+TcIV	1 (0,8)
TcII+TcV	1 (0,8)
TcII/TcVI+TcV	1 (0,8)

A caracterização molecular em DTUs abrangeu pacientes de todas as regiões brasileiras (exceto a região Norte), além dos dois países da América do Sul (Peru e Chile). Os indivíduos oriundos da região Norte não foram incluídos por não terem apresentado resultados positivos por qPCR. As DTUs TcII e TcVI foram as mais representativas, estando distribuídas em todas as regiões brasileiras e abrangendo todas as formas clínicas (cardíaca, indeterminada, digestiva e mista). A DTU TcII foi observada em 9 estados (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro) e TcVI foi encontrada em 10 estados brasileiros (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul) e também no Peru (forma digestiva). A DTU TcIV foi identificada em um único estado (Pernambuco, paciente cardíaca no estágio A). A DTU TcV também foi encontrada em apenas um estado (Bahia, paciente com a forma cardíaca da DC no estágio C) em um caso de infecção única, e em outros dois estados (Minas Gerais e Paraíba), como casos de infecção mista TcII+TcV (Paraíba, forma indeterminada) e TcII/TcVI+TcV (Minas Gerais, forma indeterminada). Também foi observada a presença de TcIV em um caso de infecção mista (TcII+TcIV, forma cardíaca no estágio C), em Pernambuco. Bahia e

Paraíba foram os únicos estados que reuniram todas as formas clínicas da DC crônica entre os pacientes positivos pela qPCR, e que tiveram a definição da linhagem genética do parasito em sangue. Também pode ser destacado o estado de Minas Gerais, onde se observou um maior número de pacientes com CCC (18 indivíduos) (**Tabela 4.4**).

Tabela 4.4. Distribuição das DTUs de *T. cruzi* e manifestação clínica correlata.

Origem	Pacientes (n)	DTU (<i>T. cruzi</i>)	Manifestação clínica (n)
Nordeste			
Alagoas	3	II	cardíaca (2), mista (1)
	6	VI	cardíaca (4), indeterminada (1), mista (1)
	1	II/VI	indeterminada (1)
Bahia	10	II	cardíaca (6), indeterminada (2), digestiva (2)
	14	VI	cardíaca (4), indeterminada (7), mista (2), digestiva (1)
	1	V	cardíaca (1)
	8	II/VI	cardíaca (5), mista (3),
Ceará	3	II	cardíaca (3)
	3	VI	cardíaca (1), mista (2)
	1	II/VI	cardíaca (1)
Paraíba	7	II	cardíaca (4), indeterminada (1), mista (1), digestiva (1)
	6	VI	cardíaca (6)
	2	II/VI	cardíaca (2)
	1	II+V	indeterminada (1)

Pernambuco	14	II	cardíaca (8), indeterminada (3), mista (3)
	1	IV	cardíaca (1)
	1	VI	indeterminada (1)
	3	II/VI	indeterminada (1), mista (2)
	1	II+IV	cardíaca (1)
Piauí	1	II/VI	cardíaca (1)
Sergipe	2	II	cardíaca (1), digestiva (1)
	1	VI	digestiva (1)
Centro Oeste			
Goiás	2	II	cardíaca (2)
	1	VI	cardíaca (1)
Mato Grosso do Sul	1	VI	indeterminada (1)
Sudeste			
Minas Gerais	7	II	cardíaca (4), indeterminada (3)
	14	VI	cardíaca (10), indeterminada (3), mista (1)
	4	II/VI	cardíaca (4)
	1	II/VI+V	indeterminada (1)
Rio de Janeiro	3	II	cardíaca (2), mista (1)
	1	VI	indeterminada (1)
	2	II/VI	indeterminada (2)
Sul			
Rio Grande do Sul	1	VI	indeterminada (1)
	1	II/VI	indeterminada (1)
Outros Países			

Chile	1	II/VI	indeterminada (1)
Peru	1	VI	digestiva (1)

4.4 Correlação entre carga parasitária, genótipo de *T. cruzi* e manifestação clínica

Entre os 130 pacientes positivos pela qPCR e que foram submetidos à caracterização molecular de *T. cruzi* em sangue, 74 (56,9%) eram portadores de CCC, 32 (24,6%) apresentavam a forma indeterminada, 17 (13,1%) com a forma mista e 7 (5,4%) portadores da forma digestiva da DC (**Tabela 4.4**). Como observado na **Tabela 4.3**, os genótipos de *T. cruzi* mais frequentes foram TcII (39,2%) e TcVI (38,5%), e em 18,5% dos pacientes não foi possível diferenciar TcII de TcVI (TcII/TcVI). O genótipo TcII, em infecção única, estava presente em 32 pacientes crônicos cardiopatas (43,2%) [sendo: 17 classificados no estágio A, 8 no B1 e 7 no estágio C], em 9 pacientes com a forma indeterminada (28,1%), 6 com a forma mista (35,3%) e 4 com a forma digestiva (57,1%). Em relação à distribuição do genótipo TcVI, em infecção única, este foi identificado em 26 pacientes crônicos cardíacos (35,1%) [sendo: 11 classificados no estágio A, 7 no B1, 2 no B2, 5 no C e 1 indivíduo no estágio D], em 15 pacientes na forma indeterminada (46,9%), 6 na forma mista (35,3%) e 3 com a forma digestiva (42,9%). O genótipo TcIV foi observado somente em uma paciente que apresentou a forma cardíaca da DC (estágio A). O genótipo TcV também esteve presente em apenas um paciente que apresentou a forma cardíaca da DC (estágio C), no entanto, em infecções mistas com TcII e com TcII/VI, ambos os pacientes (1 com TcII+TcV e 1 com TcII/VI+TcV) apresentaram a forma indeterminada. A infecção mista TcII+TcIV, foi observada apenas em um único paciente e este apresentou a forma cardíaca (estágio C). Para os pacientes nos quais não foi possível a distinção entre TcII e TcVI (TcII/TcVI) (n=24), houve uma frequência maior de pacientes com a forma cardíaca (54,2%), sendo 13 pacientes com CCC (5 classificados no estágio A, 5 no estágio B1, 1 no estágio B2, 1 no estágio C e 1 no estágio D), em relação as demais formas clínicas, 6 pacientes apresentavam a forma indeterminada e 5 a forma mista (**Tabela 4.4**).

Ao comparar os genótipos de *T. cruzi* com a carga parasitária dos pacientes, foi possível observar que para aqueles infectados com TcII, o valor da mediana foi de 0,785 [0,0925 – 2,422] eq. parasitos/mL. Pacientes infectados com o genótipo TcVI tiveram o valor da mediana das cargas parasitárias de 0,230 [0,050 - 1,850] eq.

parasitos/mL. Para os pacientes infectados com TcII/TcVI, o valor da mediana da carga parasitária foi de 0,190 [0,0932 - 2,367] eq. parasitos/mL. Os cinco indivíduos que foram identificados com infecções por TcIV, TcV, TcII+TcIV, TcII+TcV e TcII/TcVI+TcV apresentaram valores de carga parasitária de $0,05 \pm 0,006$; $0,44 \pm 0,16$; $0,23 \pm 0,04$; $0,41 \pm 0,05$ e $0,003 \pm 0,002$ eq. parasitos/mL, respectivamente (**Figura 4.9**). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ao comparar genótipos de *T. cruzi* com as cargas parasitárias dos pacientes ($p=0,410$).

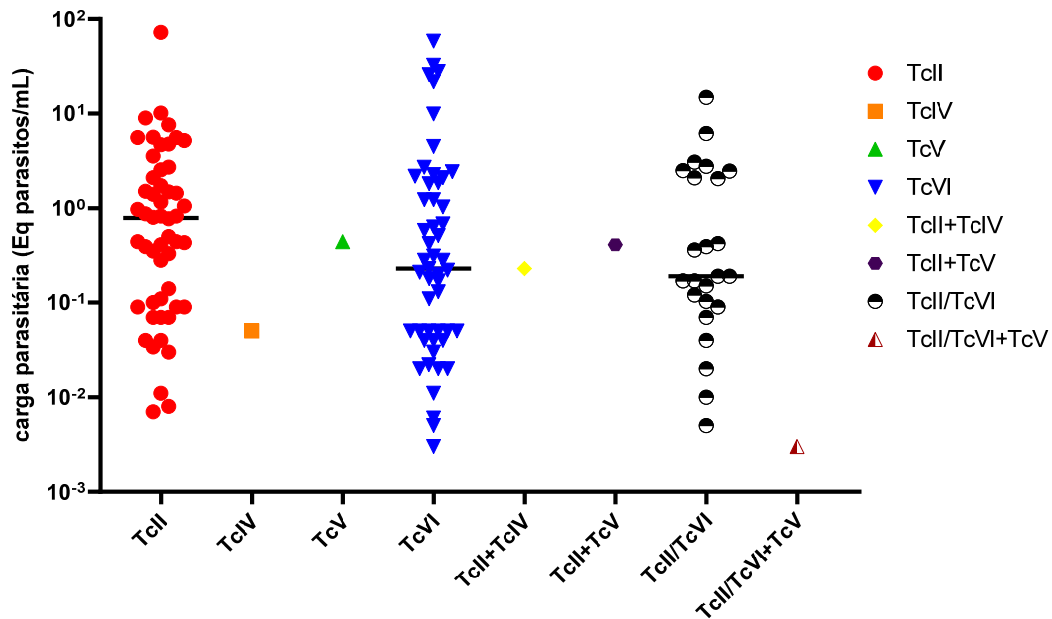


Figura 4.9: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos pacientes pertencentes à coorte do INI, de acordo com os genótipos de *T. cruzi*. ($p=0,410$). As linhas horizontais representam as medianas.

A carga parasitária dos pacientes infectados com TcII também foi comparada em relação as diferentes formas clínicas (indeterminada, cardíaca, mista e digestiva); os valores das medianas para cada grupo foram de 0,350 [0,085 – 1,770], 0,810 [0,138 – 3,348], 0,330 [0,090 – 0,820] e 1,050 [0,070 – 1,510] eq. parasitos/mL, respectivamente (**Figura 4.10**). Para o grupo infectado com TcVI, os valores das medianas para cada grupo, em relação às formas clínicas, foram de 0,580 [0,200 – 2,260], 0,180 [0,400 – 1,230], 0,110 [0,043 – 23,207] e 0,210 [0,0500 – 1,810] eq. parasitos/mL, respectivamente. Analisando o grupo infectado com TcII/TcVI, observou-se valores das medianas de 2,430 [0,294 – 6,000], 0,170 [0,086 – 2,255] e 0,090 [0,030 – 0,190] eq. parasitos/mL para os pacientes que

apresentaram a forma indeterminada, cardíaca e mista da DC, respectivamente. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados ($p=0,158$).

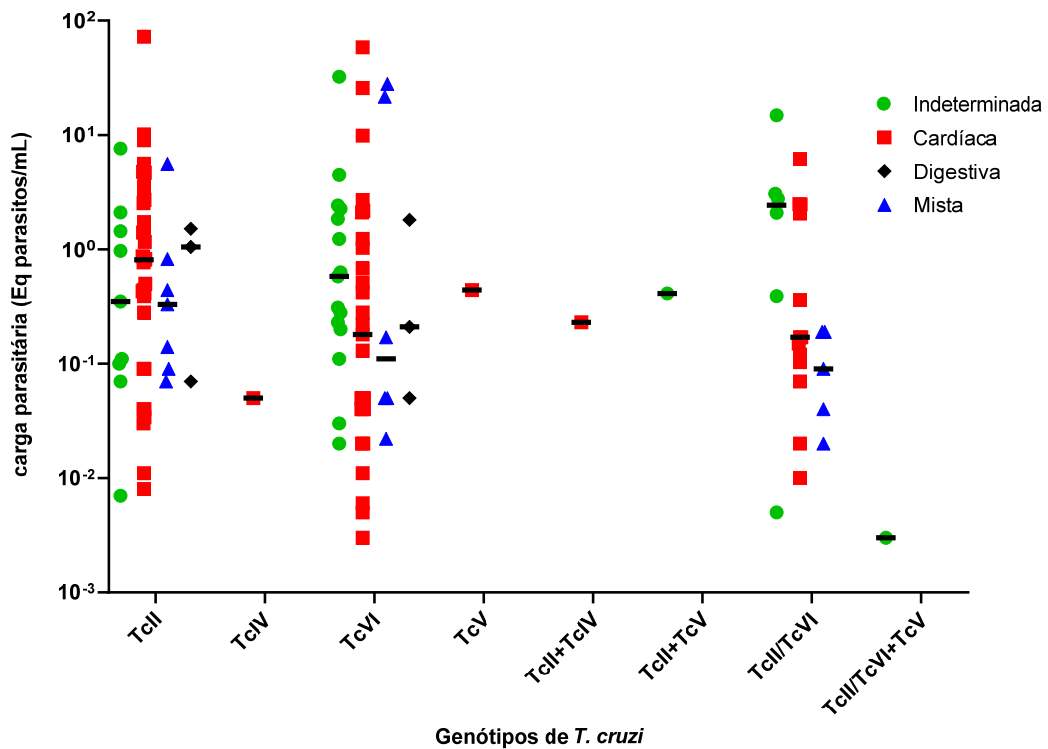


Figura 4.10: Gráfico de distribuição de pontos das cargas parasitárias dos pacientes pertencentes à coorte do INI, de acordo com os genótipos de *T. cruzi* e as diferentes formas clínicas da DC ($p=0,158$) As linhas horizontais representam as medianas.

4.5 Genotipagem de SNPs por HRM

4.5.1. Padronização da técnica de HRM

Após a síntese dos oligonucleotídeos para a realização da amplificação dos alvos em estudo [*TNFA* (-238G/A rs361525, -308G/A rs1800629 e -1031T/C rs1799964), *IL18* (-1297T/C, rs360719 e rs2043055A/G/T), *IL1B* (-511A/G rs16944), *IL1RN* (+11100T/C/A rs315952), *IL12B* (+1188A/C rs3212227), *IL10* (-1082G/A rs1800896), *IL4* (-509C/T rs2243250), *MIF* (-173G/C, rs755622), *IFNG* (+874T/A rs2430561), *IL17A* (SNP G197A/G, rs2275913), *IL17F* (T7488C/T, rs763780) e *TGFβ1* (códon 10 ou +869T/C/G rs1800470)], foram realizados ensaios preliminares de HRM com a finalidade de selecionar as temperaturas de anelamento e as concentrações ideais para cada par de oligonucleotídeos; a exemplo temos os alvos para os SNPs *TNFA* -308G/A rs1800629 (**Figuras 4.11 e 4.12 e Tabelas 4.5 e 4.6**),

e IL10 -1082G/A, rs1800896 (**Figuras 4.13 e 4.14 e Tabela 4.7 e 4.8**). Para avaliar se o DNA de *T. cruzi* causaria alguma interferência nas análises das curvas geradas por HRM, foram testadas duas amostras de pacientes com DC (sorologia e qPCR positivos) e uma amostra de um paciente sem DC (sorologia e qPCR negativos), além de usarmos uma amostra de DNA (*Human Genomic DNA*) contida no TaqMan™ RNase P Detection Reagents kit (Applied Biosystems como controle da reação de qPCR).

Para a confirmação do tamanho dos produtos obtidos por HRM, estes foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2-3% (de acordo com os tamanhos preditos). A escolha da temperatura de anelamento, assim como a concentração dos oligonucleotídeos, baseou-se em: ausência/menor ruídos, melhor formato das curvas de dissociação derivadas (considerando como referência, o formato mais esguio, com o pico mais acentuado) sem formato anômalo e ausência/menor formação de dímeros, nesta ordem. Assim, na **Tabela 4.9**, observamos os valores selecionados para as temperaturas de anelamento e concentração dos oligonucleotídeos para todos os alvos testados. Esta seleção ocorreu pela análise do conjunto dos fatores descritos acima, e não de um parâmetro individualmente.

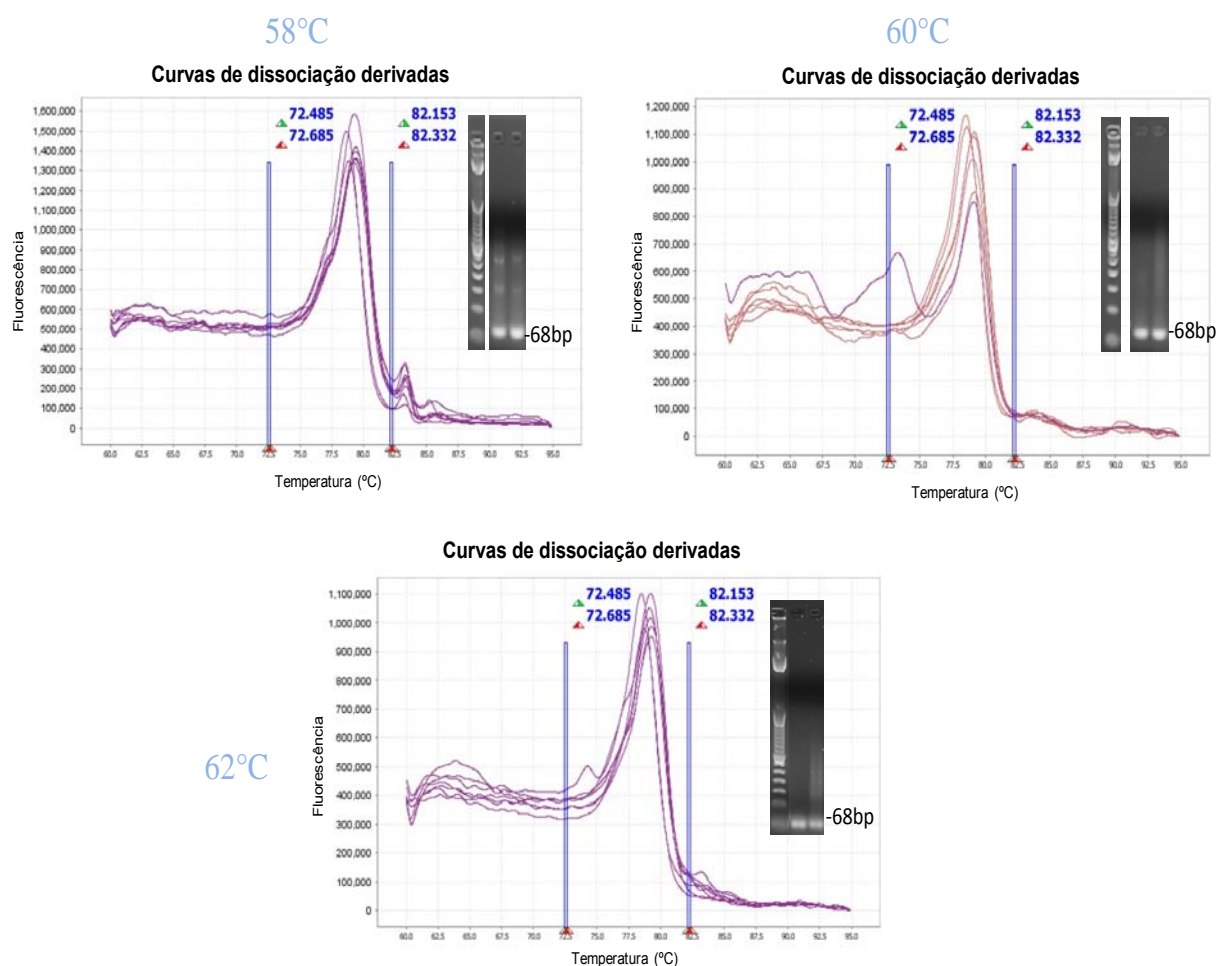


Figura 4.11: Ensaio preliminar de HRM para padronização da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos. Curvas de dissociação em alta resolução, em formato derivativo, para o alvo *TNFA* -308G/A rs1800629.

Tabela 4.5: Padronização da temperatura de anelamento do par de oligonucleotídeos para o alvo *TNFA* -308G/A rs1800629, através de ensaio preliminar de HRM.

		Temperatura de anelamento								
		58°C			60°C			62°C		
Alvo	Amostras	CTmédio	DP	Dímero	CTmédio	DP	Dímero	CTmédio	DP	Dímero
<i>TNFA</i> 308G/A rs1800629	DNA controle	27,596	0,631	+	27,815	0,007	+	28,145	0,250	-
	Paciente negativo	27,380	1,093	+	27,903	-	-	28,226	-	-
	Paciente positivo 1	27,665	0,273	-	28,035	0,055	-	28,157	0,023	+
	Paciente positivo 2	26,746	0,081	-	27,363	0,352	-	27,448	0,294	-

Legenda: CT= *Cycle Threshold*, DP= Desvio Padrão.

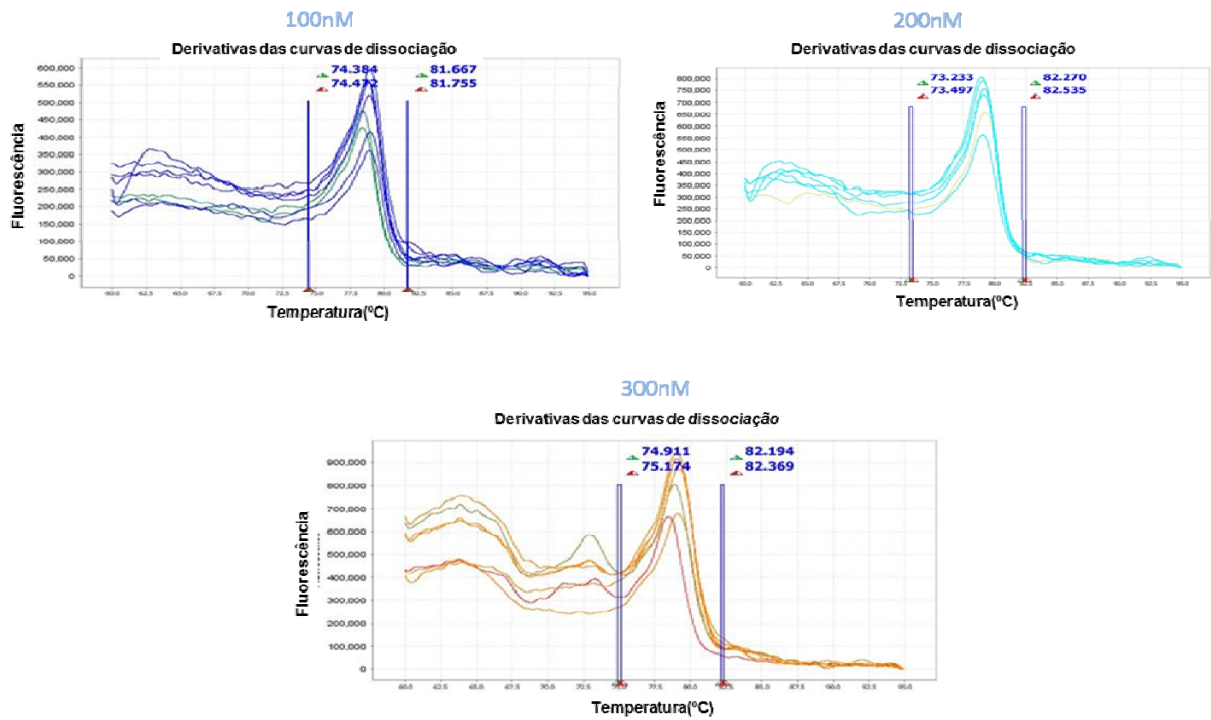


Figura 4.12: Ensaio preliminar de HRM para padronização da concentração dos oligonucleotídeos testados à temperatura de anelamento de 58 °C. Curvas de dissociação em alta resolução, em formato derivativo, para o *TNFA* -308G/A rs1800629.

Tabela 4.6: Ensaio preliminar de HRM para padronização da concentração do par de oligonucleotídeos para o alvo *TNFA* -308G/A rs1800629, a partir da temperatura de anelamento selecionada (58 °C).

58°C		Concentração dos primers								
		100nM			200nM			300nM		
Alvo	Amostras	CTmédio	DP	Dímero	CTmédio	DP	Dímero	CTmédio	DP	Dímero
<i>TNFA</i> 308G/A rs1800629	DNA controle	27,364	0,162	-	27,324	0,147	-	27,190	0,337	+
	Paciente negativo	28,455	0,142	-	28,110	0,155	-	27,800	0,224	++
	Paciente positivo 1	28,153	0,225	-	27,822	0,220	-	27,825	0,219	-
	Paciente positivo 2	26,290	0,032	-	-	-	-	26,821	-	-

Legenda: CT= *Cycle Threshold*, DP= Desvio Padrão.

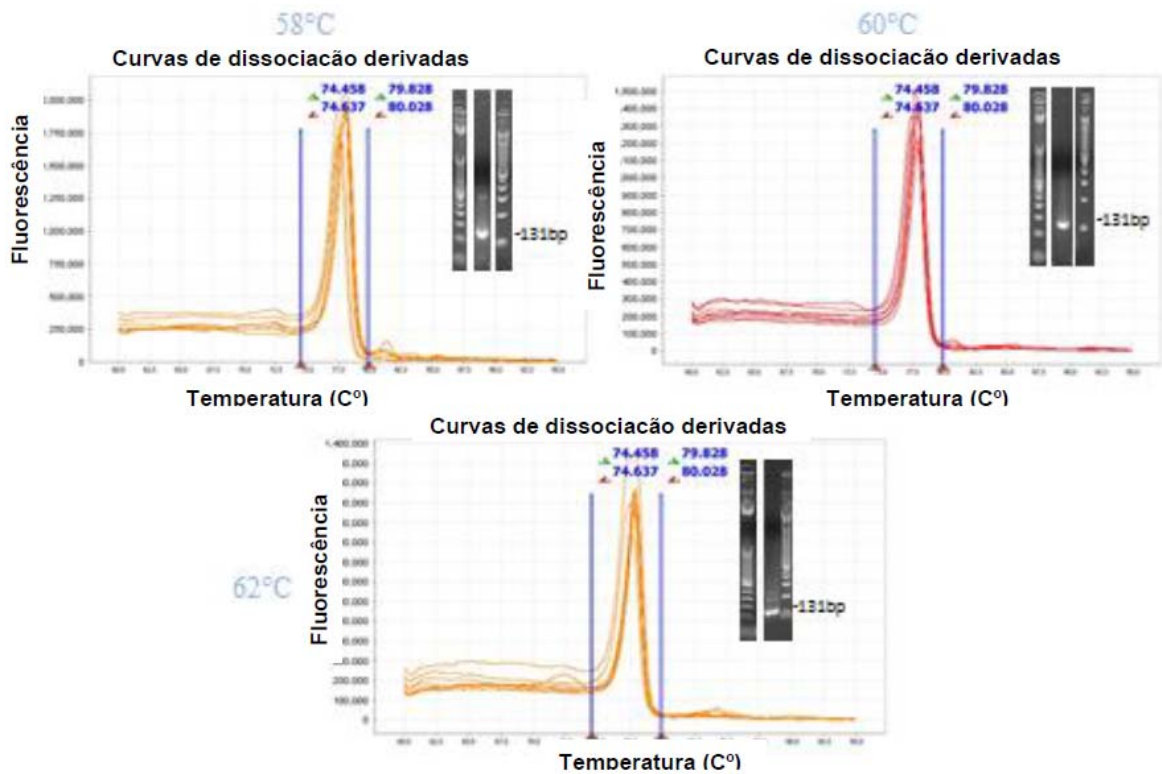


Figura 4.13: Ensaio preliminar de HRM para padronização da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos. Curvas de dissociação em alta resolução, em formato derivativo, para o alvo *IL10* SNP -1082G/A rs1800896.

Tabela 4.7: Ensaio preliminar de HRM para padronização da temperatura de anelamento do par de oligonucleotídeos para o alvo *IL10* SNP -1082G/A rs1800896.

Alvo	Amostras	Temperatura de anelamento								
		58°C			60°C			62°C		
		CTmédio	DP	Dímero	CTmédio	DP	Dímero	CTmédio	DP	Dímero
<i>IL10</i> SNP -1082G/A rs1800896	DNA controle	26,698	0,559	-	27,034	0,521	-	27,298	0,569	-
	Paciente negativo	26,932	0,357	-	27,327	0,237	-	27,411	0,237	-
	Paciente positivo 1	27,786	-	-	28,921	0,298	-	28,884	0,195	-
	Paciente positivo 2	28,993	0,692	-	27,119	0,092	-	27,428	0,199	-

Legenda: CT= *Cycle Threshold*, DP= Desvio Padrão.

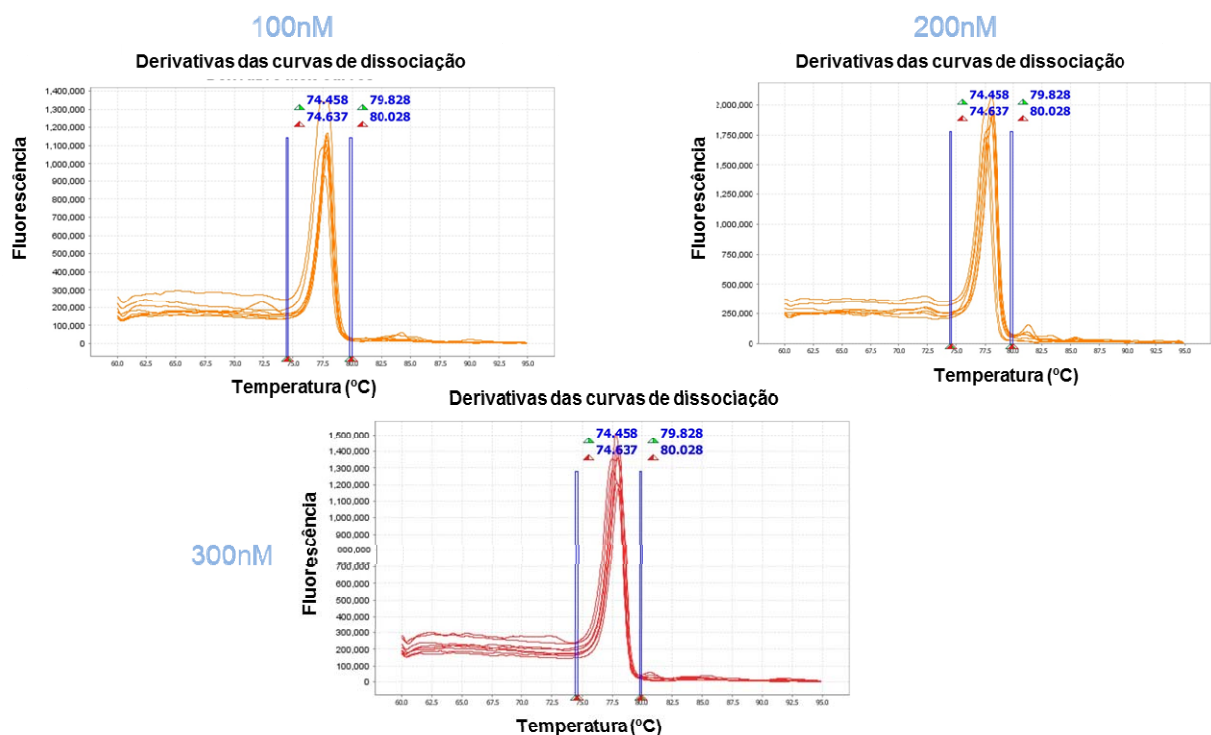


Figura 4.14: Ensaio preliminar de HRM para padronização da concentração dos oligonucleotídeos, a partir da temperatura de anelamento de 60 °C. Curvas de dissociação em alta resolução, em formato derivativo, para o alvo *IL10* SNP -1082G/A rs1800896.

Tabela 4.8: Ensaio preliminar de HRM para padronização da concentração do par de oligonucleotídeos para o alvo *IL10* SNP -1082G/A rs1800896, a partir da temperatura de anelamento selecionada (60 °C).

60°C		Concentração dos primers								
		100nM			200nM			300nM		
Alvo	Amostras	CTmédio	DP	Dímero	CTmédio	DP	Dímero	CTmédio	DP	Dímero
<i>IL10</i> -1082G/A rs1800896	DNA controle	28,200	0,069	+	27,523	0,330	-	27,963	0,333	-
	Paciente negativo	28,916	0,115	+	27,243	0,564	-	29,383	0,501	-
	Paciente positivo 1	28,802	-	-	27,610	-	+	27,747	0,253	-
	Paciente positivo 2	28,140	0,116	+	27,538	-	+	27,673	0,037	-

Legenda: CT= *Cycle Threshold*, DP= Desvio Padrão.

Tabela 4.9: Valores obtidos da padronização das temperaturas de anelamentos e concentrações dos oligonucleotídeos testados, através de ensaios preliminares de HRM.

Alvo	Código SNP	Sequência SNP	Temperatura de anelamento	Concentração de primers
TNFA	SNP -1031T/C, rs1799964	GGAAGCAAAGGAGAAGCTGAGAAGA[C/T]GAAGGAAAAGTCAGGGTCTGGAGGG	60°C	200/200nM
	SNP -238G/A, rs361525	GGCCCAGAAGACCCCCCTCGGAATC[A/G]GAGCAGGGAGGATGGGGAGTGTGAG	60°C	300/300nM
	SNP -308G/A, rs1800629	GAGGCAATAGTTTTGAGGGGCATG[A/G]GGACGGGGTTCCAGCCTCCAGGGTCC	58°C	200/200nM
IL18	SNP -1297T/C, rs360719	ATCACTACTTGATCCCCTTCGTGCTTTCA[C/T]GTTAATTGGCCCAATTGGACTCTACAGTTG	58°C	200/200nM
	SNP rs2043055A/G/T	TTACAATTCTTCTTGTAGTTCTCA[A/G/T]TACATCTATGACTGATTACAAGTAG	58°C	300/300nM
ILB	SNP -511A/G, rs16944	TACCTTGGGTGCTGTTCTCTGCCTC[A/G]GGAGCTCTGTCAATTGCAGGAGC	62°C	300/300nM
IL1RN	SNP +11100, rs315952	GCTTCGCCTTCATCCGCTCAGACAG[A/C/T]GGCCCCACCACAGTTTTGAGTCTG	58°C	300/300nM
IL12B	SNP +1188A/C, rs3212227	ATATCTTTGCTGTATTTGTATAGTT[A/C]GATGCTAAATGCTCATTGAAACAAT	62°C	300/300nM
IL10	SNP -1082G/A, rs1800896	CAACTACTAAGGCTTCTTTGGGA[A/G]GGGGAAGTAGGGATAGGTAAGAGGA	60°C	300/300nM
IL4	SNP -509C/T, rs2243250	ACACCTAACTTGGGAGAACATTGT[C/T]CCCCAGTGCTGGGGTAGGAGAGTCT	60°C	300/300nM
MIF	SNP -173G/C, rs755622	CGCTAAGCCCGGCGCACCGCTCCAA[C/G]CTGTTCTCCACTTGGCGGCTAGAAA	62°C	300/300nM
IFNG	SNP +874T/A, rs2430561	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG[AT]GATTTGATTTTGTGTTGTAAGAATA	60°C	300/300nM
IL17A	SNP G197A/G, rs2275913	TGCCCTTCCCATTTTCTTCAGAAG[A/G]AGAGATTCTTCTATGACCTCATTGG	60°C	300/300nM
IL17F	SNP T7488C/T, rs763780	GTGGATATGCACCTCTTACTGCACA[C/T]GGTGGATGACAGGGGTGACGCAGGT	60°C	200/200nM
TGFB1	SNP códon 10 ou +869T/C, rs1800470	CCGCCCTCCGGGCTGCGGCTGCTGC[C/G/T]GCTGCTGCTACCGCTGCTGTGGCTA	62°C	300/200nM

Legenda: em colchetes vermelhos encontram-se os nucleotídeos (selvagem/mutante) ligados ao SNP de cada sequência de gene-alvo.

4.5.2. Obtenção dos controles para referência na técnica de HRM

Em seguida à padronização da técnica de HRM, fez-se necessária a obtenção dos controles para serem utilizados como painel de referência nas análises de genotipagem dos SNPs por HRM e, assim, tornar possível a confirmação dos dados gerados por esta metodologia. Visto que os produtos gerados por HRM apresentavam tamanhos muito pequenos (em torno de 60 pb) para serem submetidos ao sequenciamento direto pela técnica de Sanger, foi necessária a realização de um ensaio de PCR convencional com novos iniciadores, visando a obtenção de produtos de PCR com maior tamanho para os fragmentos amplificados para cada alvo testado. Para esta etapa foi necessária uma outra padronização, a da temperatura de anelamento e concentração dos novos oligonucleotídeos desenhados (**Tabela 4.10**). Porém, os alvos *IL4* (SNP -509C/T rs2243250), *TNFA* (SNP -238G/A rs361525 e SNP -1031T/C rs1799964) e *IFNG* (SNP +874T/A rs2430561) não amplificaram em nenhuma das condições de teste, sendo deixados para serem explorados em uma futura etapa do estudo.

Tabela 4.10: Padronização das temperaturas de anelamento e concentrações dos oligonucleotídeos utilizados para a obtenção de controles/referências para os ensaios de HRM.

Gene	Nome	Sequencia dos primers	Ta	Concentração
<i>IL18</i>	IL181CF	5'-CTGAGACATTTGTTGCTCTATATC-3'	60°C	600/600nM
	IL181CR	5'-CCTTCAACAGTGATTACAAAGG-3'		
	IL182CF	5'-AGCCAATGAGAAGGAGG-3'	58,5°C	
	IL182CR	5'-CAGTAGTCTGAGAATTTTAGATG-3'		
<i>IL4</i>	IL4CF	5'-AAAAGTCATTCCTGAAAC-3'		
	IL4CR	5'-GGAAAGATAGAGTAATATCAA-3'		
<i>TGFB1</i>	TGFB1CF1	5'-GGACCTCAGCTTCCCTCG-3'	58,5°C	600/600nM
	TGFB1CR1	5'-CCGCAGCTTGGACAGGAT-3'		
<i>TNFA</i>	TNA3CF	5'-TTTTCTCTCCCTCAAGGACTC-3'	60°C	500/500nM
	TNA3R	5'-TGTCTCGGTTTCTTCTCCAT-3'		
	TNA2CF	5'-CATCCTGTCTGGAAGTTAG-3'		
	TNA2CR	5'-TTCAACCAGCGGAAAAC-3'		
	TNA1CF	5'-AGAACTTCCCAGTCTATCTAAGG-3'		
TNA1CR	5'-TAGCCCTGGACATTCTCCT-3'			
<i>IL1B</i>	IL1BCF	5'-TTGAGGGTGTGGGTCTCTA-3'	60°C	600/600nM
	IL1BCR	5'-CATCCATGAGATTGGCTAGG-3'		
<i>IL1RN</i>	IL1RNCF	5'-ATTTTCATGGCGTGGAGTGG-3'	63°C	600/600nM
	IL1RNCR	5'-GCAAGAATGGGAACAGGCA-3'		
<i>IL12B</i>	IL12BCF	5'-GGCATTCTCTTCCAGGTTCT-3'	61,5°C	600/600nM
	IL12BCR	5'-GAAACATTCCATACATCCTGGC-3'		
<i>IFNG</i>	IFNGCF1	5'-ACTAAGCAGAAGAGTTGAA-3'		
	IFNGCR1	5'-ATTATTTTCTGTCACTCTCC-3'		
<i>MIF</i>	MIFCF	5'-CCGCCTTTTGTGACGCCA-3'	58,5°C	600/600nM
	MIFCR	5'-GAACTGGGCTTCATCTCTGGAAG-3'		
<i>IL17A</i>	IL17ACF	5'-CATAACTCTTCTGGCAGC-3'	61,5°C	500/500nM
	IL17ACR	5'-TTGTGCCTGCTATGAGAT-3'		
<i>IL17F</i>	IL17FCF	5'-GTACAAGCTGGGAATGCAA-3'	60°C	600/600nM
	IL17FCR	5'-CCAGTTGAGAAGGTGC-3'		
<i>IL10</i>	IL10CF	5'-GAAGAAGTCCTGATGCTACTG-3'	61,5°C	600/600nM
	IL10CR	5'-CTTCTGTGGCTGGAGTCTAA-3'		

Legenda: Ta= Temperatura de anelamento.

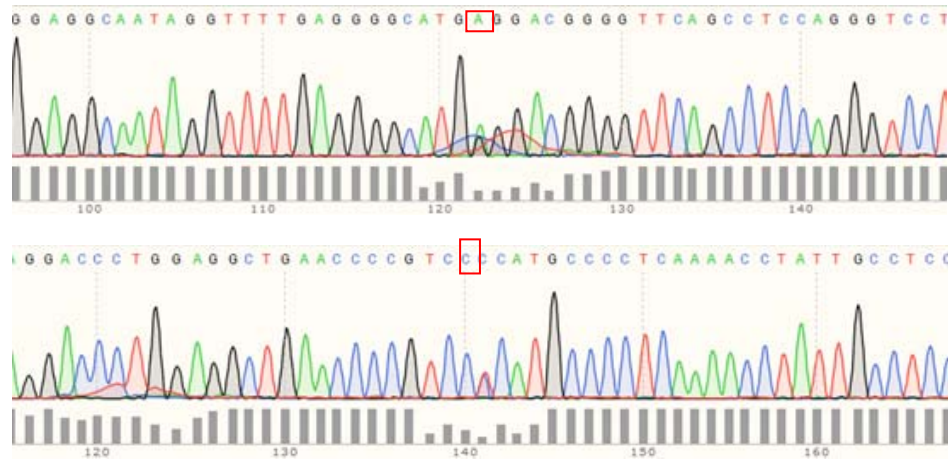
Assim, estabelecidas as condições de reação e ciclagem para os alvos que apresentaram produtos de amplificação, foram realizados ensaios de PCR convencional para 11 alvos (*IL18* SNP -1297T/C, rs360719 e SNP rs2043055A/G; *TGFB1* SNP códon 10 ou +869T/C, rs1800470; *TNFA* SNP -308G/A, rs1800629; *IL1B* SNP -511A/G, rs16944; *IL1RN* SNP +11100, rs315952; *IL12B* SNP +1188A/C, rs3212227; *MIF* SNP -173G/C, rs755622; *IL17A* SNP G197A/G, rs2275913; *IL17F* SNP T7488C/T, rs763780 e *IL10* SNP -1082G/A, rs1800896), a partir de amostras de pacientes que foram previamente testadas por HRM e, portanto, seus respectivos genótipos eram conhecidos. Em seguida, os produtos amplificados foram enviados para o sequenciamento para a confirmação das sequências no GenBank e validação dos genótipos dos controles obtidos por HRM (Anexo 5). As **Figuras 4.15 e 4.16**

representam: as sequências nucleotídicas que flanqueiam os SNPs *TNFA* SNP -308G/A, rs1800629 e *IL10* SNP -1082G/A, rs1800896, respectivamente, e que estão depositadas no dbSNP (NCBI); os eletroferogramas gerados pelo sequenciamento de Sanger e visualizados pelo SnapGene® Viewer versão 5.3.2 (SnapGene software, Insightful Science, EUA) a sequência consenso gerada no MegaX (Mega software, EUA) contendo as sequências nucleotídicas senso e antisenso que flanqueiam os SNPs, o gráfico das derivativas das curvas de dissociação contendo amostras dos indivíduos e os controles para os genótipos gerados pelo software de HRM. Todos os genótipos obtidos por HRM foram validados pelo sequenciamento de Sanger, com isso, foi dada continuidade à genotipagem dos SNPs das amostras restantes dos indivíduos em estudo. Porém, devido ao grande número de amostras de pacientes do estudo, decidimos seguir somente com a análise para os alvos *TNFA* SNP -308G/A, rs1800629 e *IL10* SNP -1082G/A, rs1800896. Os demais alvos, cuja análise de SNPs também foi padronizada por HRM neste trabalho, deverão ser explorados em uma futura etapa a este estudo.

A. Sequência SNP

GAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATG[A/G]GGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCC

B. Eletroferograma (cromatograma)



C. Sequência consenso

---GAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATGAGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCCACACACAAATC
GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCCACACACAAATC

D. Curva normalizada (HRM)

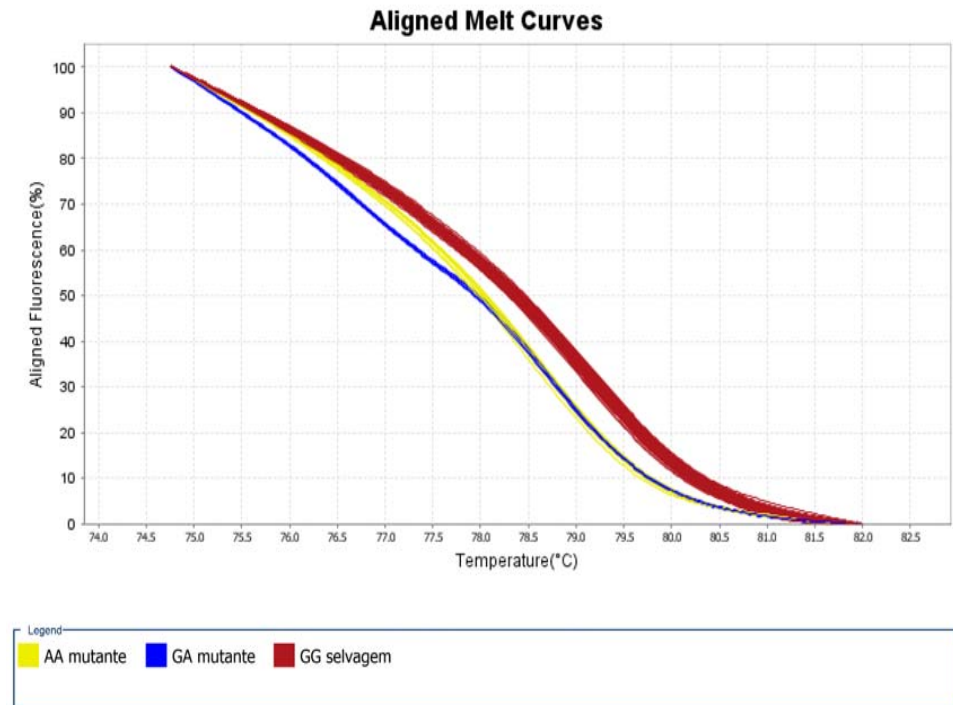
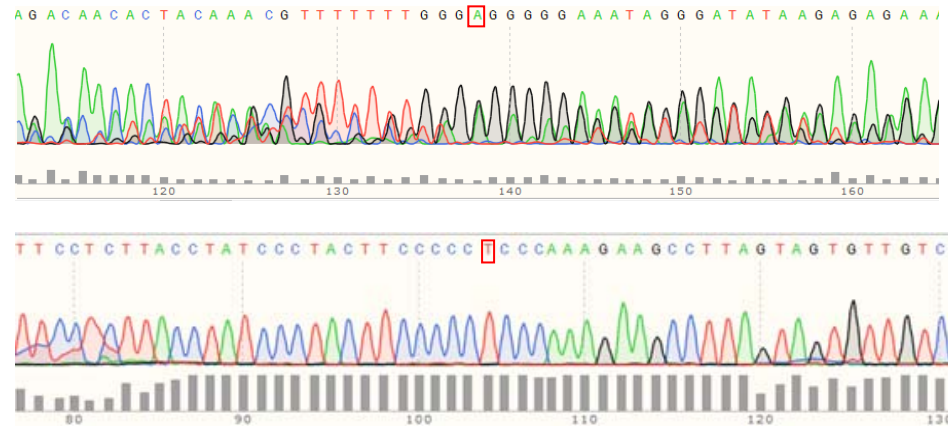


Figura 4.15: Figura representativa das etapas de sequenciamento e HRM para o alvo *TNFA* SNP -308G/A, rs1800629. Colchetes vermelhos envolvem os nucleotídeos referentes ao SNP (selvagem G/mutante A); Quadrados/retângulos vermelhos estão demarcando o(s) nucleotídeo(s) participante(s) do SNP, troca de G/A. **A:** Sequência que flanqueia o SNP depositada no dbSNP; **B:** Eletroferograma gerado das sequências senso e antisenso a partir do sequenciamento; **C:** Sequências senso e antisenso pareadas, em amarelo destacam-se as sequências do SNP; **D:** Gráfico da curva normalizada gerada pelo software de HRM.

A. Sequência SNP

CAACACTACTAAGGCTTCTTTGGGA[A/G]GGGGAAGTAGGGATAGGTAAGAGGA

B. Eletroferograma (cromatograma)



C. Sequência consenso

T A A A A G A C A A C A C T A C T A A G G C T T C T T T G G G A G G G G G A A G T A G G G A T A G G T A A G A G G A A A A A A G G C
T C C A A G A C A A C A C T A C T A A G G C T T C T T T G G G A G G G G G A A G T A G G G A T A G G T A A G A G G A A A G T A A G C

D. Curva normalizada (HRM)

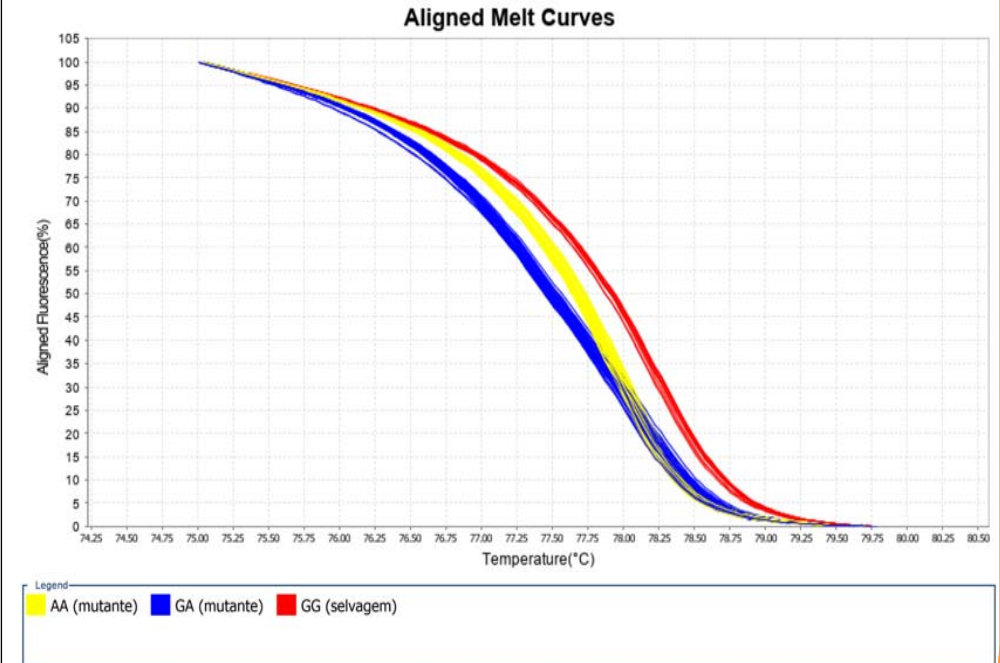


Figura 4.16: Figura representativa das etapas de sequenciamento e HRM para o alvo *IL10* SNP -1082G/A, rs1800896. Colchetes vermelhos envolvem os nucleotídeos referentes ao SNP (selvagem G/mutante A); Quadrados/retângulos vermelhos estão demarcando o(s) nucleotídeo(s) participante(s) do SNP, troca de G/A. **A:** Sequência que flanqueia o SNP depositada no dbSNP; **B:** Eletroferograma gerado das sequências senso e antisenso a partir do sequenciamento; **C:** Sequências senso e antisenso pareadas, em amarelo destacam-se as sequências do SNP; **D:** Gráfico da curva normalizada gerada pelo software de HRM.

4.5.3. Genotipagem molecular dos SNPs por HRM e análises estatísticas

Nesta etapa do estudo, foram analisadas amostras de 379 indivíduos, sendo 292 pacientes com DC e 87 indivíduos pertencentes ao grupo controle (sorologia negativa para *T. cruzi*). Houve a desistência de duas mulheres portadoras da DC, no entanto, a distribuição dos indivíduos, por gênero, entre os grupos de pacientes e de controles permaneceu estatisticamente similar ($p=0,296$) (**Tabela 4.11**).

Ademais, como dito previamente, dos 15 SNPs validados por sequenciamento de Sanger, somente os SNPs de *TNFA* (-308G/A, rs1800629) e *IL10* (SNP - 1082G/A, rs1800896) foram genotipados em todas as amostras participantes do presente trabalho pela metodologia de HRM (**Figuras 4.17 e 4.18**). Após cada produto amplificado ter sido dissociado por HRM, curvas de dissociação características foram geradas e processadas pelo software Quantstudio™ Real-Time PCR v1.3 (Applied Biosystems) de análise de HRM. Para cada SNP, os resultados de genótipos heterozigóticos resultaram em um formato da curva de dissociação alterada, apresentando picos duplos nas curvas de dissociação derivativas e um formato particular nas curvas de dissociação normalizadas, no qual há uma maior e mais rápida queda na fluorescência inicial (100%) até sua velocidade estabelecida entorno da metade da fluorescência, juntamente com o homozigoto correspondente. Os genótipos homozigotos podem ser distinguidos pela diferença na T_m (temperatura de *melting*) entre homozigotos selvagem e mutante. Além dessas análises, foi considerado o valor da *Silhouette Score* maior que 90 para que o resultado gerado por HRM fosse plenamente confiável, uma vez que, esse parâmetro mostra a proximidade dos resultados/perfis obtidos de uma determinada amostra confrontando-os com os da referência indicada pelo operador.

Tabela 4.11: Distribuição dos indivíduos por sexo entre os grupos pacientes e controles.

Sexo	Pacientes		Controles		P - value
	Freq	%	Freq	%	
Mulher	165	56,5	58	66,7	0,296
Homem	127	43,5	29	33,3	
Total	292	100,0	87	100,0	

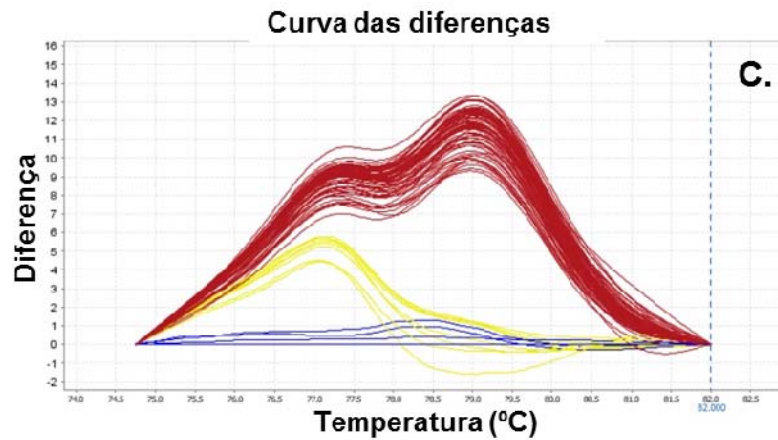
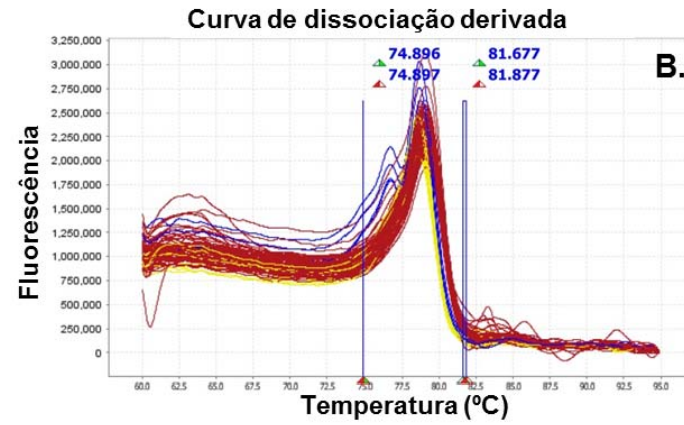
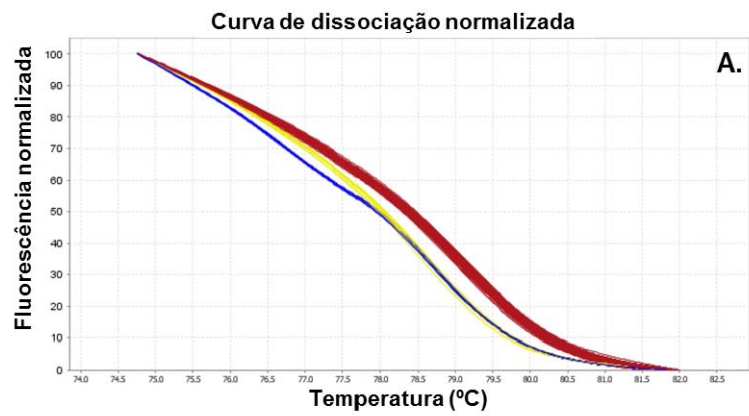


Figura 4.17: Curvas de dissociação geradas por HRM para a genotipagem do SNP de *TNFA* (-308G/A, rs1800629). **A:** Gráfico das curvas de dissociação formato derivativo; **B:** Gráfico das curvas de dissociação normalizada; **C:** Gráfico das diferenças.

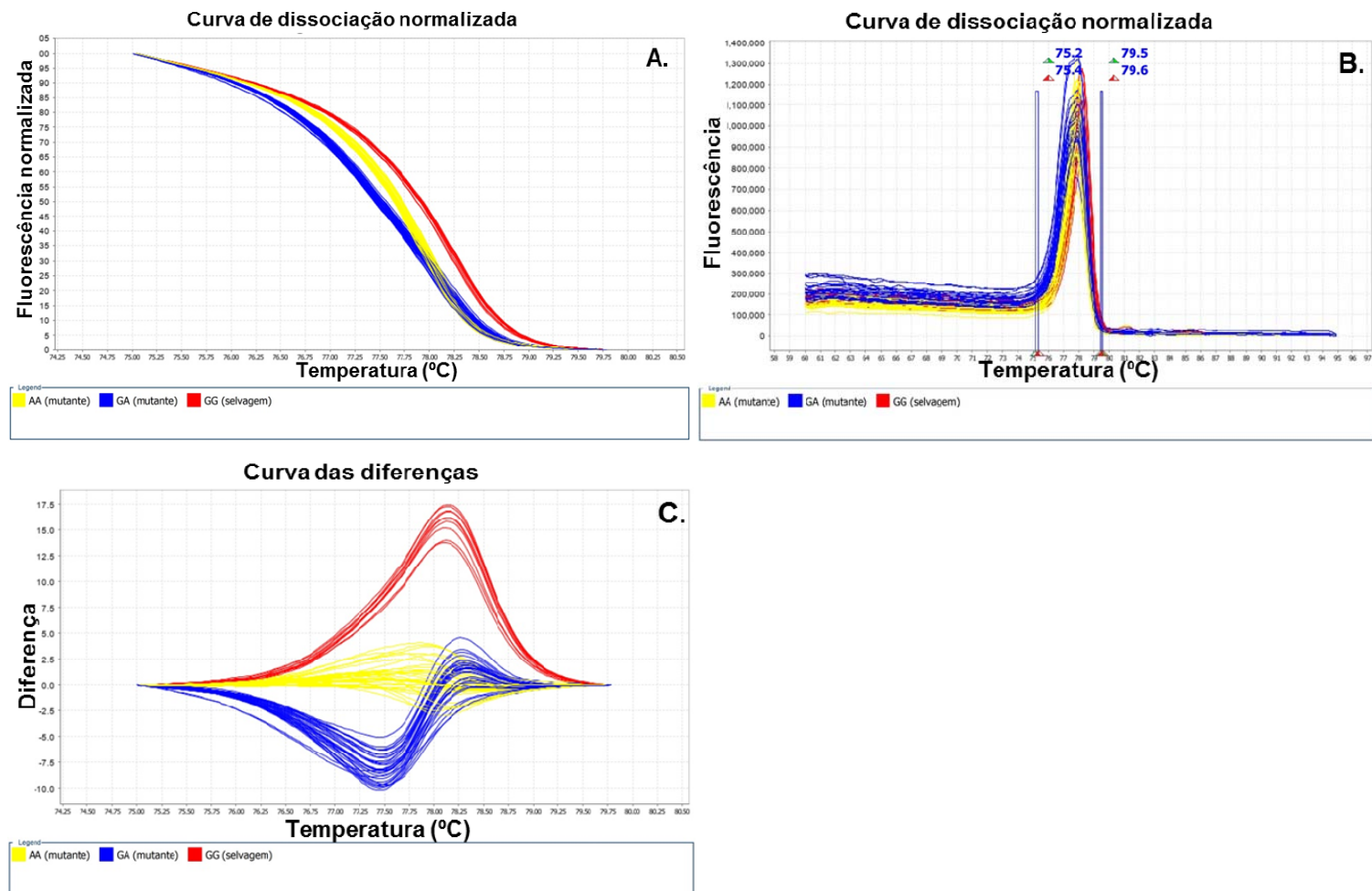


Figura 4.18: Curvas de dissociação geradas por HRM para a genotipagem do SNP de *IL10* (SNP -1082G/A, rs1800896). **A:** Gráfico das curvas de dissociação formato derivativo; **B:** Gráfico das curvas de dissociação normalizada; **C:** Gráfico das diferenças.

A distribuição genotípica do alvo de *TNFA* analisado encontra-se na **Tabela 4.12**. O teste de Hardy e Weinberg efetuado em ambos os grupos mostrou que as distribuições genotípicas, tanto dos pacientes como dos controles, estão em equilíbrio. Como o Qui-Quadrado calculado não foi significativo, inferimos que não existem diferenças na distribuição genotípica do SNP de *TNFA* entre pacientes e controles (**Tabela 4.12** e **Figura 4.19**). Considerando os genótipos do SNP de *TNFA* (-308G/A, rs1800629): dos 296 indivíduos que foram identificados como homocigotos GG, 75% eram pacientes portadores da DC; dos 73 indivíduos portando o genótipo GA, 83,6% eram pacientes com DC; e dos 10 indivíduos genotipados como AA, 90% eram pacientes com DC (**Figura 4.20**).

Tabela 4.12: Distribuição genotípica do SNP de *TNFA* (-308G/A, rs1800629) entre os grupos de pacientes vs controle.

<i>TNFA</i> (-308G/A), rs1800629		Grupos				
Genótipos	Pacientes	Controles	Total	Pr	a. Pr	Sa. Pr
GG (selvagem)	222	74	296	0,7500	166,5000	225,5726
GA (mutante)	61	12	73	0,8356	50,9726	
AA (mutante)	9	1	10	0,9000	8,1000	
Total	292	87	379	0,7704	224,9710	
χ^2			3,4018			
P-value			0,1825			

Legenda: Pr(i) – proporção primeira coluna; a. Pr(ii)- proporção segunda coluna; Sa. Pr(S)- somatório das proporções.

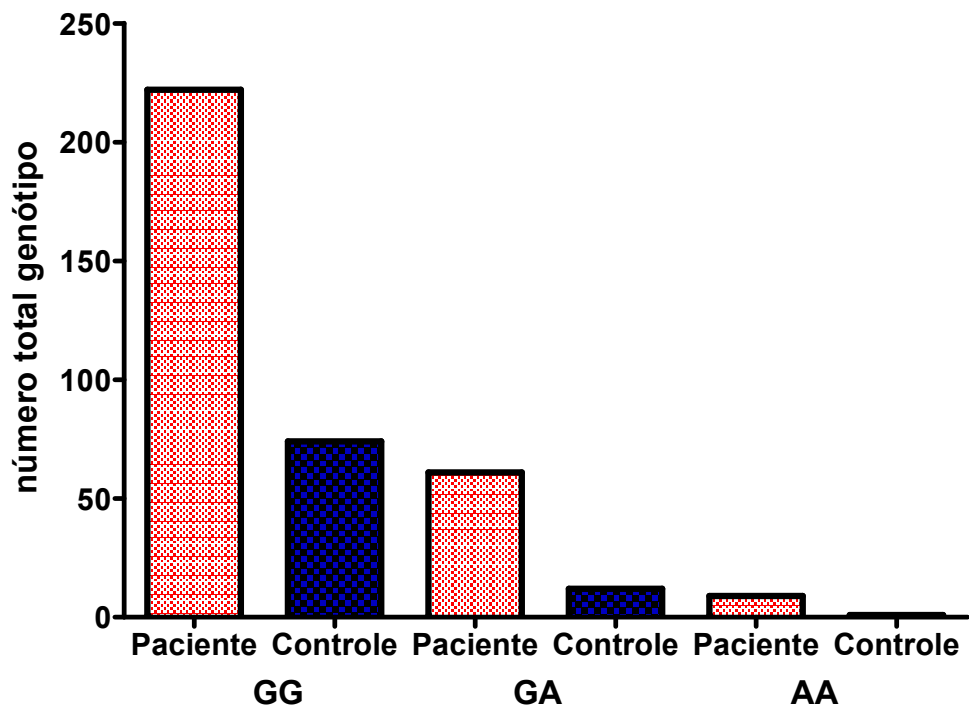


Figura 4.19: Distribuição genotípica de *TNFA* (-308G/A, rs1800629) considerando o grupo de pacientes com DC crônica, realizados através do test de χ^2 ($p= 0,1825$).

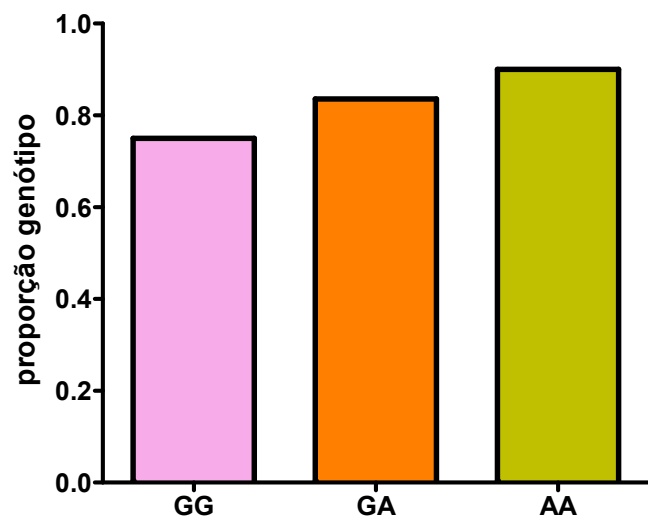


Figura 4.20: Proporção dos genótipos avaliados de *TNFA* (-308G/A, rs1800629) considerando o grupo de pacientes com DC crônica, realizados através do test de χ^2 ($p= 0,1825$).

Para avaliar a possível associação entre a frequência alélica do *TNFA* com a DC, foi observado um valor de Qui-Quadrado muito próximo de nível de significância (Borderline do 5%) de $X^2= 3,742$ e $p=0,053$, no entanto, não houve diferença estatística significativa na frequência de nenhum dos alelos deste SNP (**Tabela 4.13**).

Tabela 4.13: Frequência alélica do SNP de *TNFA* (-308G/A, rs1800629) em pacientes com DC crônica e controle.

<i>TNFA</i> (-308G/A), rs1800629		Grupos				
Alelo	Pacientes	Controles	Total	Pr	a.Pr	Sa.Pr
G	505	160	665	0,7594	383,4962	450,6038
A	79	14	93	0,8495	67,1075	
Total	584	174	758	0,7704	449,9420	
			X^2	3,742		
			<i>P - value</i>	0,053		

Legenda: Pr(i) – proporção primeira coluna; a. Pr(ii)- proporção segunda coluna; Sa. Pr(S)- somatório das proporções.

Em relação à distribuição genotípica do SNP de *IL10*, o teste de Hardy e Weinberg efetuado em ambos os grupos mostrou que somente a distribuição genotípica dos controles estava em equilíbrio (P -value = 0,339), enquanto que nos pacientes essas frequências não se ajustaram ao equilíbrio genético (P -value = 0,007). Como o Qui-Quadrado não foi significativo então inferimos que não existem diferenças na distribuição genotípica para este SNP (**Tabela 4.14** e **Figura 4.21**). Avaliando a proporção de pacientes portadores da DC, considerando cada genótipo encontrado, observamos: 85,5% homozigotos GG, 72,5% heterozigotos GA e 78,3% homozigotos AA (**Figura 4.22**).

Tabela 4.14: Distribuição genótipica do SNP de *IL10* (SNP -1082G/A, rs1800896) entre os grupos de pacientes vs controle.

<i>IL10</i> (-1082G/A), rs1800896		Grupos		Total	Pr	a. Pr	Sa. Pr
Genótipos	Pacientes	Controles					
GG	53	9		62	0,8548	45,3065	
GA	116	44		160	0,7250	84,1000	225,7695
AA	123	34		157	0,7834	96,3631	
Total	292	87		379	0,7704	224,9710	
χ^2				4,5151			
<i>P-value</i>				0,1046			

Legenda: Pr(i) – proporção primeira coluna; a. Pr(ii)- proporção segunda coluna; Sa. Pr(S)- somatório das proporções.

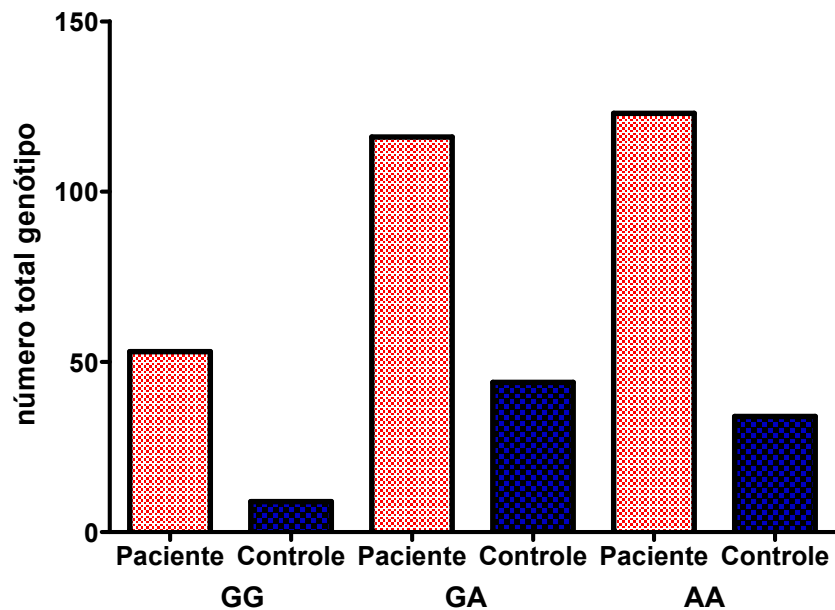


Figura 4.21: Distribuição genótipica de *IL10* (SNP -1082G/A, rs1800896) considerando o grupo de pacientes com DC crônica, realizados através do test de χ^2 .

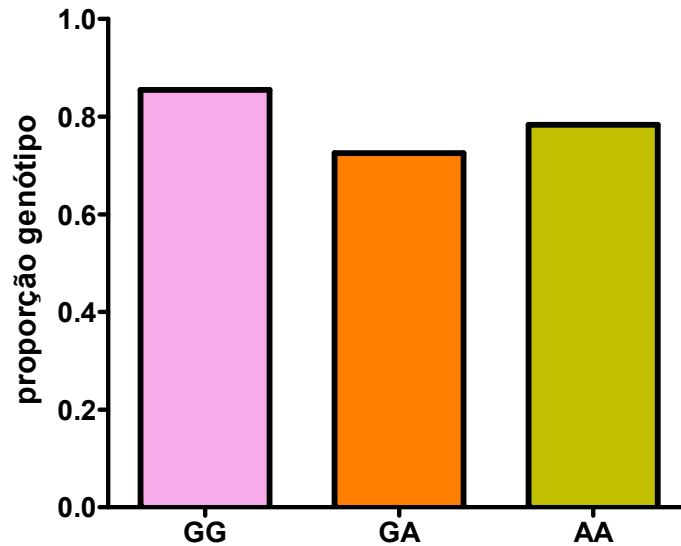


Figura 4.22: Proporção dos genótipos avaliados de *IL10* (SNP -1082G/A, rs1800896) considerando o grupo de pacientes com DC crônica, realizados através do test de χ^2 .

Outra análise realizada para avaliar a possível associação alélica de SNP de *IL10* com a DC foi avaliar a frequência alélica deste polimorfismo nos indivíduos pacientes e controles. No entanto, o valor de Qui-Quadrado encontrado foi muito baixo ($\chi^2=0,325$), dessa maneira sua probabilidade de ocorrência casual é bastante alta (56.9%), O que impossibilita a possível associação alélica com a DC (**Tabela 4.15**).

Tabela 4.15: Frequência alélica do SNP de *IL10* (SNP -1082G/A, rs1800896) em pacientes com DC crônica e controle.

<i>IL10</i> (-1082G/A, rs1800896)		Grupos				
Alelo	Pacientes	Controles	Total	Pr	a.Pr	Sa.Pr
G	222	62	665	0,7594	383,4962	450,6038
A	362	112	93	0,8495	67,1075	
Total	584	174	758	0,7704	449,9420	
			χ^2	0,325		
			P - value	0,569		

Legenda: Pr(i) – proporção primeira coluna; a. Pr(ii)- proporção segunda coluna; Sa. Pr(S)- somatório das proporções.

Na avaliação para a busca de uma possível associação entre os parâmetros, até o momento investigados, foi realizada uma análise dos dados através da correlação de Pearson, na qual foi medida a relação existente entre cada par de variáveis (**Tabela 4.16**). Com isso, foi observado que a forma da DC apresenta uma correlação positiva com a idade ($r = 0,007$), isto é, com o passar dos anos (o quanto mais velho o indivíduo for), maiores as chances de progressão da DC. Observa-se também uma significância de Borderline (0,076%) da correlação da forma clínica da DC com o sexo (neste caso, r negativo: $-0,127$), ou seja, as mulheres apresentam menores chances de progressão da DC. Outro achado é que a forma clínica DC apresenta uma correlação positiva de significância de Borderline com o genótipo AA de *IL10* (-1082G/A) ($p = 0,069$). Em relação à significância Bordeline entre o sexo e idade ($r = -0,145$; $p = 0,052$), observa-se que as mulheres apresentam maior idade média do que os homens, no entanto, foram feitos um teste paramétrico (*t*-student) e um não paramétrico (Mann-Whitney) e em nenhum deles as diferenças foram significativas (a diferença entre as médias foi mulher = 62,67 vs homem = 61,15). Por fim, a correlação entre o sexo com a variável (transformada) SexIdade não tem discussão, pois é totalmente lógica, essa variável criada como "a interação entre o sexo e a idade" é usada quando se presume a existência de uma possível interação entre essas duas variáveis.

Tabela 4.16: Análise pela Correlação de Pearson dos dados Forma Clínica, Idade, Sexo, Carga Parasitária, SexIdade e os SNPs de *TNFA* e *IL10*.

Variáveis	Forma clínica	Idade	Sexo	Carga Parasitária	<i>TNFA</i> -308G/A	<i>IL10</i> -1082G/A	Genótipo de <i>T. cruzi</i>	SexIdade	
Forma clínica	1,000	,218	-,127	-,098	-,050	-,132	-,046	-,120	Coeficientes de Pearson
Idade	,007	1,000	-,145	-,008	,164	-,023	-,012	-,043	
Sexo	,076	,052	1,000	-,043	-,026	,048	-,019	,985	
Carga Parasitária	,135	,463	,317	1,000	,013	-,055	,037	,048	
<i>TNFA</i> (-308G/A)	,289	,032	,385	,440	1,000	,050	,005	,006	
<i>IL10</i> (-1082G/A)	,069	,397	,296	,270	,288	1,000	-,028	,051	
Genótipo de <i>T. cruzi</i>	,304	,447	,417	,339	,479	,376	1,000	,018	
SexIdade	,088	,316	,000	,296	,473	,286	,419	1,000	
<i>P-Values</i>									

Legenda: Coeficientes de Correlação de Pearson (r em verde); Significância (*P-Value* em cinza).

Por fim, para verificar se há alguma associação entre os parâmetros Sexo, Idade, SNP de *TNFA* e SNP de *IL10*, entre si, foi feita uma análise de Regressão Logística Binomial, na qual resultou em não significantes estatisticamente, uma vez que os valores *p* para os SNPs de *TNFA* e *IL10* foi de 0,445 e de 0,573, respectivamente (**Tabela 4.17**).

Tabela 4.17: Análise de Regressão Logística Binomial entre Sexo, Idade e os SNPs dos genes de *TNFA* e *IL10*.

Variável Independente	<i>b</i>	Erro Padrão	Wald	gl	<i>P-value</i>
Constante	3,221	0,744	18,734	1	0,000
Sexo	-,614	0,280	4,821	1	0,028
Idade	-,074	0,012	37,453	1	0,000
<i>TNFA</i> rs1800629	-,237	0,311	0,584	1	0,445
<i>IL10</i> rs1800896	0,104	0,184	0,318	1	0,573

Legenda: *b*- coeficientes do modelo de regressão; Wald- Teste Wald; gl- grau de liberdade

5. Discussão

Investigações clínico-epidemiológicas para avaliação da morbidade e evolução da DC, conduzidas em diferentes regiões do Brasil, demonstram uma grande diversidade regional quanto à severidade da doença, tornando-se complexas as comparações entre áreas geográficas (Coura & Borges-Pereira, 2010; Dias *et al.*, 2016; Bello Corassa *et al.*, 2017; Martins-Melo *et al.*, 2019; Góes *et al.*, 2020; Lidani *et al.*, 2020). Entre os elementos que podem influenciar tal variabilidade, podem ser destacados as diferenças na casuística relacionadas ao componente imunogenético do indivíduo, fatores ambientais e a diversidade genética do parasito distribuída em regiões geográficas distintas (Miles *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2004; Macedo *et al.*, 2004;). A heterogeneidade genética associada ao caráter multiclonal das populações naturais de *T. cruzi*, tem sido considerada um fator fundamental na evolução clínica da doença, uma vez que, juntamente com o genótipo do hospedeiro, está envolvida na dispersão do parasito para diferentes tecidos (histiotropismo), na fisiopatologia, eventual desfecho da infecção, susceptibilidade a drogas e na ampla diversidade regional da DC (Andrade 1974; Andrade *et al.*, 1985; Zhang & Tarleton 1999; Campbell *et al.*, 2004; Macedo *et al.*, 2004). Porém, mesmo com um aumento de conhecimento quanto à distribuição das DTUs nas diferentes áreas endêmicas, os estudos ainda são limitados em pacientes na fase crônica, que confirmem uma possível associação das linhagens genéticas de *T. cruzi* com o prognóstico e a epidemiologia da DC, sendo a maioria destes, direcionados para a associação entre genótipos específicos e a forma cardíaca da DC (Ledezma *et al.*, 2020).

No presente trabalho, a partir de uma coorte urbana constituída por 294 pacientes crônicos portadores de formas clínicas distintas da DC e nascidos em diferentes regiões do Brasil (além de um indivíduo do Peru e outro do Chile), nos propomos a avaliar parâmetros relacionados ao parasito, como a estimativa de carga parasitária em sangue e a identificação das linhagens genéticas (DTUs) de *T. cruzi*; assim como a análise de polimorfismos genéticos em genes de citocinas nos pacientes, após a padronização e validação da metodologia molecular de HRM. O entendimento da estrutura populacional de *T. cruzi* se torna essencial para elucidar quais DTUs do parasito estão associadas às diferentes formas da DC crônica e seus desfechos.

Em relação à caracterização molecular de *T. cruzi* nas seis DTUs, utilizamos a metodologia de genotipagem baseada em um algoritmo de marcadores moleculares desenvolvido por Moreira e Ramírez (2019), a partir de combinações de dois protocolos previamente publicados (Burgos *et al.*, 2010, Ramirez *et al.*, 2010). A genotipagem molecular foi realizada diretamente do sangue periférico dos pacientes, refletindo assim a complexidade genética de parasitos encontrada em infecções naturais, sendo capaz de identificar infecções mistas. A PCR multilocus é recomendada pelo consenso de especialistas para uso em amostras clínicas (Zingales *et al.*, 2012). Por outro lado, a genotipagem de isolados de parasitos, a partir de cultivo, pode levar a erros de identificação de genótipos menos frequentes, presentes em infecções mistas, uma vez que as populações dos parasitos que crescem em uma taxa mais elevada são mais prováveis de serem detectadas pelas estratégias de tipagem disponíveis (de Oliveira *et al.*, 2015; Volpato *et al.*, 2017; D'Ávila *et al.*, 2018; Monje-Rumi *et al.*, 2020; Nielebock *et al.*, 2020). Porém, deve ser ressaltado, que uma limitação para a caracterização direta de DTUs em sangue, se refere, particularmente, aos pacientes crônicos com parasitemias muito baixas (Sousa *et al.*, 2006).

Neste estudo, foi possível identificar com precisão, as DTUs de *T. cruzi* em 105 (80,8%) das 130 amostras de sangue, as quais foram positivas por qPCR. Esse percentual foi bem similar ao encontrado em um estudo anterior do nosso grupo, envolvendo uma coorte distinta de 65 pacientes crônicos portadores das formas cardíaca e indeterminada da DC, assistidos também no INI (Fiocruz) (Rodrigues-dos-Santos *et al.*, 2018). Nas 25 amostras (19,2%) restantes, o algoritmo utilizado não foi capaz de diferenciar entre TcII/TcVI, o que também corrobora com Rodrigues-dos-Santos e colaboradores, que encontraram, em 20% dos pacientes, o resultado parcial de genótipos TcII/TcVI. No presente estudo, com exceção de um único paciente (TcII/TcVI + TcV) que apresentou a menor carga parasitária ($0,003 \pm 0,002$ eq. parasitos/mL), para os demais que obtiveram resultados parciais de genotipagem (TcII/TcVI), a mediana de carga parasitária deste grupo foi semelhante aquela encontrada no grupo TcVI. Na metodologia de genotipagem usada para esse trabalho, o alvo A10 do algoritmo, é aquele que permite diferenciar entre as DTUs TcII e TcVI. Já foi observado, para este alvo, uma sensibilidade dez vezes menor para a detecção de TcIIb (atual TcII), comparado à TcIIe (atual TcVI) (Burgos *et al.*, 2007). Além disso, a sensibilidade analítica do protocolo de genotipagem por PCR

multilocus foi avaliada, a partir de amostras de sangue reconstituídas, revelando o pior limite de detecção para TcII (amplificação do fragmento de 580 pb), com o alvo A10 (Rodrigues-dos-Santos *et al.*, 2018). Em conjunto, estes fatores poderiam justificar a não resolução entre os genótipos TcII e TcVI, em cerca de 20% dos pacientes avaliados neste estudo e por Rodrigues-dos-Santos e colaboradores (2018).

Um estudo semelhante, realizado no Chile, objetivando a validação de um método de genotipagem por SYBR green PCR em tempo real e com o uso de dois alvos nucleares (SL-IR e 18S rDNA) e dois mitocondriais (COII e ND1), em reações independentes, possibilitou a caracterização molecular de *T. cruzi* em 67,9% das amostras clínicas de pacientes portadores da DC, na fase crônica, com elevada detecção de TcII seguido por TcI (Muñoz *et al.*, 2017). Com o desenvolvimento de sondas TaqMan para qPCR, foi possível a caracterização em DTUs de amostras biológicas (83% de triatomíneos e 96% de reservatórios) e amostras clínicas de 100% dos pacientes na fase aguda, sendo, 62,5% de crianças com infecção congênita e 50% de pacientes com reativação clínica da DC. Porém, a sensibilidade do método para a genotipagem direta a partir de amostras de sangue de pacientes com DC crônica, foi menor, comparada ao algoritmo de PCR convencional, sendo de 32,8% para os indivíduos assintomáticos e 22,2% para aqueles com sintomas clínicos (formas cardíaca, digestiva e mista). O sistema TaqMan de qPCR também foi menos sensível para a detecção de infecções mistas quando comparado à PCR convencional (Cura *et al.*, 2015).

No Brasil, infecções por TcII e TcVI prevalecem em áreas rurais de transmissão domiciliar pelo inseto vetor, sendo estes os principais genótipos de *T. cruzi* encontrados nos pacientes na fase crônica, (Lages-Silva *et al.*, 2006; Zingales *et al.*, 2012, Zingales 2018; de Oliveira *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2017; Rodrigues-dos-Santos *et al.*, 2018; D'Ávila *et al.*, 2018; Nielebock *et al.*, 2020). No presente trabalho, TcII e TcVI foram as DTUs mais frequentes, com taxas de prevalência similares (39,2 e 38,5%, respectivamente), enquanto no estudo de Rodrigues-dos-Santos e colaboradores (2018), TcVI foi a DTU mais prevalente (40%) comparada à TcII (17,1%). Uma predominância de 91,7% de isolados TcII foi demonstrada no Rio Grande do Norte, semelhante ao que foi observado no Vale do Jequitinhonha, em Minas Gerais (Câmara *et al.*, 2010; de Oliveira *et al.*, 2015). Um trabalho envolvendo nove pacientes crônicos, nascidos no Brasil, demonstrou uma maior prevalência de

TcII (66,7%) em relação à TcVI (22,2%), além da identificação de um paciente infectado por TcI (11,1%), após o isolamento do parasito de amostras de sangue dos pacientes (Oliveira *et al.*, 2017). No estudo de D'Ávila e colaboradores (2018), foi feito um isolamento prévio dos parasitos por hemocultura em 91 pacientes crônicos na forma indeterminada e cardíaca; e das 21 amostras positivas, que foram submetidas à genotipagem molecular todas as demais resultaram em genótipos TcII, com exceção de uma única (TcV/VI) . Em um estudo retrospectivo, seguindo a mesma abordagem para o isolamento prévio de parasitos, TcII foi a principal DTU identificada em pacientes crônicos oriundos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil (92,9%) portadores da forma cardíaca, indeterminada ou mista da DC (em um total de 43 pacientes), sendo TcVI encontrada em apenas dois pacientes, representando 4,8% dos casos (Nielebock *et al.*, 2020). Os autores também demonstraram que complicações importantes da DC, como insuficiência cardíaca e parada cardíaca súbita, além de uma maior mortalidade; ocorreram em pacientes infectados por TcII (Nielebock *et al.*, 2020).

De forma distinta, no nosso estudo, TcVI estava presente em todas as regiões brasileiras que tiveram pacientes com resultados positivos pela qPCR, além do paciente do Peru. Enquanto TcII só não foi detectada no Sul do Brasil, apesar de um indivíduo do RS apresentar o genótipo TcII/TcVI, da mesma forma como ocorreu para o paciente do Chile. O caso do Chile foi identificado como TcII/TcVI, sendo TcII a DTU mais frequentemente encontrada neste país, seguida por TcI (Muñoz *et al.*, 2017). Nossos dados estão parcialmente de acordo com a literatura, que sugere a ampla distribuição de TcII no ciclo doméstico da DC, desde o Nordeste até o Sul do Brasil, e TcVI em todo o Sudeste e Sul, incluindo a região Centro-Oeste (Lages-Silva *et al.*, 2006; Zingales *et al.*, 2012; Rodrigues-dos-Santos *et al.*, 2018). Porém, encontramos 31 pacientes (29,5%) com infecção por TcVI na região Nordeste, em conjunto com 39 pacientes (37,1%) infectados por TcII na mesma região; além de 16 casos (15,2%) de genótipos TcII/TcVI. Outros estudos também identificaram TcVI ocupando a mesma distribuição espacial que TcII, quer como infecção única ou mista, TcII + TcVI (de Oliveira *et al.*, 2015; Sangenis *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2017; Rodrigues-dos-Santos *et al.*, 2018; Nielebock *et al.*, 2020). A extensa distribuição de ambas, TcII e TcVI, observada ao longo do Brasil, sugere que estas linhagens de *T. cruzi* estejam ocorrendo em áreas epidemiológicas sobrepostas (Rodrigues-dos-Santos *et al.*, 2018). Comparado ao estudo de Rodrigues-dos-

Santos e colaboradores(2018), nossos dados recentes possibilitaram ampliar o conhecimento sobre a distribuição da diversidade genética de *T. cruzi*, reportando casos de infecção pelo parasito nos estados do Piauí (forma cardíaca, TcII/TcVI) e Mato Grosso do Sul (forma indeterminada, TcVI). Neste último estado, também foi relatada infecção por TcII em um paciente crônico na forma indeterminada da DC (Nielebock *et al.*, 2020). A literatura também cita TcVI como sendo uma linhagem relevante associada à infecção em humanos na região do Chaco e em países vizinhos como Bolívia, Chile, norte da Argentina e sul do Brasil (Valadares *et al.*, 2007; Cardinal *et al.*, 2008; Burgos *et al.*, 2010).

Casos humanos de infecção por TcV, no Brasil, somente foram reportados pelo estudo prévio de nosso grupo (Rodrigues dos Santos *et al.*, 2018), corroborando com os dados do presente trabalho, de distribuição de TcV na Bahia, além de coinfeções com esta DTU (TcII+TcV e TcII/TcVI+TcV) em outros dois estados, Paraíba e Minas Gerais, respectivamente, sendo que ambos pacientes estavam com a forma indeterminada da doença. Esses resultados sugerem que a área de transmissão de TcV deva ser maior que a estimada, destacando a importância desta, como a principal DTU correlacionada à infecção humana por *T. cruzi* no Chaco Argentino e Bolívia (Monje-Rumi *et al.*, 2015). A terceira infecção mista identificada (TcII+TcIV), correspondeu a um paciente portador da forma cardíaca (estágio C), nascido em Pernambuco. A identificação de pacientes coinfectados por duas DTUs ressalta a importância de realizar a genotipagem molecular diretamente do sangue, em relação ao emprego de métodos clássicos para isolamento prévio do parasito (Monje-Rumi *et al.*, 2015). Pelo nosso conhecimento, existem apenas quatro relatos, no Brasil, da ocorrência de TcIV em humanos. O primeiro, observado por Marcili e colaboradores. (2009c), no qual observaram a presença desta DTU em quatro pacientes oriundos do Pará e um paciente do Amapá. O segundo relato foi feito por Monteiro e colaboradores (2012), onde analisaram 46 amostras de pacientes na fase aguda e um paciente com a forma cardíaca crônica, todos oriundos do Amazonas. Identificaram TcIV em todas as amostras analisadas, seja como infecção única ou mista. Dario e colaboradores (2016), relataram um caso fatal decorrente da fase aguda da DC, no Espírito Santo, com a identificação de TcIV no tecido cardíaco de uma criança, além de três outras DTUs (TcI, TcII e TcIII), e infecção concomitante com *Trypanosoma dionisii*, um tripanosomatídeo de morcego. E, por fim, Esper e colaboradores (2019), publicaram

outro caso fatal, por transmissão oral, que levou a uma infecção aguda em uma criança no estado do Pará, e o genótipo TcIV de *T. cruzi* foi identificado no sangue da paciente. No presente trabalho, em Pernambuco, identificamos dois pacientes com a forma cardíaca, infectados por TcIV e uma infecção mista TcII+TcIV. Nossos resultados, somados à relatos da literatura, sugerem que a distribuição das DTUs de *T. cruzi*, TcIII, TcIV e TcV, nos biomas do Brasil, seja mais ampla do que como é conhecida atualmente (Dario *et al.*, 2016; Rodrigues-dos-Santos *et al.*, 2018).

Nossos resultados revelaram que os genótipos TcII e TcVI estavam distribuídos em todas as formas clínicas, não apresentando nenhum tipo de associação específica. O mesmo foi observado na Argentina e Bolívia, em pacientes portadores de CCC ou doença digestiva, em que TcII, TcV ou TcVI foram identificados e não foram relacionados com a manifestação clínica (Cura *et al.*, 2012; del Puerto *et al.*, 2010). No presente estudo, a frequência de cardiomiopatia chagásica foi de 43,2% nos pacientes infectados por TcII e de 35,1% naqueles com infecção por TcVI; enquanto Rodrigues-dos-Santos e colaboradores (2018) encontraram frequências de 16,7% e 50% para TcII e TcVI, respectivamente. No Brasil, já foi demonstrada a associação de TcVI com ambas as formas, cardíaca e indeterminada da DC crônica (Sangenis *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2017; Rodrigues-dos-Santos *et al.*, 2018); e TcII tem sido a DTU mais frequentemente encontrada, associada às formas cardíaca crônica severa e digestiva (Lages-Silva *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2017; Volpato *et al.*, 2017; Rodrigues-dos-Santos *et al.*, 2018; Nielebock *et al.*, 2020). No presente trabalho, dos 7 pacientes portadores da forma digestiva da DC, 4 apresentaram o genótipo TcII (Sergipe, Paraíba e Bahia) e 3 estavam infectados por TcVI (Sergipe, Bahia e Peru), o que faz ampliar a associação de TcVI com a forma digestiva crônica da DC no Brasil.

Comparamos carga parasitária dos indivíduos portadores de diferentes formas clínicas e níveis variados de progressão da cardiomiopatia, sexo e faixa etária. Mesmo considerando a parasitemia reduzida e transiente, característica da fase crônica da DC, a metodologia de qPCR em multiplex com sondas TaqMan foi capaz de diagnosticar e estimar a carga parasitária em 44,2% (130/294) dos pacientes. Em outros estudos que utilizaram o mesmo alvo (satDNA) em sistema TaqMan, para a detecção/quantificação de *T. cruzi* em amostras de sangue de pacientes com DC crônica, as taxas de positividade foram variáveis. Uma taxa de detecção de 80,7% (117/145), envolvendo indivíduos do Brasil, México, Bolívia,

Colômbia, Espanha (imigrantes da Bolívia) e Argentina foi observada por Ramirez e colaboradores (2015). Na Colômbia, 481 de 622 (77,3%) pacientes crônicos com a forma indeterminada ou com sintomatologia cardíaca, foram positivos, sendo detectada a presença de DNA de *T. cruzi* no sangue, por qPCR (Hernández *et al.*, 2016). Em Rodrigues-dos-Santos e colaboradores (2018), o índice de positividade obtido com pacientes crônicos do Brasil foi de 53,8% (35/65). Uma positividade semelhante foi encontrada por D' Ávila e colaboradores (2018), com a detecção de DNA do parasito em 58,5% (79/153) das amostras de sangue. Curiosamente, os autores demonstraram que para um grupo de pacientes (n=44) que tiveram duas amostras de sangue coletadas em tempos distintos, com intervalos de 2 a 3 anos entre as coletas, a positividade da qPCR aumentou de 40,9% para 68,2% (D' Ávila *et al.*, 2018).

Já foi demonstrado que a carga parasitária de pacientes crônicos portadores da DC cardíaca no Brasil, é significativamente menor, comparada aos pacientes de outros países endêmicos (Moreira *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2015; Melo *et al.*, 2015; Tavares de Oliveira *et al.*, 2020), o que corrobora com nossos resultados, relacionados ao menor índice de positividade em pacientes do Brasil (Rodrigues-dos-Santos *et al.*, 2018; D' Ávila *et al.*, 2018). Também deve ser ressaltado que a maioria dos pacientes do nosso estudo (70,8%, 92/130) apresentaram parasitemias abaixo do limite de quantificação (LOQ = 1,53 eq. parasitos/mL), inferido por Duffy e colaboradores (2013) durante a padronização da qPCR multiplex direcionada ao alvo nuclear de satDNA. Este limite de quantificação indica que cargas parasitárias abaixo deste valor podem ser consideradas detectáveis, porém não quantificáveis. Considerando que, no presente trabalho, a maioria das amostras de pacientes do Brasil refletem esta condição, optamos por relatar os valores de carga parasitária de todas as amostras positivas por qPCR. A carga parasitária de *T. cruzi* variou entre 0,002 a 72,21 eq. par./mL, com mediana igual a 0,390 [0,0700 - 2,050] eq. par./mL, valor este, inferior ao encontrado em demais estudos envolvendo pacientes com DC crônica do Brasil, Argentina, Bolívia, Colômbia e México, onde as medianas de carga parasitária variaram de 1,18 até 4,0 eq. par./mL (D' Ávila *et al.*, 2018; Rodrigues-dos-Santos *et al.*, 2018; Duffy *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2020). Entretanto, os valores mínimo e máximo de carga parasitária, encontrados aqui, estão de acordo com o que foi

observado em pacientes crônicos do Chile (<0.1 a 78 par. eq./mL) (Muñoz *et al.*, 2017).

Comparando a carga parasitária entre os pacientes com ou sem CCC e, também, entre aqueles classificados nos diferentes estágios de CCC, foram observados níveis variados de parasitemia em relação às formas clínicas, idade e sexo. Em relação ao sexo e faixa etária dos pacientes, não houve diferença estatística na carga parasitária entre os grupos; sendo o mesmo foi observado em Rodrigues-dos-Santos e colaboradores (2018). Entretanto, no grupo de mulheres entre 55-74 anos houve uma leve tendência a uma maior carga parasitária, e ainda foi possível observar um maior número de casos de CCC (estágio A) neste grupo.

Considerando as diferentes formas clínicas da DC, também não houve diferença estatística na carga parasitária entre os grupos de homens e mulheres. No grupo de pacientes homens entre 35-54 anos pode ser observada uma tendência para o aumento da carga parasitária; e para este mesmo grupo, houve uma maior frequência da forma clínica cardíaca (estágios B1+B2, C+D) quando comparado às mulheres da mesma faixa-etária. Quando os grupos de pacientes foram comparados, independente do sexo, considerando somente a faixa etária, houve uma tendência no aumento da carga parasitária no grupo de 55-74 anos, provavelmente por ser o grupo com o maior número de representantes e com uma variação maior na carga parasitária (mín= 0,002 eq. de parasitos/mL e máx=32,33 eq. de parasitos/mL). A maior carga parasitária quantificada foi de $72,21 \pm 8,56$ eq. de parasitos/mL, relacionada à um paciente do sexo masculino, de 40 anos de idade e portador de CCC (estágio B1). O indivíduo mais idoso (86 anos), com carga parasitária detectável ($0,33 \pm 0,16$ eq. de parasitos/mL), era do sexo feminino, portadora da forma mista da DC. Os resultados encontrados foram similares aos obtidos por Rodrigues-dos-Santos e colaboradores (2018), excetuando-se que, naquele estudo, o paciente que exibiu a maior carga parasitária ($153,66 \pm 27,49$ eq. de parasitos/mL), possuía 74 anos de idade, com histórico de infarto do miocárdio, insuficiência renal crônica, associados a *diabetes mellitus*, critérios de exclusão para o presente estudo.

Estimamos a carga parasitária e realizamos a caracterização molecular do parasito utilizando a mesma amostra de DNA. Correlacionando os dados entre si, de acordo com a apresentação clínica do paciente, não foi possível observar nenhuma associação entre carga parasitária, genótipo de *T. cruzi* e manifestação clínica,

assim como observado em estudos prévios (Ramirez *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2016; Muñoz *et al.*, 2017; Rodrigues-dos-Santos *et al.*, 2018; D'Ávila *et al.*, 2018; Tavares de Oliveira *et al.*, 2020; Nielebock *et al.*, 2020). Destaca-se, uma tendência de alta carga parasitária nos pacientes apresentando infecção única por TcII em relação às demais DTUs, sendo que este genótipo está presente em 43,2% dos casos de CCC, seguido por TcVI, em infecção única, identificado em 35,1% dos pacientes CCC. Rodrigues-dos-Santos e colaboradores (2018), também observaram cargas parasitárias mais elevadas em pacientes infectados por TcII (mediana de 7,56 eq. par./mL), comparado às infecções por TcVI (mediana de 2,35 eq. par./mL). É provável que a ausência de associação entre os parâmetros aqui analisados seja devido à presença do parasito por órgãos ou tecidos específicos do hospedeiro, o que poderia resultar nas diferentes manifestações clínicas da DC (Melo & Brener, 1978; Andrade *et al.*, 1985). Neste contexto, os parasitos derivados do sangue periférico podem não representar as populações de *T. cruzi* encontradas em outros tecidos ou órgãos dos pacientes (Vago *et al.*, 2000; Burgos *et al.*, 2005, 2010). Adicionalmente, é altamente provável que fatores imunológicos do hospedeiro, em conjunto com as variações genéticas do parasito devam contribuir para a diversidade de apresentação clínica da DC (Zingales 2018).

Além de avaliar os critérios genéticos do parasito no presente trabalho, também foram analisadas as variáveis genéticas do hospedeiro vertebrado, quanto à identificação de polimorfismos de base única em genes de citocinas, comparando os pacientes com DC e os indivíduos controles. Para isso, padronizamos e validamos a técnica de *High-Resolution Melting* para a análise de 15 polimorfismos presentes nas regiões promotoras de 12 genes que codificam citocinas. O HRM é uma metodologia utilizada para análises de dissociação de DNA, introduzida em 2002 através de uma colaboração entre academia (Universidade de Utah, UT, EUA) e indústria (Idaho Technology, UT, EUA). Apesar de existirem inúmeros métodos de genotipagem; as técnicas que não necessitam de etapas de manipulação da amostra ao longo do processo (“tubo fechado”) possuem grandes vantagens para o laboratório clínico, o diagnóstico *point-of-care* e a medicina personalizada. Uma vez que não há exigência de processamento do material entre a amplificação e a análise, a necessidade de automação e o risco de contaminação são eliminados. Convencionalmente, estes métodos utilizam sondas alelo-específicas, normalmente marcadas com corante fluorescente e um *quencher* que se separam durante a

amplificação através da hidrólise e/ou perda da estrutura secundária das sondas (Wittwer & Kuskawa 2005).

Visto que não há obrigatoriedade do uso de sondas fluorescentes, a metodologia de HRM possui vantagens de custo e simplicidade de interpretação dos resultados frente a outras abordagens para genotipagem. A exemplo da técnica considerada padrão ouro para genotipagem de polimorfismos, o sequenciamento de Sanger é uma metodologia de custo-benefício consideravelmente elevada quando comparada ao HRM. Para a realização da técnica de Sanger, exige-se uma demanda maior de tempo entre as etapas, custo elevado dos kits de sequenciamento, além da interpretação dos resultados ser dependente de outros recursos, como banco de dados na internet.

A metodologia de HRM é muito suscetível às concentrações de íons, razão pela qual somente amostras com condições idênticas de tampão (p. ex. mesmo método de extração de DNA) devem ser analisadas na mesma corrida (Reed *et al.*, 2007; Schütz & von Ahsen 2009; Naue *et al.*, 2014). Por estarmos padronizando e validando os ensaios de HRM para o conjunto de 15 alvos polimórficos a serem testados, foi necessária a confirmação dos nossos resultados através de sequenciamento por Sanger (Anexo 4). Embora seja um método laborioso e demorado, o sequenciamento por Sanger é uma técnica precisa para a obtenção da informação da sequência de DNA dos produtos amplificados. Uma limitação do método de HRM é que não se pode aplicá-lo facilmente em ensaios multiplex, ou seja, para a genotipagem simultânea de variantes presentes em fragmentos de DNA distintos. Teoricamente, ensaios multiplex podem ser realizados explorando as diferenças nas cores das curvas geradas, diferenças nas temperaturas, ou ambas.

HRM é um método simples de usar, possui custo consideravelmente mais baixo, sensibilidade e especificidade altas, tornando-se uma técnica de escolha para mapear e identificar polimorfismos de base única presentes no material genético, variantes de patógenos em pacientes, principalmente em casos de doenças negligenciadas.

Dos dois polimorfismos relacionados a genes de citocinas que foram aqui estudados, para avaliar se existe suscetibilidade à DC ou a sua progressão, não foram observadas associações significativas nas frequências genotípicas e alélicas de *TNFA* (-308G/A, rs1800629) e de *IL10* (SNP -1082G/A, rs1800896) com o desenvolvimento da DC crônica. Porém, um valor de Qui-Quadrado muito próximo

ao nível de significância (de 5%), $X^2= 3,742$ e $p=0,053$, foi observado quando houve avaliação de possível associação da frequência alélica do *TNFA* com a DC, sugerindo que, aumentando o tamanho amostral ou através de uma avaliação por meta-análise, seja possível observar a associação do alelo A com a doença.

A importância do TNF- α (citocina pró-inflamatória) na patogenia da DC fez essa citocina ser uma das primeiras a ser estudadas e permanece sendo a mais estudada no que diz respeito a SNPs e suscetibilidade a doença. Alguns estudos sugerem que a produção de TNF- α nos órgãos afetados pela DC seja parcialmente responsável pela gravidade da patologia. Uma frequência maior de linfócitos produtores de TNF- α e níveis plasmáticos aumentados foram reportados em pacientes portadores da DC crônica, havendo uma forte correlação com o grau de disfunção cardíaca (Ferreira *et al.*, 2003; Talvani *et al.*, 2004; Lorena *et al.*, 2010; Lannes-Vieira *et al.*, 2011). Inclusive, já foi reportado que ocorre redução dos níveis séricos de TNF- α em pacientes com CCC e tratados com amiodarona (Rodríguez-Ângulo *et al.*, 2017), assim como o tratamento com dose subótima de BNZ também leva a uma redução dessa citocina no modelo murino de fase crônica (Villar-Pereira *et al.*, 2016).

Associações entre polimorfismos genéticos do gene *TNFA* foram descritas em diversos estudos sobre doenças infecciosas e não-infecciosas. Os alelos -1031C e -308A foram associados ao aumento da expressão gênica de *TNFA* e a produção da proteína (Wilson *et al.*, 1997; Higuchi *et al.*, 1998; Sohail *et al.*, 2008); e como consequência, maior resposta inflamatória e dano tecidual.

O gene de *TNFA* contém vários SNPs, sendo apenas dois, os mais estudados. O primeiro está localizado na posição -238 e o segundo na posição -308 em relação ao sítio de início da transcrição, no qual a presença de guanina (G) define o alelo do tipo selvagem. Foi demonstrado que para ambas as posições, a presença de adenina (A) resulta em uma maior transcrição do gene, com implicações funcionais (Wilson *et al.*, 1997).

As citocinas pró inflamatórias desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da CCC (Ferreira *et al.*, 2003; Rodríguez-Ângulo *et al.*, 2017). No presente trabalho, o polimorfismo *TNFA* (-308, rs1800629) não apresentou associação significativa ao risco de DC, apenas uma tendência ao risco à doença nos portadores do alelo A. Os polimorfismos no gene de *TNFA* foram avaliados,

anteriormente, em populações do Peru, México, Brasil e Colômbia, e os resultados obtidos foram conflitantes. Objetivando investigar a influência dos polimorfismos de *TNF* na DC, *TNFA* (SNPs -308 rs1800629, -244 rs673, -238 rs361525, e -1031 rs1799964) e genótipos de *TNFB* foram analisados por Beraún e colaboradores (1998). Não foi observada diferença significativa destes alelos ou haplótipos, entre os pacientes e controles, em uma população peruana. O alelo *TNFA-308A* também não foi associado com CCC nos pacientes brasileiros (Drigo *et al.*, 2007, Alvarado-Arnez *et al.*, 2018). Porém, em outro estudo com pacientes do Brasil, 42 indivíduos com CCC, portadores do alelo A (*TNFA-308A*), demonstraram uma associação entre este alelo e morte precoce (Drigo *et al.*, 2006). Entretanto, este mesmo SNP pode estar envolvido diretamente na suscetibilidade genética da fase crônica e o desenvolvimento da CCC na população mexicana (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2005). Outro estudo, também em pacientes brasileiros, sugere que o alelo *TNFA-238A*, o qual está correlacionado com a produção de níveis significativos de $TNF-\alpha$, pode influenciar a suscetibilidade à infecção (Pissetti *et al.*, 2011). Os alelos *TNFA-1031C* e *-308A* foram associados significativamente ao desenvolvimento de CCC, enquanto que os genótipos *TNFA-1031TT* e *-308GG* foram associados com o baixo risco de desenvolvimento de CCC, em uma população colombiana (Criado *et al.*, 2012).

Estes resultados discrepantes podem estar relacionados ao tamanho amostral pequeno, assim como às diferenças na frequência alélica entre as populações de estudo, o que poderia explicar algumas falhas na tentativa de encontrar alguma associação. Diferenças na estrutura genética e étnica das populações também podem ser o motivo para o encontro de diferentes perfis de suscetibilidade a CCC, relacionados ao gene *TNFA* (Pissetti *et al.*, 2011). Adicionalmente, estes resultados discordantes podem ser justificados, tendo como baseo desequilíbrio de ligação que ocorre entre o gene de *TNFA* e os genes *HLA* (Shaw *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2007). A respeito disso, o forte desequilíbrio de ligação observado na região MHC, especialmente na região central entre os genes *HLA* classes I e II, com mais de 50 genes envolvidos, incluindo *TNFA*, contribui para a formação de haplótipos extendidos que foram associados às doenças infecciosas e inflamatórias (Vejbjesya *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2010) e sugerido na DC (Nieto *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2004).

Em relação à DC, foi observado que pacientes infectados com *T. cruzi* exibem níveis de $TNF-\alpha$ aumentados no plasma comparados aos indivíduos não infectados.

Este aumento pode ser até 4 vezes maior nos pacientes assintomáticos e naqueles com CCC e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) >50%, e 8 vezes maior em pacientes com CCC e FEVE ≤50%, comparados aos indivíduos não infectados. (Ferreira *et al.*, 2003). Esta correlação entre os níveis de TNF- α e a piora no quadro de CCC, estabelecida por uma redução de FEVE, também foi descrita por Sousa e colaboradores (2017). A caracterização funcional da produção de citocina e sua associação aos fenótipos da doença ou aos genótipos dos polimorfismos representam um desafio na DC. A estrutura complexa da região 6p21 do cromossomo 6 (envolvendo os genes LTA/TNF/BAT1), pode sugerir que outros sítios polimórficos além do -308 (rs1800629) afetem os níveis de TNF- α (Ramasawmy *et al.*, 2007). Uma meta-análise de estudos funcionais, direcionada para melhor compreender a influência do polimorfismo -308 sob os níveis de TNF- α , resultou na ausência de efeitos deste SNP em nível de mRNA (Mekinian *et al.*, 2011). O mesmo resultado foi encontrado por Alvarado-Arnez e colaboradores (2018). Ao todo, estes achados sugerem que TNF- α deva ser, meramente, um componente de um perfil inflamatório complexo associado à cardiomiopatia na DC, ao invés de atuar como único fator determinante.

A miocardite crônica é a principal causa de morbidade e mortalidade na DC, com prognóstico determinado através da averiguação da gravidade das lesões cardíacas, as quais são correlacionadas ao processo inflamatório do miocárdio (Reis *et al.*, 1993; Dutra & Gollob 2008). A produção de IL-10 e INF- γ por células T regulatórias promove o controle da infecção por *T. cruzi* e protege contra a miocardite aguda fatal (Flórez *et al.*, 2006; Cruz-Robles *et al.*, 2009; D'Ávila *et al.*, 2009; Roffê *et al.*, 2012).

O polimorfismo *IL-10* -1082G/A, que se situa na região promotora do gene *IL10*, foi associado ao desenvolvimento de doenças autoimunes e/ou inflamatórias (Edward-Smith *et al.*, 1999; Koch *et al.*, 2001). No presente estudo, a comparação entre os indivíduos não infectados (controles) e indivíduos infectados (pacientes), em relação as frequências genótípicas e alélicas para este polimorfismo, não mostrou diferença significativa. No entanto, quando foi utilizada a correlação de Pearson, notou-se uma tendência a uma associação entre o genótipo AA e a progressão da DC, porém, essa informação ainda necessita ser confirmada, aumentando o tamanho do número amostral do estudo. Em relação a citocina regulatória IL-10, um estudo envolvendo uma população brasileira demonstrou que o

alelo A de *IL-10* -1082 foi correlacionado com a baixa expressão de IL-10 e suscetibilidade à CCC (Costa *et al.*, 2009). É admissível que a suscetibilidade genética para a produção de níveis reduzidos de IL-10 pode predispor os indivíduos infectados por *T. cruzi*, ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória mais intensa, e assim, ao desenvolvimento da cardiomiopatia. Embora esta associação apresente uma possibilidade interessante, também é notável mencionar que nem todos os pacientes com a forma cardíaca exibem um genótipo de baixa produção de IL-10 (Dutra *et al.*, 2014; Salvador *et al.*, 2020).

Por outro lado, como visto anteriormente em uma população colombiana (Flórez *et al.*, 2011) e recentemente, em uma população brasileira (Alvarado-Arnez *et al.*, 2018), assim como o presente estudo, envolvendo pacientes com DC oriundos de diversas regiões brasileiras e dois indivíduos de países vizinhos (Peru e Chile), não houve associação entre o conjunto de alelos e genótipos de *IL-10* com a clínica da DC. Costa e colaboradores (2009) analisaram a expressão do níveis séricos de IL-10 e a correlacionaram com os valores de FEVE, observando que uma maior expressão de IL-10 está relacionada a uma melhor função cardíaca, sugerindo um papel protetor para IL-10 na DC. Em outra investigação, Moreno e colaboradores (2004) sugerem que um evento de epistasia entre MHC e IL-10 esteja associado à suscetibilidade/resistência à DC.

Vale destacar que no presente trabalho foram avaliados os parâmetros: carga parasitária, genótipo de *T. cruzi* e polimorfismos nos genes *TNFA* e *IL10* para avaliar possíveis associações com as formas clínicas da DC. Considerando a importância de cada um desses fatores individualmente, amplamente discutidos na literatura, e buscando contribuir para melhor compreender o desfecho clínico e/ou um marcador de prognóstico da doença, optamos por realizar análises comparativas entre os três parâmetros, visto que, até o atual momento, o conjunto destas informações ainda carece ser explorado. Apesar de não terem sido observadas diferenças estatisticamente significativas para afirmar a existência de associação entres estes fatores às formas clínicas e/ou progressão/risco na DC, há evidências de que haja uma associação entre os marcadores genéticos humanos analisados à progressão da doença.

Polimorfismos com potencial de atuarem como marcadores de prognóstico para a indicação de grupos propensos a desenvolverem manifestações cardíacas graves da DC, podem ser de extremo interesse. Considerando o longo período de

tempo para a apresentação clínica dos sintomas, na fase crônica da DC, a identificação de potenciais marcadores torna-se fundamental para melhor compreender o desfecho clínico da doença.

Uma limitação da maioria dos estudos sobre polimorfismos em genes de citocinas, na DC, é o tamanho amostral, incluindo o presente trabalho. Nosso estudo abrangeu indivíduos de todas as regiões brasileiras, diferenciando-se de outros estudos de associação em DC, nos quais a população-alvo é originária, geralmente, das regiões Sudeste e/ou Nordeste. Outra característica do presente trabalho é que este foi realizado em colaboração com o Instituto de Infectologia Evandro Chagas (INI), instituição referência que recruta os indivíduos, de acordo com a busca dos mesmos por atendimento, por suspeita de estarem infectados por *T. cruzi* (a maioria por conta de histórico familiar e/ou residir em local endêmico). Este também foi um fator limitante, principalmente no que concerne a ampliação do tamanho amostral da coorte. Outro aspecto que merece destaque foi o surgimento do SARS-CoV-2 (novo coronavírus), agente etiológico da COVID-19, causando uma pandemia, em que, para a sua contenção, foram necessárias medidas restritivas, sendo uma delas o isolamento social total por meses. Esse afastamento impossibilitou a análise dos demais SNPs propostos no presente estudo, bem como impediu a realização de um novo recrutamento de indivíduos para o trabalho.

Como um todo, nosso estudo indicou uma leve tendência de associação genética para o polimorfismo *TNFA* (-308, rs1800629), além de apontar a dificuldade em caracterizar a influência das variantes genéticas nos dois genes de resposta imune testados na população, considerados relevantes para o desenvolvimento da DC. A ausência de um marcador genético forte pode indicar que os efeitos da resposta imune sob o controle do parasito e o perfil inflamatório, para pacientes com DC, não são predeterminantes genéticos. Portanto, a falta de evidências de algum tipo de associação relatada no presente trabalho, assim como em outras coortes analisadas de populações brasileiras, deve estimular estudos futuros, com o intuito de dar suporte à pesquisa de fatores fisiopatológicos resultantes da interação parasito/hospedeiro, e que estejam envolvidos com a progressão da DC.

Dessa forma, futuramente, pretende-se dar continuidade ao trabalho, visando aumentar o tamanho do número amostral para dar robustez aos achados estatísticos, além de concluir as análises por HRM dos outros SNPs já padronizados para esta técnica. Avaliar um maior número de sítios polimórficos em genes que

codificam moléculas do sistema imune humano, confere resultados mais fidedignos com a realidade dos indivíduos, posto que os polimorfismos atuam, lado a lado, podendo influenciar o desfecho clínico da doença.

6. Conclusão

Neste trabalho foram avaliados fatores epidemiológicos e moleculares do parasito, tais como carga parasitária e genótipo, bem como fatores genéticos humanos, possivelmente envolvidos no desenrolar das formas clínicas durante a fase crônica da DC. O estudo teve como proposta contribuir para o aumento do conhecimento sobre a DC:

- Os parâmetros biológicos, tais como sexo e idade, dos indivíduos em estudo, quando confrontados entre si e com as formas clínicas da DC, não resultaram em diferenças estatisticamente significativas;
- A análise comparativa entre carga parasitária, parâmetros biológicos dos indivíduos e as formas clínicas da DC, também não demonstrou qualquer associação significativa;
- Os genótipos TcII e TcVI de *T. cruzi* foram os mais representativos dentre as DTUs encontradas, além de ter sido identificada infecção por TcV em um paciente da Bahia;
- A análise conjunta entre carga parasitária, genótipo de *T. cruzi* e formas clínicas da DC, não indicou associação em relação à progressão da doença;
- Os ensaios de HRM para todos os alvos polimórficos em genes de resposta imune propostos foram padronizados e validados com sucesso, permitindo a aplicação da técnica também na investigação de SNPs em outras doenças;
- Não foi observada associação dos polimorfismos *TNFA* -308G/A e *IL-10* -1082G/A à progressão da DC; no entanto, sugerimos o aumento do número amostral para confirmar a tendência identificada de possível associação da frequência alélica do *TNFAA* com a DC;
- A análise global entre os parâmetros carga parasitária, genótipo de *T. cruzi*, idade e sexo dos indivíduos, juntamente com as formas clínicas da DC e os polimorfismos *TNFA* -308G/A e *IL-10* -1082G/A não revelou qualquer associação significativa.

Como um todo, nosso estudo corrobora que ainda há necessidade de investigação acerca dos fatores envolvendo o parasito e o homem, afim de enriquecer o conhecimento e melhor compreender a dinâmica da interação *T. cruzi*/humano no desfecho clínico da DC.

7. Bibliografía

- Abad-Franch F, Lima MM, Sarquis O, Gurgel-Gonçalves R, Sánchez-Martín M, Calzada J, *et al.* On palms, bugs, and Chagas disease in the Americas. *Acta Trop.* 2015; 151:126-41. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.005>.
- Abras A, Gállego M, Llovet T, Tebar S, Herrero M, Berenguer P, *et al.* Serological diagnosis of chronic Chagas disease: is it time for a change? *J Clin Microbiol.* 2016; 54: 1566-72.
- Ackerman H, Usen S, Mott R, Richardson A, Sisay-Joof F, Katundu P, *et al.* Haplotypic analysis of the TNF locus by association efficiency and entropy. *Genome Biol* 2003;4(4):R24.
- Acquatella H. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation.* 2007,v. 115, n. 9, p. 1124-31.
- Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR. Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102 (Suppl. I):47–55.
- Alarcón de Noya B, Colmenares C, Díaz-Bello Z, Ruiz-Guevara R, Medina K, Muñoz-Calderón A, *et al.* Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. *Parasite Epidemiol Control.* 2016 Feb 27;1(2):188-198. doi: 10.1016/j.parepi.2016.02.005. PMID: 29988179; PMCID: PMC5991850.
- Albajar-Viñas P, Jannin J. The hidden Chagas disease burden in Europe. *Euro Surveill.* 2011,16(38): pii = 19975.
- Alonso-Padilla J, GallegoM, Schijman AG, Gascon J. Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies, *Exp Rev Mol Diagn.* 2017; DOI: 10.1080/14737159.2017.1338566.
- Altchek J, Moscatelli G, Mastrantonio G, Moroni S, Giglio N, Marson ME, *et al.* Population pharmacokinetic study of benznidazole in pediatric Chagas disease suggests efficacy despite lower plasma concentrations than in adults. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014,8(5):e2907.
- Alvarado-Arnez LE, Venegas EN, Ober C, Thompson EE, Sequence variation in the IL4 gene and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivians, *J Allergy Clin Immunol,* 2011;vol. 127, no. 1, pp. 279–282.

- Alvarado-Arnez LE, Batista AM, Alves SM, Melo G, Lorena VMB, Cardoso CC, *et al.* Single nucleotide polymorphisms of cytokine-related genes and association with clinical outcome in a Chagas disease case-control study from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;May 14;113(6):e170489. doi: 10.1590/0074-02760170489. PMID: 29768622; PMCID: PMC5961924.
- Álvarez MG, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Viotti R. Prevention of Congenital Chagas Disease by Benznidazole Pre-treatment in Reproductive-Age Women. An Observational Study *Acta Trop.* 2017;Jul 15. pii: S0001-706X(16)30750-1. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.07.004.
- Andrade SG. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop.* 1974; 3:65-121.
- Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Organ.* 1985;63(4):721-6. PMID: 3936634; PMCID: PMC2536372.
- Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Latino Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. *Arq Bras Cardiol.* 2011; 97(2 Suppl 3):1-48.
- Añez N, Crisante G, da Silva, FM, Rojas A, Carrasco H, Umezawa ES, *et al.* Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop Med Int Health.* 2004; 9, 1319–1326.
- Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999,94:549-562.
- Arnal A; Waleckx E; Rico-Chavez O; Herrera C; Dumonteil E. Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019,13, e0006859.

- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, *et al.* A 9,000-year record of Chagas disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:2034–9.
- Ávila H, Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; 42:175-188.
- Ávila HA, Pereira JB, Thiemann O, de Paiva E, Degraive W, Morel CM, *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(9):2421-6.
- Ayo CM, Dalalio MM, Visentainer JE, Reis PG, Sippert EÂ, Jarduli LR, *et al.* Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *Biomed Res Int.* 2013;2013:284729. doi: 10.1155/2013/284729. Epub 2013 Aug 28. PMID: 24069594; PMCID: PMC3771244.
- Baker MS, Chen X, Rotramel AR, Nelson JJ, Kaufman DB. Interferon regulatory factor-1 down-regulates cytokine-induced IP-10 expression in pancreatic islets. *Surgery.* 2003;Aug;134(2):134-41. doi: 10.1067/msy.2003.236. PMID: 12947309.
- Balouz V, Agüero F, Buscaglia CA. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Adv Parasitol.* 2017, 97:1-45. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.10.001>.
- Barreto MP, Ribeiro RD, Neto FMB. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXVIII: infecção de mamíferos pela via oral. *Rev Brasil Biol.* 1978;38: 455-459.
- Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: A multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology.* 2000; 120:513–526.
- Barnabé C, Mobarec HI, Jurado MR, Cortez JA, Brenière SF. Reconsideration of the seven discrete typing units within the species *Trypanosoma cruzi*, a new

proposal of three reliable mitochondrial clades. *Infect. Genet. Evol.* 2016;39, 176-186.

Barreto de Albuquerque J, Silva Dos Santos D, Stein JV, & de Meis J. Oral Versus Intra-gastric Inoculation: Similar Pathways of *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection? From Target Tissues, Parasite Evasion, and Immune Response. *Frontiers in immunology.* 2018; 9, 1734.

Barrett TV, Hoff RH, Mott KE, Miles MA, Godfrey DG, Teixeira R, *et al.* Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia states, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980; v. 74, n. 1, p. 84-90.

Bello Corassa R, Aceijas C, Alves PAB, Garelick H. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. *Perspect Public Health.* 2017;Sep;137(5):289-295. doi: 10.1177/1757913916671160. Epub 2016 Oct 10. PMID: 27758973.

Benatar AF, Sosa-Estani S, Rojkin F, Schijman AG. Validation of a real time PCR kit prototype for early diagnosis of congenital Chagas disease in a multicenter field study. *Medicina.* 2017; 77(Suppl. 1): 400.

BENDITA (Benznidazole New Doses Improved Treatment and Associations) study 2017. Clinical Trials.gov identifier: NCT03378661. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03378661> Accessed: 2021 February 05.

Besuschio SA, Llano Murcia M, Benatar AF, Monnerat S, Cruz I, Picado A, *et al.* Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017,11(7):e0005779. doi: 10.1371/journal.pntd.0005779.

Besuschio SA, Picado A, Muñoz-Calderón A, Wehrendt DP, Fernández M, Benatar A, *et al.* *Trypanosoma cruzi* loop-mediated isothermal amplification (*Trypanosoma cruzi* Loopamp) kit for detection of congenital, acute and Chagas disease reactivation. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(8):e0008402. doi: 10.1371/journal.pntd.0008402.

- Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, et al
Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic
review. JAMA. 2007;298:2171-81.
- Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas'
disease in the United States. Clin Microbiol Rev. 2011;24(4):655-681.
- Bern C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. New England
Journal Of Medicine. 2011, [s.l.], v. 364, n. 26, p.2527-2534.
- Bern C. Chagas' Disease. N Engl J Med. 2015,v. 30, n. 373, p. 456-66.
- Bocchi EA, Bestetti RB, Scanavacca MI, Cunha Neto E, Issa VS. Chronic Chagas
heart disease management: from etiology to cardiomyopathy treatment. J Am
Coll Cardiol. 2017;70:1510-24.
- Bock M, Gonert R, Hberkom A. Studies with Bay 25-02 on animals. Bol Chile
Parasitol. 1969;24: 13-19.
- Bosseno MF, Barnabé C, Magallon GE, Lozano KF, Ramsey J, Espinoza B, et al.
Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico J.Clin. Microbiol.
2002;40, 627–632.
- Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ, Diotaiuti L. Dynamics between
sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis*
(Hemiptera: Reduviidae) in Ceará state, northeastern Brazil. Acta Trop.
2005;93:119-126.
- Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol.
2003;Feb;111(2 Suppl):S460-75. doi: 10.1067/mai.2003.108. PMID: 12592293.
- Branche C, Ochaya S, Aslund L, Andersson B. Comparative karyotyping as a tool for
genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol.
2006;147, 30-38.
- Brasil. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de
Chagas aguda transmitida por alimentos. – Rio de Janeiro: PANAFTOSA-
VP/OPAS/OMS. 2009, 92 p.: il. (Serie de Manuais Técnicos, 12).

- Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LHC, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* BioMed Central Ltd. 2010;10(1):337.
- Brazilian Consensus on Chagas Disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;38Suppl3:7-29.
- Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10, e0004792.
- Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol.* 1999,104:219–232.
- Brisse S; Dujardin JC; Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages sequence-characterised amplified regions markers. *Mol Biochem Parasitol.* 2000a; v. 111, n. 1, p. 95-105.
- Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* 2000b;Jan;30(1):35-44. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00168-x. PMID: 10675742.
- Brisse S; Verhoef J; Tibayrenc M. Characterization of large and small subunit r RNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 2001; v.31, n. 11, p. 1218-26.
- Brisse S, Henriksson J, Barnabé C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, *et al.*. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Genet. Evol.* 2003;2: 173-183.
- Britto C, Cardoso MA, Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, *et al.* Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology.* 1995;110(Pt 3):241-7.

- Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009,Jul;104 Suppl 1:122-35. doi: 10.1590/s0074-02762009000900018. PMID: 19753467.
- Broutin H, Tarrieu F, Tibayrenc M, Oury B, Barnabé C. Phylogenetic analysis of the glucose-6-phosphate isomerase gene in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 2006,113:1–7.
- Bua J, Volta BJ, Perrone AE, Scollo K, Velázquez EB, Ruiz AM, *et al*. How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(10):e2476. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002476>.
- Buekens P, Cafferata ML, Alger J, Althabe F, Belizán JM, Bustamante N, *et al* Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: An Observational Prospective Study. *Am J Trop Med Hyg*. 2018,Feb;98(2):478-485. doi: 10.4269/ajtmh.17-0516. Epub 2017 Nov 30. PMID: 29210352; PMCID: PMC5929197.
- Burgos JM, Begher SB, Freitas JM, Bisio M, Duffy T, Altcheh J, *et al*. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;Dec;73(6):1016-8. PMID: 16354804.
- Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares, HM, Seidenstein ME, *et al*. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2007; 37, 1319–1327.
- Burgos, JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, *et al*. 2010. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis*. 2010;51: 485-95 doi: 10.1086/655680.

- Calzada JE, Nieto A, Beraún Y, Martín J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens*. 2001;Sep;58(3):154-8. doi: 10.1034/j.1399-0039.2001.580302.x. PMID: 11703822.
- Calzada JE, Beraún Y, González CI, Martín J, Transforming growth factor beta 1 (TGF1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. *Cytokine*. 2009; vol. 45, no. 3, pp. 149–153.
- Calvo-Mendez M L; Torres, BN; Aguilar, RA. La vía oral: una puerta de acceso para *Trypanosoma cruzi*. *Rev Lat-amer Microbiol*. 1992; v.34,p.39-42.
- Câmara AC, Varela-Freire AA, Valadares HM, Macedo AM, D'Avila DA, Machado CR, *et al*. Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. *Acta Trop*. 2010;Sep;115(3):205-11. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.03.003. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20303924.
- Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med*. 2004;Sep;4(6):549-62. doi: 10.2174/1566524043360249. PMID: 15357207.
- Campelo V, Dantas RO, Simões RT, Mendes-Junior CT, Sousa SM, Simões AL, *et al*. TNF microsatellite alleles in Brazilian Chagasic patients. *Dig Dis Sci*. 2007;Dec;52(12):3334-9. doi: 10.1007/s10620-006-9699-7. Epub 2007 Aug 23. PMID: 17712635.
- Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, *et al*. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol*. 2008;38, 1533–1543.
- Cardoso GM, Morato MJ, Gomes JA, Rocha MO, Bonfim IP, Williams-Blangero S, *et al*. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. *Front Biosci*. 2006;Jan 1;11:1158-63. doi: 10.2741/1870. PMID: 16146804.
- Carlier Y, Truyens, C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop*. 2015,151, 103–115. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.07.016.

- Carranza JC, Valadares HM, D'Avila DA, Baptista RP, Moreno M, Galvão LM, *et al.* *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol.* 2009;39, 963-973.
- Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Chiari E, Galvão LM. Detection of parasitaemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res.* 2006; 99: 379-83.
- Cavazzana M Jr, Marcili A, Lima L, Junqueira AC, Veludo HH, Viola LB, *et al.* Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int J Parasitol.* 2010;40, 345-355.
- Cedillos RA, Romero JE, Sasagawa E. Elimination of *Rhodnius prolixus* in El Salvador, Central America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012,107, 1068–1069.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. American trypanosomiasis <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>. 2019;Accessed January 27, 2021.
- Cerisola JA, Rohwedder RW, Del Prado CE. [Yield of xenodiagnosis in human chronic Chagas' infection using nymphs of different species of triatomid bugs]. *Bol Chil Parasitol.* 1971; 26(1): 57-8.
- Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1909;1:159-218.
- Chagas BS, Gurgel AP, da Cruz HL, Amaral CM, Cardoso MV, Silva Neto Jda C, *et al* An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. *Infect Genet Evol.* 2013;Oct;19:32-7. doi: 10.1016/j.meegid.2013.06.016. Epub 2013 Jun 22. PMID: 23800422.
- Clark CG, Pung OJ. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;66, 175–179.

- CONITEC (Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas na Doença de Chagas (PCDT). Ministério da Saúde. Relatório de Recomendação, 2018,p. 1 -144.
- Corrêa-Oliveira R, Gomes JAS, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S, *et al.* “The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease,” *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1999;vol. 9, supplement 1, pp. 253–255.
- Cosentino RO, Agüero F. A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(7):e1777.
- Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, *et al.* Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2009;Feb 1;199(3):451-4. doi: 10.1086/596061. PMID: 19099482.
- Costa J, Almeida JR, Britto C, Duarte R, Marchon-Silva V, Pacheco RS. Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93:7-13.
- Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC, *et al.* The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98:443-449.
- Costa J, Argolo AM, Félix M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa.* 2006,1385: 47- 52.
- Costa J, Félix M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007,102: 87-90.
- Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed – a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:113-122.
- Coura JR. Special issue on Chagas disease. Editorial. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro. 2015;Vol.110(2):275-276, doi: 10.1590/0074-0276150001.

- Coura JR, Borges-Pereira J 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica* 115: 5-13.
- Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2011;Vol. 106(6): 641-645, September.
- Coura JR, De Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(1):3-24.
- Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:31-40.
- Coura JR, Junqueira ACV. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(2):145–154.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010;465: S6-7.
- Criado L, Flórez O, Martín J, González CI, Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population, *Cytokine*, 2012; vol. 57, no. 3, pp. 398–401.
- Cruz-Robles D, Chávez-González JP, Cavazos-Quero M.M, Pérez-Méndez O, Reyes PA, Vargas-Alarcón G, Association between IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms and Chagas' disease development susceptibility, *Immunol Invest*, 2009;vol. 38, no. 3-4, pp. 231–239.
- Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*. 2006;39:41-54.
- Cura CI, Mejia-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal MV, *et al.* *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *Int J Parasitol*. 2010;40, 1599-1607.

- Cura CI, Lucero RH, Bisio M, Oshiro E, Formichelli LB, Burgos JM, *et al.* *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology*. 2012;139, 516-521.
- Cura CI, Lattes R, Nagel C, *et al.* Early molecular diagnosis of acute Chagas disease after transplantation with organs from *Trypanosoma cruzi*-infected donors. *Am J Transplant*. 2013;13(12):3253-61.
- Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, Jimenez-Coello M, *et al.* Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(5): e0003765.
- Cura CI, Ramírez JC, Rodríguez M, Lopez-Albizu C, Irazu L, Scollo K, *et al.* Comparative Study and Analytical Verification of PCR Methods for the Diagnosis of Congenital Chagas Disease. *J Mol Diagn*. 2017, pii: S1525-1578(17)30108-3.
- D'Ávila DA, Galvão LMC, Sousa GR, Britto C, Moreira OC, Chiari E. Monitoring the parasite load in chronic Chagas disease patients: comparison between blood culture and quantitative real time PCR. *PLoS One*. 2018;Nov 29;13(11):e0208133. doi: 10.1371/journal.pone.0208133. PMID: 30496249; PMCID: PMC6264508.
- D'Ávila Reis D, Lemos EM, Silva GC, Adad SJ, McCurley T, Correa-Oliveira R, *et al.* Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;Mar-Apr;95(2):177-8. doi: 10.1016/s0035-9203(01)90153-1. PMID: 11355554.
- da Silveira AB, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. *Parasitology*. 2007;Jun;134(Pt 6):789-96. doi: 10.1017/S0031182007002296. Epub 2007 Feb 9. PMID: 17288632.
- Dario MA, Rodrigues MS, Barros JH, Xavier SC, D'Andrea PS, Roque AL, *et al.* Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute

- Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasit Vectors*. 2016;9, 477.
- de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, *et al*. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*. 1996;348:1407-13.
- de Araújo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, *et al*. Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*. 2007;May;12:2797-2806. DOI: 10.2741/2273.
- de Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RC, *et al*. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology*. 2012;Aug;217(8):768-77. doi: 10.1016/j.imbio.2012.04.008. Epub 2012 May 9. PMID: 22672991.
- de Freitas VL, da Silva SC, Sartori AM, Bezerra RC, Westphalen EV, Molina TD, *et al*. Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4 level. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011,5(8):e1277. doi: 10.1371/journal.pntd.0001277.
- de Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, *et al*. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz*. 2015,110 (3), 377–386.
- de Noya BA, González ON. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop*. 2015,Nov;151:94-102. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.06.004. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26066984.
- de Oliveira FL, Araújo-Jorge TC, de Souza EM, de Oliveira GM, Degraive WM, Feige JJ, Bailly S, & Waghbi MC. Oral administration of GW788388, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, prevents heart fibrosis in Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(6), e1696. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001696>.

- de Oliveira MT, de Assis GF, Oliveira e Silva JC, Machado EM, da Silva GN, Veloso VM, *et al.* *Trypanosoma cruzi* Discret Typing Units (TcII and TcVI) in samples of patients from two municipalities of the Jequitinhonha Valley, MG, Brazil, using two molecular typing strategies. *Parasit Vectors*. 2015;Oct 31;8:568. doi: 10.1186/s13071-015-1161-2. PMID: 26520576; PMCID: PMC4628324.
- De Winne K, Büscher P, Luquetti AO, Tavares SB, Oliveira RA, Solari A, *et al.* The *Trypanosoma cruzi* satellite DNA OligoC-Test and *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA OligoC-Test for diagnosis of Chagas disease: a multi-cohort comparative evaluation study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014,Jan 2;8(1):e2633. doi: 10.1371/journal.pntd.0002633. PMID: 24392177; PMCID: PMC3879245.
- Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycle in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984,79, 513–515.
- del Puerto R, Nishizawa JE, Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C *et al.* Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop*. 2010;Dis. 4, e687.
- Del-Rei RP, Leony LM, Celedon PAF, Zanchin NIT, Reis MGD, Gomes YM, *et al.* Detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies by chimeric antigens in chronic Chagas disease-individuals from endemic South American countries. *PLoS One*. 2019; 14(4): e0215623.
- Dias JC. Doença de Chagas. *Epidemiologia e prevenção [Chagas' disease. Epidemiology and prevention]*. *Arq Bras Cardiol*. 1994,Nov;63(5):451-5. Portuguese. PMID: 7611934.
- Dias JC. Chagas disease: successes and challenges. *Cad Saúde Pública* 2006;22:2020-2021.
- Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*. 1956;14(6):1035-60. doi: 10.1161/01.cir.14.6.1035. PMID: 13383798.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:603-612.

- Dias JC, Ramos AN Jr, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015 [Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015]. *Epidemiol Serv Saude.* 2016;Jun;25(spe):7-86. Portuguese. doi: 10.5123/S1679-49742016000500002. PMID: 27869914.
- Diez M, Favalaro L, Bertolotti A, Burgos JM, Vigliano C, Lastra MP, *et al.* Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. *Am J Transplant.* 2007;Jun;7(6):1633-40.
- Donn RP, Alourfi Z, Zeggini E, Lamb R, Jury F, Lunt M, *et al.* A functional promoter haplotype of macrophage migration inhibitory factor (MIF) is linked and associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(5):1604e10.
- dos Santos VRC, de Meis J, Savino W, Andrade JAA, Vieira JRS, Coura JR, *et al.* Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing? *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2018;Vol. 113(5):e170298.
- Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Cardoso MR, Braga PE, Faé KC, *et al.* TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Microbes Infect.* 2006;Mar;8(3):598-603. doi: 10.1016/j.micinf.2005.08.009. Epub 2005 Dec 27. PMID: 16427798.
- Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Mady C, Faé KC, Buck P, *et al.* Lack of association of tumor necrosis factor-alpha polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. *Immunol Lett.* 2007;Jan 15;108(1):109-11. doi: 10.1016/j.imlet.2006.10.008. Epub 2006 Nov 27. PMID: 17141882.
- Duffy T, Bisio M, Altchek J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, *et al.* Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4):e419.
- Duffy T, Cura CI, Ramírez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, *et al.* Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1):e2000.

- Dutra WO, Colley DG, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Brener Z, Pereira ME, *et al.* Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5C B cells or activated T cells chagasic patients, respectively. *Scand J Immunol.* 2000;51: 91-97.
- Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; 21: 287-292.
- Dutra WO, Menezes CA, Villani FN, da Costa GC, da Silveira AB, Reis D'Avila D, *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;Jul;104 Suppl 1(Suppl 1):208-18. doi: 10.1590/s0074-02762009000900027. PMID: 19753476; PMCID: PMC3285444.
- Dutra WO, Menezes CA, Magalhães LM, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 2014; Aug;36(8):377-87. doi: 10.1111/pim.12107. PMID: 24611805; PMCID: PMC4143493.
- Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology.* 1999;30:526–30.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.* 2005, 309:409–415.
- Eskdale J, Gallagher G. A polymorphic dinucleotide repeat in the human IL-10 promoter. *Immunogenetics* 1995;42:444 –445.
- Esper HR, Freitas VLT, Assy JGPL, Shimoda EY, Berreta OCP, Lopes MH, *et al.* Fatal evolution of acute Chagas disease in a child from Northern Brazil: factors that determine poor prognosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2019;May 6;61:e27. doi: 10.1590/S1678-9946201961027. PMID: 31066753; PMCID: PMC6502456.
- Fabbro DL, Danesi E, Olivera V, Codebó MO, Denner S, Heredia C, *et al.* Trypanocide treatment of women infected with *Trypanosoma cruzi* and its

effect on preventing congenital Chagas. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(11):e3312.

Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. Acta Trop. 2009;110, 15-21.

Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, *et al.* The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. Parasitology. 1999;Feb;118 (Pt 2):161-6. doi: 10.1017/s0031182098003709. PMID: 10028530.

Fernández-Mestre MT, Montagnani S, Layrisse Z. Is the CCR5-59029-G/G genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease? Hum Immunol. 2004;Jul;65(7):725-8. doi: 10.1016/j.humimm.2004.05.002. PMID: 15301862.

Ferreira HO. Ensaio terapêutico-clínico com benzonidazol na doença de Chagas. Rev Inst Med Trop. 1976,18:357–364.

Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, *et al.* Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/“indeterminate” and Chagas disease cardiomyopathy patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98:407–11.

Ferreira RC, Briones MR. Phylogenetic evidence based on *Trypanosoma cruzi* nuclear gene sequences and information entropy suggest that inter-strain intragenic recombination is a basic mechanism underlying the allele diversity of hybrid strains. Infect Genet Evol. 2012;12, 1064-1071.

Ferreira RR, Abreu R, Vilar-Pereira G, Degraeve W, Meuser-Batista M, Ferreira N, da Cruz Moreira O, da Silva Gomes NL, Mello de Souza E, Ramos IP, Bailly S, Feige JJ, Lannes-Vieira J, de Araújo-Jorge TC, & Waghbi MC. TGF- β inhibitor therapy decreases fibrosis and stimulates cardiac improvement in a pre-clinical study of chronic Chagas' heart disease. PLoS neglected tropical diseases. 2019;13(7), e0007602. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007602>.

- Fiorelli AI, Santos RH, Oliveira JL Jr, Lourenço-Filho DD, Dias RR, Oliveira AS, *et al.* Heart transplantation in 107 cases of Chagas' disease. *Transplant Proc.* 2011,Jan-Feb;43(1):220-4. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.12.046. PMID: 21335192.
- Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, *et al.* Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España [Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010,May;28(5):284-93. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2009.07.005. Epub 2009 Dec 5. PMID: 19962790.
- Flórez O, Zafra G, Morillo C, Martín J, González CI, Interleukin-1 gene cluster polymorphism in Chagas disease in a Colombian Case-Control Study, *Hum Immunol*, 2006;vol. 67, no. 9, pp. 741–748, 2006.
- Flórez O, Martín J, González CI. Interleukin 4, interleukin 4 receptor- α and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. *Parasite Immunol.* 2011;Sep;33(9):506-11. doi: 10.1111/j.1365-3024.2011.01314.x. PMID: 21729106.
- Flórez O, Martín J, González CI. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Hum Immunol.* 2012;Aug;73(8):852-8. doi: 10.1016/j.humimm.2012.04.005. Epub 2012 Apr 23. PMID: 22537745.
- Frade-Barros AF, Ianni BM, Cabantous S, Pissetti CW, Saba B, Lin-Wang HT, *et al.* Polymorphisms in Genes Affecting Interferon- γ Production and Th1 T Cell Differentiation Are Associated With Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front Immunol.* 2020 Jul 7;11:1386. doi: 10.3389/fimmu.2020.01386. Erratum in: *Front Immunol.* 2020 Sep 10;11:593759. PMID: 32733459; PMCID: PMC7358543.
- Franco J, Ferreira RC, lenne S, Zingales B. ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* involved in benznidazole resistance: gene polymorphisms disclose inter-strain intragenic recombination in hybrid isolates. *Infect. Genet. Evol.* 2015;31, 198-208.

- Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog. 2006;2, e24.
- Fuenmayor C, Higuchi ML, Carrasco H, Parada H, Gutierrez P, Aiello V, *et al.* Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. Acta Cardiol. 2005;60: 33-67.
- Hotez PJ, Fujiwara RT. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. Microbes Infect. 2014,v. 16, n. 8, p. 601-6.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa. 2003;202:1-36.
- Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi* - *Rhodnius prolixus* interactions. J Insect Physiol. 2007;53:11-21.
- García LT, Aguilar JR, Bueno MY, Moreno EM, Ramírez H, Daza N. Disagreement between PCR and serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors from a Colombian endemic region. Biomédica. 2021;41 (Supl. 1).
- Garzón EA, Barnabé C, Córdova X, Bowen C, Paredes W, Gómez E, Ouaisi A, Tibayrenc M, Guevara AG. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;Jul-Aug;96(4):378-82. doi: 10.1016/s0035-9203(02)90367-6. PMID: 12497973.
- Gazzinelli RT, Gazzinelli G, Cançado JR, Cardoso JE, Brener Z, Colley DG. Two models of idiotypic stimulation of T lymphocytes from patients with Chagas disease: correlations with clinical forms of infection. Res Immunol. 1990;140: 757-761.
- Gazzinelli RT, Pereira ME, Romanha A, Gazzinelli G, Brener Z. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by

human anti-gal antibodies. *Parasite Immunol.* 1991;Jul;13(4):345-56. doi: 10.1111/j.1365-3024.1991.tb00288.x. PMID: 1717927.

Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;166:3915–3922.

Girones N, Cuervo H, Fresno M. *T. cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;296: 89-123.

Góes JAP, Andrade LA, Carvalho MS, Araújo DDC, Santos MB, Tanajura DM, *et al.* Spatial patterns and temporal tendency of mortality related to Chagas disease in an endemic area of northeastern Brazil. *Trop Med Int Health.* 2020 Oct;25(10):1298-1305. doi: 10.1111/tmi.13471. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32726864.

Gomes Dos Santos A, Watanabe EH, Ferreira DT, Oliveira J, Nakanishi ÉS, Oliveira CS, *et al.* A Specific *IL6* Polymorphic Genotype Modulates the Risk of *Trypanosoma cruzi* Parasitemia While *IL18*, *IL17A*, and *IL1B* Variant Profiles and HIV Infection Protect Against Cardiomyopathy in Chagas Disease. *Front Immunol.* 2020 Oct 22;11:521409. doi: 10.3389/fimmu.2020.521409. PMID: 33193300; PMCID: PMC7642879.

Gomes ML, Galvão LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999;60, 205-210.

Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 2003;71: 1185-1193.

Gonçalves TCM, Teves-Neves SC, Santos-Mallet JR, Carbajal-De-Lafuente AL, Lopes CM. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013,108: 429-437.

- Gontijo ED, Santos SE. Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas. Fiocruz. Ministérios da Saúde. 2009.
- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(4):435-42.
- Guhl F, Ramirez JD. Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. Infect. Genet. Evol. 2013;20, 148-154
- Guhl F, Auderheide A, Ramirez JD. From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. Int J Parasitol. 2014;44, 605-612.
- Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. Clin Chem. 2003;Mar;49(3):396-406. doi: 10.1373/49.3.396. PMID: 12600951.
- Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. J Trop Med. 2012, 1-15.
- Hajeer AH, Worthington J, Silman AJ, Ollier WE. Association of tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms with HLADRB1*04-bearing haplotypes in rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum. 1996;39(7):1109e14.
- Hamilton PB, Lewis MD, Cruickshank C, Gaunt MW, Yeo M, Llewellyn MS, *et al.* Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding. Infect Genet Evol. 2011;11, 44–51.
- Hamilton PB, Teixeira MM, Stevens JR. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. Trends Parasitol. 2012;28, 136-141.
- Healy C, Viles-Gonzalez JF, Sáenz LC, Soto M, Ramírez JD, & d'Avila A. Arrhythmias in chagasic cardiomyopathy. Cardiac electrophysiology clinics. 2015; 7(2), 251–268.
- Henriksson J, Aslund L, Pettersson U, 1996. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today. 1996;12, 108-114.

- Henriksson J, Dujardin JC, Barnabé C, Brisse S, Timperman G, Venegas J, *et al.* Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology*. 2002;124, 277-286.
- Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding KV. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: crossplatform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem*. 2006;52:494–503.
- Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding KV. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin Chem*. 2007;53:1544–1548.
- Hernández C, Cucunubá Z, Flórez C, Olivera M, Valencia C, Zambrano P, *et al.* Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia: Parasitic Loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2016;10, e0004997.
- Higo H, Miura S, Horio M, Mimori T, Hamano S, Agatsuma T, *et al.* Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitol Int*. 2004; 53, 337–344.
- Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, *et al.* Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens*. 1998;Jun;51(6):605-12. doi: 10.1111/j.1399-0039.1998.tb03002.x. PMID: 9694352.
- Higuera SL, Guhl F, Ramírez JD. Identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) through the implementation of a high-resolution melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors*. 2013;Apr 20;6:112. doi: 10.1186/1756-3305-6-112. PMID: 23602078; PMCID: PMC3641988.
- Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K, Shaffer D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun*. 1996;v.64,n.9,p. 3800-10.
- Hollegaard MV, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. *Genes Immun*. 2006;Jun;7(4):269-76. doi: 10.1038/sj.gene.6364301. Epub 2006 Apr 27. PMID: 16642032.

- Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2014 Jan;121(1):22-33. doi: 10.1111/1471-0528.12396. Epub 2013, Aug 7. PMID: 23924273; PMCID: PMC3914719.
- Hyland KV, Engman DM. Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. *Trends Parasitol*. 2006;22: 101-102.
- James A, Macdonald J. Recombinase polymerase amplification: emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15:1475-89.
- Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1, 95–97.
- Jansen AM, Pinho AP, Lisboa CV, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O, The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94:203-204.
- Jelocnik M, Polkinghorne A, Pannekoek Y. Multilocus Sequence Typing (MLST) of Chlamydiales. *Methods Mol Biol*. 2019;2042:69-86. doi: 10.1007/978-1-4939-9694-0_7. PMID: 31385271.
- John S, Turner D, Donn R, Sinnott P, Worthington J, Ollier WER, *et al*. Two novel biallelic polymorphisms in the IL-2 gene. *Eur J Immunogenetics*. 1998;25(6), 419–420. doi:10.1046/j.1365-2370.1998.00139.x.
- Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Di Genova G, *et al*. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet*. 2001;29(2):233e7.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *T. cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48: 348-357.
- Jordanides N, Eskdale J, Stuart R, Gallagher G. Allele associations reveal four prominent haplotypes at the human interleukin-6 (IL-6) locus. *Genes Immun* 1999;1:451 –455.

- Jurberg J, Rocha DS, Galvão C. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotrop.* 2009;9: 123-128.
- Keen LJ. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transpl Immunol.* 2002 Aug;10(2-3):143-6. doi: 10.1016/s0966-3274(02)00061-8. PMID: 12216945.
- Kerr CL, Bhattacharyya T, Xavier SC, Barros JH, Lima VS, Jansen AM, *et al.* Lineage-specific serology confirms Brazilian Atlantic forest lion tamarins, *Leontopithecus chrysomelas* and *Leontopithecus rosalia*, as reservoir hosts of *Trypanosoma cruzi* II (TcII). *Parasit Vectors.* 2016;9, 584.
- Kierszenbaum F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol.* 2005;21: 513-516.
- Kirchoff LV, Rassi A Jr. Chagas disease and trypanosomiasis. In: Kasper DL, Fauci AS, eds. *Harrison's Infectious Disease.* 2nd ed. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2013:1191-1197.
- Koch W, Kastrati A, Böttiger C, Mehilli J, Von Beckrath N, Schömig A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infection. *Atherosclerosis.* 2001;159:137– 44.
- Krettli AU. The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul;104 Suppl 1:142-51. doi: 10.1590/s0074-02762009000900020. PMID: 19753469.
- Kropf SP, Sá MR. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *Hist Cienc Saude Manguinhos.* 2009,Jul;16 Suppl 1:13-34. doi: 10.1590/s0104-59702009000500002. PMID: 20027916.
- Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 1999;22(2):139e44.
- Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC*

Cancer. 2006;Dec 21;6:295. doi: 10.1186/1471-2407-6-295. PMID: 17184525; PMCID: PMC1769510.

Kumar R, Goswami R, Agarwal S, Israni N, Singh SK, Rani R. Association and interaction of the TNF-alpha gene with other pro- and anti-inflammatory cytokine genes and HLA genes in patients with type 1 diabetes from North India. *Tissue Antigens*. 2007;69:557–67.

Kun H, Moore A, Mascola L, Steurer F, Lawrence G, Kubak B, *et al*. Chagas Disease in Transplant Recipients Investigation Team. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin Infect Dis*. 2009,Jun 1;48(11):1534-40. doi: 10.1086/598931. PMID: 19400748.

Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL, Crema E, Galvão LMC, Pena SDJ, *et al*. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2006;44(6):2167–2171.

Lannes-Vieira J, Silverio JC, Pereira IR, Vinagre NF, Carvalho CM, Paiva CN *et al*. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors--how to make a dream come true. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:226-35. doi: 10.1590/s0074-02762009000900029. PMID: 19753478.

Lannes-Vieira J, Pereira IR, Vinagre NF, Arnez LE. TNF- α and TNFR in Chagas disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. *Advances in experimental medicine and biology*. 2011;691, 221–230. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6612-4_23.

Ledezma AP, Blandon R, Schijman AG, Benatar A, Saldaña A, Osuna A. Mixed infections by different *Trypanosoma cruzi* discrete typing units among Chagas disease patients in an endemic community in Panama. *PLoS ONE*. 2020;15(11): e0241921.

Lidani KCF, Sandri TL, Castillo-Neyra R, Andrade FA, Guimarães CM, Marques EN, *et al*. Clinical and epidemiological aspects of chronic Chagas disease from

- Southern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2020;Oct 21;53:e20200225. doi: 10.1590/0037-8682-0225-2020. PMID: 33111908; PMCID: PMC7580281.
- Leon Rodriguez DA, Carmona FD, Echeverría LE, González CI, Martin J. *IL18* Gene Variants Influence the Susceptibility to Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis. 2016;Mar 30;10(3):e0004583. doi: 10.1371/journal.pntd.0004583. PMID: 27027876; PMCID: PMC4814063.
- Lewis MD, Llewellyn MS, Gaunt MW, Yeo M, Carrasco HJ, Miles MA. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. Int J Parasitol. 2009; 39:1305–17.
- Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Acosta N, Gaunt MW, Miles MA. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5, e1363.
- Li QJ, Zhao PX, Zhang XJ, Yi Y, Cheng DY, Ma JM, *et al.* Association of the macrophage migration inhibitory factor promoter polymorphisms with benign lymphoepithelial lesion of lacrimal gland. Int J Ophthalmol. 2017;Aug 18;10(8):1229-1232. doi: 10.18240/ijo.2017.08.07. PMID: 28861347; PMCID: PMC5554840.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Trop. 2015;Nov;151:166-77. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.07.015. Epub 2015 Jul 19. PMID: 26200788.
- Lisboa CV, Pinho AP, Monteiro RV, Jansen AM, 2007. *Trypanosomacruzi* (kinetoplastida *Trypanosomatidae*): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. Exp Parasitol. 2007;116, 150-155.
- Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, *et al.* Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I

- reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog.* 2009;5, e1000410.
- Lorena VMB, Lorena IMB, Braz SCM, Melo AS, Melo MFAD, Melo MGAC, *et al.* Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol* 2010;72:529–39.
- Macêdo V. Indeterminate form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:311-6. doi: 10.1590/s0074-02761999000700059. PMID: 10677745.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;Feb;99(1):1-12. doi: 10.1590/s0074-02762004000100001. Epub 2004 Mar 31. PMID: 15057339.
- Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98, 7396-7401.
- Machado CA, Ayala FJ. Sequence variation in the dihydrofolate reductasethymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002; 121:33–47.
- Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol.* 2012;Nov 34(6):753-70. doi: 10.1007/s00281-012-0351-7. Epub 2012 Oct 18. PMID: 23076807; PMCID: PMC3498515.
- Magalhães LM, Villani FN, Nunes Mdo C, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis.* 2013; 207: 661–665.
- Majeau A, Murphy L, Herrera C, Dumonteil E. Assessing *Trypanosoma cruzi* Parasite Diversity through Comparative Genomics: Implications for Disease Epidemiology and Diagnostics. *Pathogens* 2021;10:212. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020212>.

- Mangini S, Higuchi Mde L, Kawakami JT, Reis MM, Ikegami RN, Palomino SA, *et al.* Infectious agents and inflammation in donated hearts and dilated cardiomyopathies related to cardiovascular diseases, Chagas' heart disease, primary and secondary dilated cardiomyopathies. *Int J Cardiol.* 2015;178:55-62.
- Marcet PL, Duffy T, Cardinal MV, Burgos JM, Lauricella MA, Levin MJ, *et al.* PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology* . 2006;132, 57–65.
- Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia da Silva F, *et al.* A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology.* 2009a;136, 641-655.
- Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira AC, *et al.* Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol.* 2009b;9, 1265-1274.
- Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, *et al.* *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. And in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol.* 2009c;39, 615-623.
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007;115:1109-23.
- Marinho CR, D'Império Lima MR, Grisotto MG, Alvarez JM. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun.* 1999;67(1):308-18. doi: 10.1128/IAI.67.1.308-318.1999. PMID: 9864231; PMCID: PMC96312.
- Martin DP, Posada D, Crandall KA, Williamson C. A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res. Hum Retroviruses* 21. 2005;98-102.

- Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* 2014a;Feb;130:167-74. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.10.002. Epub 2013 Oct 15. PMID: 24139912.
- Martins-Melo FR., Ramos ANJR, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* 2014b;130:167-74.
- Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. *Bull World Health Organ.* 2016;Feb 1;94(2):103-10. doi: 10.2471/BLT.15.152363. Epub 2015 Nov 24. PMID: 26908960; PMCID: PMC4750431.
- Martins-Melo FR, Carneiro M, Ribeiro ALP, Bezerra JMT, Werneck GL. Burden of Chagas disease in Brazil, 1990-2016: findings from the Global Burden of Disease Study 2016. *Int J Parasitol.* 2019;Mar;49(3-4):301-310. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.11.008. Epub 2019 Feb 8. PMID: 30738925.
- Matsumura Y. [Multilocus sequence typing (MLST) analysis]. *Rinsho Byori.* 2013 Dec;61(12):1116-22. Japanese. PMID: 24605545.
- Meis J, Castro, R. Manual para diagnóstico em doença de Chagas para microscopistas de base no estado do Pará. FIOCRUZ. Rio de Janeiro. 2017: 110pp.
- Melo MF, Moreira OC, Tenório P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Oliveira Júnior W, *et al.* Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasit Vectors.* 2015;12(8):154.
- Melo RC, Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol.* 1978;Jun;64(3):475-82. PMID: 96243.
- Menezes CA, Rocha MO, Souza PE, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. Phenotypic and functional characteristics of CD28C and CD28K cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol.* 2004 137: 129-138.
- Messenger LA, Llewellyn MS, Bhattacharyya T, Franzén O, Lewis MD, Ramírez JD, *et al.* Multiple mitochondrial introgression events and heteroplasmy in

Trypanosoma cruzi revealed by maxicircle MLST and next generation sequencing. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6, e1584.

Messenger LA, Garcia L, Vanhove M, Huaranca C, Bustamante M, Torrico M, *et al.* Ecological host fitting of *Trypanosoma cruzi* TcI in Bolivia: mosaic population structure, hybridization and a role for humans in Andean parasite dispersal. Mol Ecol 2015a; 24, 2406-2422.

Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. Expert Rev Anti Infect Ther. 2015b;13, 995-1029.

Messenger LA, Ramirez JD, Llewellyn MS, Guhl F, Miles MA. Importation of Hybrid Human-Associated *Trypanosoma cruzi* Strains of SouthernSouth American Origin, Colombia. Emerg Infect Dis. 2016;22, 1452-1455.

Miles M A, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1977; v. 71, n. 3, p. 217-25.

Miles MA, Cedillos RA, Povia MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V, *et al.* Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? Lancet. 1981;1, 1338-1340.

Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. BMJ. 2003;Jun 28;326(7404):1444-8. doi: 10.1136/bmj.326.7404.1444. PMID: 12829559; PMCID: PMC1126319. Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimanoe Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 2010; 185: 1150–1157.

Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, *et al.* Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. N Engl J Med. 2014, May 15;370(20):1899-908. doi: 10.1056/NEJMoa1313122. PMID: 24827034.

Molina-Morant D, Fernández ML, Bosch-Nicolau P, Sulleiro E, Bangher M, Salvador F, *et al.* Efficacy and safety assessment of different dosage of benznidazol for the

- treatment of Chagas disease in chronic phase in adults (MULTIBENZ study): study protocol for a multicenter randomized Phase II non-inferiority clinical trial. *Trials*. 2020, Apr 15;21(1):328. doi: 10.1186/s13063-020-4226-2. PMID: 32293523; PMCID: PMC7158046.
- Monje-Rumi MM, Brandán CP, Ragone PG, Tomasini N, Lauthier JJ, Alberti D'amato AM, *et al.* *Trypanosoma cruzi* diversity in the Gran Chaco: mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI. *Infect Genet Evol*. 2015; 29:53-9.
- Monje-Rumi MM, Florida-Yapur N, Zago MP, Ragone PG, Pérez Brandán CM, Nuñez S, *et al.* Potential association of *Trypanosoma cruzi* DTUs TcV and TcVI with the digestive form of Chagas disease. *Infect Genet Evol*. 2020 Oct;84:104329. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104329. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32339759.
- Monteiro, WM, Magalhaes LK, Santana Filho FS, Borborema M, Silveira H, *et al.* *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of na outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. *Trop Med Int Health*. 2010;5, 1049-1051.
- Monteiro WM, Magalhaes LK, de Sa AR, Gomes ML, Toledo MJdO, Borges L, *et al.* *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by diferente haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One*. 2012;7, e41284.
- Montilla M, Guhl F, Jaramillo C, Nicholls S, Barnabé C, Bosseno MF, *et al.* Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66, 394–400.
- Montoya-Ruiz C, Jaimes FA, Rugeles MT, López JÁ, Bedoya G, Velilla PA. Variants in *LTA*, *TNF*, *IL1B* and *IL10* genes associated with the clinical course of sepsis. *Immunol Res*. 2016;Dec;64(5-6):1168-1178. doi: 10.1007/s12026-016-8860-4. PMID: 27592234.
- Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MF, Lima-Ferreira C, Guhl F, *et al.* Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop*. 2013;125(1):23–31. pmid:22982466.

- Moreira OC, Ramirez JC. Genotyping of *Trypanosoma cruzi* from Clinical Samples by Multilocus Conventional PCR In “Karina Andrea Gómez and Carlos Andrés Buscaglia (eds.), *T. cruzi* Infection: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology,” vol. 1955, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9148-8_17, © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019.
- Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircle. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980; 77(11):6810-6814.
- Moreno M, Silva EL, Ramírez LE, Palacio LG, Rivera D, Arcos-Burgos M, “Chagas’ disease susceptibility/resistance: linkage disequilibrium analysis suggest epistasis between major histocompatibility complex and interleukin-10,” Tissue Antigens. 2004;vol. 64, no. 1, pp. 18–24.
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun. 2001;289(1):150-154.
- Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. J Infect Chemother. 2013 Jun;19(3):404-11. doi: 10.1007/s10156-013-0590-0. Epub 2013 Mar 29. PMID: 23539453; PMCID: PMC7088141.
- Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, *et al.* Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas’ cardiomyopathy. N Engl J Med. 2015;373:1295-306.
- Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, Del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. J Am Coll Cardiol. 2017;69(8):939-947. doi: 10.1016/j.jacc.2016.12.023.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989;27(7):1477-82.

- Ministério da Saúde (Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde)
Consenso Brasileiro em doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38
Suppl 3:7–29.
- Mucci J, Carmona SJ, Volcovich R, Altcheh J, Bracamonte E, Marco JD, et al. Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas disease based on the combination of short peptidic epitopes. PLoS Negl Trop Dis. 2017; 11(10): e0005972.
- MULTIBENZ (Evaluation of Different Benznidazole Regimens for the Treatment of Chronic Chagas Disease) study 2017. Clinical Trials.gov identifier: NCT03191162. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03191162> Accessed: 2021march 25.
- Muñoz C, Apt W, Zulantay I. Real-Time PCR strategy for the identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units directly in chronically infected human blood. Infect Genet Evol. 2017; 49: 300–308.
- Murcia L, Simón M, Carrilero B, Roig M, Segovia M. Treatment of Infected Women of Childbearing Age Prevents Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection by Eliminating the Parasitemia Detected by PCR. J Infect Dis. 2017;May 1;215(9):1452-1458. doi: 10.1093/infdis/jix087.
- Naue J, Hansmann T, Schmidt U. High-resolution melting of 12S rRNA and cytochrome b DNA sequences for discrimination of species within distinct European animal families. PLoS One. 2014;9(12):e115575. doi:10.1371/journal.pone.0115575.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information) - dbSNP (Database of Single Nucleotide Polymorphisms) 2021. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> Accessed 2021 March 09.
- Nielebock MAP, Moreira OC, Xavier SCdC, Miranda LdFC, Lima ACBd, Pereira TOdJS et al. Association between *Trypanosoma cruzi* DTU TcII and chronic Chagas disease clinical presentation and outcome in an urban cohort in Brazil. PLoS ONE. 2020;15(12): e0243008.

- Noireau F, Diosque P, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res.* 2009;40:26-48.
- Nogueira LG, Santos RH, Ianni BM, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, *et al.* Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(10):e1867. doi: 10.1371/journal.pntd.0001867. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23150742; PMCID: PMC3493616.
- Nogueira LG, Santos RH, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, Bocchi EA, *et al.* Myocardial gene expression of T-bet, GATA-3, Ror- γ t, FoxP3, and hallmark cytokines in chronic Chagas disease cardiomyopathy: an essentially unopposed TH1-type response. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:914326. doi: 10.1155/2014/914326. Epub 2014,Jul 24. PMID: 25152568; PMCID: PMC4134835.
- Njiru ZK, Mikosza AS, Matovu E, Enyaru JCK, Ouma JO, Kibona SN, *et al.* African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the subgenus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. *Int J Parasitol.* 2008;38(5):589-99.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28(12): p. E63.266.
- Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(9):767-76.
- Oliveira EC, Stefani MM, Luquetti AO, Vêncio EF, Moreira MA, Souza C, *et al.* *Trypanosoma cruzi* and experimental Chagas' disease: characterization of a stock isolated from a patient with associated digestive and cardiac form. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1993; 26(1): 25-33.
- Oliveira TD, Santos BN, Galdino TS, Hasslocher-Moreno AM, Bastos OM, Sousa MA. *Trypanosoma cruzi* I genotype among isolates from patients with chronic

- Chagas disease followed at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (FIOCRUZ, Brazil). *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* 2017;50(1):35-43.
- Ollier WE. Cytokine genes and disease susceptibility. *Cytokine.* 2004;Nov 21-Dec 7;28(4-5):174-8. doi: 10.1016/j.cyto.2004.07.014. PMID: 15588692.
- Ordóñez D, Fernández-Soto P, Fernández-Martín AM, Crego-Vicente B, Febrer-Sendra B, Diego JG, *et al.* A *Trypanosoma cruzi* Genome Tandem Repetitive Satellite DNA Sequence as a Molecular Marker for a LAMP Assay for Diagnosing Chagas' Disease. *Dis Markers.* 2020, Feb 22;2020:8074314. doi: 10.1155/2020/8074314. PMID: 32184904; PMCID: PMC7060435.
- OPAS - Organización Panamericana de la Salud. Síntesis de evidencia: Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Panam Salud Publica.* 2020; 44: e28. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.28>.
- Panek M, Pietras T, Fabijan A, Ziolo J, Wieteska L, Małachowska B, *et al.* Identification and association of the single nucleotide polymorphisms, C-509T, C+466T and T+869C, of the TGF- β 1 gene in patients with asthma and their influence on the mRNA expression level of TGF- β 1. *Int J Mol Med.* 2014 Oct;34(4):975-86. doi: 10.3892/ijmm.2014.1894. Epub 2014 Aug 11. PMID: 25119113; PMCID: PMC4152139.
- Pecoul B, Batista C, Stobbaerts E, Ribeiro I, Vilasanjuan R, Gascon J, *et al.* The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Negl Trop Dis.* 2016,10, e0004343.
- Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol Biochem Parasitol.* 2003, 129: 79-90.
- Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet.* 2018;391:82-94.
- Pinazo MJ, Thomas MC, Bua J, Perrone A, Schijman AG, Viotti RJ, *et al.* Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(4):479-96. doi: 10.1586/14787210.2014.899150. PMID: 24621252.
- Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with

comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol.* 2012;12, 1328-1332.

Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, *et al.* Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica.* 2007;103(3):195-200.

Pissetti CW, Correia D, de Oliveira RF, Llaguno MM, Balarin MA, Silva-Grecco RL, *et al.* Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;Mar 8;5(3):e976. doi: 10.1371/journal.pntd.0000976. PMID: 21408088; PMCID: PMC3050938.

Pissetti CW, de Oliveira RF, Correia D, Nascentes GA, Llaguno MM, Rodrigues V Jr. Association between the lymphotoxin-alpha gene polymorphism and chagasic cardiopathy. *J Interferon Cytokine Res.* 2013;Mar;33(3):130-5. doi: 10.1089/jir.2012.0024. Epub 2013 Jan 4. PMID: 23289732.

Porrás AI, Yadon ZE, Altcheh J, Britto C, Chaves GC, Flevaud L, *et al.* Target Product Profile (TPP) for Chagas Disease Point-of-Care Diagnosis and Assessment of Response to Treatment. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9: e0003697. doi:10.1371/journal.pntd.0003697.

Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saúde Pública.* 2003;37:107-115.

Porter RD, Guild WR. Characterization of some pneumococcal bacteriophages. *J Virol.* 1976;Aug;19(2):659-67. doi: 10.1128/JVI.19.2.659-667.1976. PMID: 8652; PMCID: PMC354900.

Pravica V, Brogan IJ, Hutchinson IV. Rare polymorphisms in the promoter regions of the human interleukin-12 p35 and interleukin-12 p40 subunit genes. *Eur J Immunogenet* 2000;27:35 –36.

Prata A. Clinical and epiemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infect Dis.* 2001 1:92-100.

Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ, Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-

target real-time PCR approach. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2012,vol. 6, no. 7.

Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Martello FG, Müller NG, Cavalcanti VL, *et al.* The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human chagas disease. Clin Infect Dis. 2006a;Aug 1;43(3):305-11. doi: 10.1086/505395. Epub 2006 Jun 16. PMID: 16804844.

Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Faé KC, Müller NG, Cavalcanti VL, Drigo SA, *et al.* BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. J Infect Dis. 2006b;May 15;193(10):1394-9. doi: 10.1086/503368. Epub 2006 Apr 10. PMID: 16619187.

Ramasawmy R, Fae KC, Cunha-Neto E, Müller NG, Cavalcanti VL, Ferreira RC, *et al.* Polymorphisms in the gene for lymphotoxin-alpha predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. J Infect Dis. 2007;Dec 15;196(12):1836-43. doi: 10.1086/523653. PMID: 18190265.

Ramírez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, *et al.* Analytical validation of quantitative Real-Time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from chagas disease patients. J Mol Diagn. 2015;17(5):605-615.

Ramírez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA., *et al.* Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. J Clin Microbiol. 2009 Dec;47(12):3945-51. PMID:19846646.

Ramírez JD, Guhl F, Rendon LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. PLoS Negl. Trop. Dis. 2010;4:e899.

Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E, *et al.* Trypanosome species in neo-tropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. Infect Genet Evol. 2014a;22, 250-256.

- Ramírez JD, Hernandez C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, *et al.* First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses Public Health.* 2014b;61, 477-479.
- Rassi A, Rassi A Jr, Rassi GG. Fase aguda. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral Neto M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas.* 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora. 2000:231-45.
- Rassi A Jr, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, *et al.* Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med.* 2006;355:799-808.
- Rassi A Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas Disease. *Lancet.* 2010;375:1388–1402.
- Rassi A Jr., Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am.* 2012;26:275–291.
- Rassi A Jr, Marin JAN, Rassi A. Chronic Chagas cardiomyopathy: A review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017,112, 224–235.
- Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics.* 2007;Jun;8(6):597-608. doi: 10.2217/14622416.8.6.597. PMID: 17559349.
- Reis DD, Gazzinelli RT, Gazzinelli G, Colley DG. Antibodies to *T. cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas disease. *J Immunol.*1993;150: 1611-1618.
- Reis PG, Ayo CM, de Mattos LC, Brandão de Mattos CC, Sakita KM, de Moraes AG, *et al.* Genetic Polymorphisms of *IL17* and Chagas Disease in the South and Southeast of Brazil. *J Immunol Res.* 2017;2017:1017621. doi: 10.1155/2017/1017621. Epub 2017 Apr 2. PMID: 28470012; PMCID: PMC5392398.
- Rey L. Bases da Parasitologia Médica. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

- Richle R. Chemotherapy of experimental acute Chagas disease in mice: beneficial effect of Ro-71051 on parasitemia and tissue parasitism. *Le Progres Medical*. 1973;101: 282.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997;245, 154–160.
- Rodrigues-dos-Santos, Melo MF, de Castro L, Hasslocher-Moreno AM, do Brasil PEAA, Silvestre de Sousa A, *et al*. Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(11):e0006939. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006939>.
- Rodríguez-Angulo H, Marques J, Mendoza I, Villegas M, Mijares A, Gironès N, Fresno M. Differential cytokine profiling in Chagasic patients according to their arrhythmogenic-status. *BMC infectious diseases*. 2017;17(1), 221.<https://doi.org/10.1186/s12879-017-2324-x>.
- Rodríguez-Pérez JM, Cruz-Robles D, Hernández-Pacheco G, Pérez-Hernández N, Murguía LE, Granados J, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunol Lett*. 2005;Apr 15;98(1):97-102. doi: 10.1016/j.imlet.2004.10.017. Epub 2004 Nov 24. PMID: 15790514.
- Roellig DM, Savage MY, Fujita AW, Barnabé C, Tibayrenc M, Steurer FJ, *et al*. Genetic variation and exchange in *Trypanosoma cruzi* isolates from the United States. *PLoS One*.2013;8, e56198.
- Roffé E, Rothfuchs AG, Santiago HC, Marino AP, Ribeiro-Gomes FL, Eckhaus M, *et al*. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2012 Jan 15;188(2):649-60. doi: 10.4049/jimmunol.1003845. Epub 2011:Dec 12. PMID: 22156594; PMCID: PMC3253255.
- Rosa JA, Rocha CS, Gardim S, Pinto MC, Mendonça VJ, Ferreira Filho JCR, *et al*. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the State of Rondônia, Brazil. *Zootaxa*. 2012,3478: 62-76.

- Rouleau E, Lefol C, Bourdon V, Coulet F, Noguchi T, Soubrier F, *et al.* Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR–HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch Syndrome. *Hum Mutat.* 2009;30:867–875.
- Rozas M, de Doncker S, Aداui V, Coronado X, Barnabé C, Tibyarenc M, *et al.* Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment-length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. *J Infect Dis.* 2007;195, 1381–1388.
- Rozas N, De Doncker S, Coronado X, Barnabé C, Tibyarenc M, Solari A, *et al.* Evolutionary history of *Trypanosoma cruzi* according to antigen genes. *Parasitology.* 2008; 135:1157–1164.
- Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, *et al.* Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:487-91.
- Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Martínez-Gallo M, Sulleiro E, Franco-Jarava C, Sao Avilés A, *et al.* Serum IL-10 Levels and Its Relationship with Parasitemia in Chronic Chagas Disease Patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2020;Jan;102(1):159-163. doi: 10.4269/ajtmh.19-0550. PMID: 31701864; PMCID: PMC6947803.
- Sánchez-Guillén MC, Barnabé C, Tibayrenc M, Zavala-Castro J, Totolhua JL, Méndez-López J, *et al.* *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101, 585–590.
- Sangenis LH, Saraiva RM, Georg I, Castro L, Lima VS, Roque ALR, *et al.* Autochthonous transmission of Chagas disease in Rio de Janeiro State, Brazil: a clinical and eco-epidemiological study. *BMC Infect Dis.* 2015;15:4.
- Santos AH, Silva IG, Rassi A. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e o artificial em chagásicos crônicos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1995; 28: 367-73.
- Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Oliveira LS, Duarte R, D'Andrea OS, de Oliveira TG, *et al.* Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: seasonal

- distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. *J Vector Ecol.* 2010;35:385-394.
- Sartori AM, Ibrahim KY, Nunes Westphalen EV, Braz LM, Oliveira OC Jr, Gakiya E, *et al.* Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. *Ann Trop Med Parasitol.* 2007,Jan;101(1):31-50. doi: 10.1179/136485907X154629. PMID: 17244408.
- Sathler-Avelar R, Lemos EM, Reis DD, Medrano-Mercado N, Araújo-Jorge TC, Antas PR, *et al.* Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.* 2003;Dec;58(6):655-63. doi: 10.1111/j.1365-3083.2003.01340.x. PMID: 14636422.
- Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, *et al.* Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother.* 2003;Sep;52(3):441-9. doi: 10.1093/jac/dkg338. Epub 2003 Aug 13. PMID: 12917253.
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia-Jaramillo AM *et al.* International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(1): e931. doi:10.1371/journal.pntd.0000931.
- Schijman AG, Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica.* 2018 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.019>.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007,v. 102, n. 8, Sup. II, p. 75-85.
- Schmunis GA; Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010,115, 14–21.
- Schofield CJ; Dias JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol.* 1999, 42, 1–27.

- Schütz E, von Ahsen N. Influencing factors of dsDNA dye (high-resolution) melting curves and improved genotype call based on thermodynamic considerations. *Anal Biochem.* 2009;385(1):143–152. doi:10.1016/j.ab.2008.10.045.
- Seipp MT, Pattison D, Durtschi JD, Jama M, Voelkerding KV, Wittwer CT. Quadruplex genotyping of F5, F2, and MTHFR variants in a single closed tube by high-resolution amplicon melting. *Clin Chem.* 2008;54:108–115.
- Seiringer P, Pritsch M, Flores-Chavez M, Marchisio E, Helfrich K, Mengele C, *et al.* Comparison of four PCR methods for efficient detection of *Trypanosoma cruzi* in routine diagnostics. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;Jul;88(3):225-232.
- Shaw BE, Maldonado H, Madrigal JA, Smith C, Petronzelli F, Mayor NP, *et al.* Polymorphisms in the *TNFA* gene promoter region show evidence of Strong linkage disequilibrium with HLA and are associated with delayed neutrophil engraftment in unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens.* 2004;63:401–11.
- Shikanai-Yasuda, MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, *et al.* Possible oral transmission of acute Chagas disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop. Sao Paulo* 1991,33, 351–357.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.* 2012;54:845-52.
- Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon- activated macrophages. *Infect Immun.* 1995; 63: 4862–4867. 44 Marques J, Mendoza.
- Silveira AC. Os novos desafios e perspectivas futuras do controle. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2011,v. 44, p. 122-124.
- Silveira AC, Dias JC. O controle da transmissão vetorial [The control of vectorial transmission]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011,44 Suppl 2:52-63. Portuguese. doi: 10.1590/s0037-86822011000800009. PMID: 21584358.
- Silveira AC, Vinhaes MC. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94:405-411.

- Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;Feb;20(1):43-59. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.11.006. Epub 2008 Nov 28. PMID: 19038572.
- Sohail M, Kaul A, Bali P, Raziuddin M, Singh MP, Singh OP, et al. Alleles -308A and -1031C in the TNF-alpha gene promoter do not increase the risk but associated with circulating levels of TNF-alpha and clinical features of vivax malaria in Indian patients. *Mol Immunol.* 2008;45:1682–92.
- Sosa-Estani S, Segura EL. Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110:289-98.
- Sousa GR, Gomes JA, Damasio MP, Nunes MC, Costa HS, Medeiros NI, Fares RC, Chaves AT, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO. The role of interleukin 17-mediated immune response in Chagas disease: High level is correlated with better left ventricular function. *PLoS One.* 2017 Mar 9;12(3):e0172833. doi: 10.1371/journal.pone.0172833. PMID: 28278264; PMCID: PMC5344340.
- Sousa OE, Samudio F, de Juncá C, Calzada JE. Molecular characterization of human *Trypanosoma cruzi* isolates from endemic areas in Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;Jun; 101(4):455–7.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996;Dec 20;83(2):141-52. doi: 10.1016/s0166-6851(96)02755-7. PMID: 9027747.
- Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;62, 45–52.
- Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun.* 2004;Sep;72(9):5283-91. doi: 10.1128/IAI.72.9.5283-5291.2004. PMID: 15322024; PMCID: PMC517423.

- Sthoeger ZM, Sharabi A, Dayan M, Zinger H, Asher I, Sela U, *et al.* The tolerogenic peptide hCDR1 downregulates pathogenic cytokines and apoptosis and upregulates immunosuppressive molecules and regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells of lupus patients. *Hum Immunol.* 2009;Mar;70(3):139-45. doi: 10.1016/j.humimm.2009.01.018. PMID: 19280712.
- Strout RG. A method for concentrating hemoflagellates *J Parasitol.* 1962,vol. 48, no. 1, p. 100.
- Sturm NR, Campbell DA. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2010;115, 35-43.
- Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 2003;33, 269-279.
- Sun XG, Cao EH, He YJ, Qin JF. Spectroscopic comparison of different DNA structures formed by oligonucleotides. *J Biomol Struct Dyn.* 1999;Feb;16(4):863-72. doi: 10.1080/07391102.1999.10508298. PMID: 10217455.
- SVS/MS (Secretaria de Vigilância em Saúde Ministério da Saúde). Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. *Boletim Epidemiológico.* 2019, Volume 50, Nº 02 Jan.
- Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomez YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in Chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* 2004;38:943–50.
- Tan JH, Price P, Gut I, Stacey MC, Warrington NM, Wallace HJ. Characterization of tumor necrosis factor – block haplotypes associated with susceptibility to chronic venous leg ulcers in Caucasian patients. *Hum Immunol.* 2010;71:1214–9.
- Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gürtler RE. The challenges of Chagas disease—grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med.* 2007;4:e332.
- Tavares de Oliveira M, Sulleiro E, Silgado Gimenez A, de Lana M, Zingales B, Santana da Silva J, *et al.* Quantification of parasite burden of *Trypanosoma cruzi* and identification of Discrete Typing Units (DTUs) in blood samples of Latin American immigrants residing in Barcelona, Spain. *PLoS Negl Trop Dis.*

2020:Jun 4;14(6):e0008311. doi: 10.1371/journal.pntd.0008311. PMID: 32497037; PMCID: PMC7271996.

Teixeira AR, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev.* 2011. Jul;24(3):592-630. doi: 10.1128/CMR.00063-10. PMID: 21734249; PMCID: PMC3131057.

Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 2002; 18: 262–265.

Tibayrenc M. Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998a, 93:577–80.

Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and otherinfectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol.* 1998b, 28, 85-104.

Tibayrenc M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2003, 2(1):12.

Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.* 2002;18, 405-410.

Tomasini N, Diosque P. Evolution of *Trypanosoma cruzi*: clarifying hybridisations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2015;110, 403-413.

Tomazi L, Kawashita SY, Pereira PM, Zingales B, Briones MR. Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic. *Genet Mol Res.* 2009;8, 458-476

Toomer KH, Malek TR. Cytokine Signaling in the Development and Homeostasis of Regulatory T cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;Mar 1;10(3):a028597. doi: 10.1101/cshperspect.a028597. PMID: 28620098; PMCID: PMC5830895.

Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González A, González CI, *et al.* Lack of association between IL-6-174G/C gene polymorphism and Chagas disease.

Tissue Antigens. 2010a;Aug;76(2):131-4. doi: 10.1111/j.1399-0039.2010.01478.x. Epub 2010 Mar 22. PMID: 20331841.

Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González A, González CI, *et al.* Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. Infect Genet Evol. 2010b;Jul;10(5):682-5. doi: 10.1016/j.meegid.2010.03.009. Epub 2010 Mar 30. PMID: 20359550; PMCID: PMC7106279.

Torrico F, Gascón J, Barreira F, Blum B, Almeida IC, Alonso-Vega C, Barboza T, Bilbe G, Correia E, Garcia W, Ortiz L, Parrado R, Ramirez JC, Ribeiro I, Strub-Wourgaft N, Vaillant M, Sosa-Estani S, & BENDITA study group. New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. The Lancet. Infectious diseases, 2021; S1473-3099(20)30844-6. Advance online publication.

Turner DM, Grant SC, Lamb WR, Brenchley PE, Dyer PA, Sinnott PJ *et al.* A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients. Transplantation. 1995;Nov 27;60(10):1113-7. doi: 10.1097/00007890-199511270-00010. PMID: 7482718.

Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Na investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet. 1997;24: 1–8.

Udalova IA, Nedospasov SA, Webb GC, Chaplin DD, Turetskaya RL. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. Genomics 1993;16:180 –186.

Uglieri AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG, *et al.* Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. Tissue Antigens. 1998;Oct;52(4):359-67. doi: 10.1111/j.1399-0039.1998.tb03056.x. PMID: 9820599; PMCID: PMC2518982.

- Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, et al. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*. 2003; 43(1): 91-7.
- Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Corrêa-Oliveira R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*. 1996;348: 891-892.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 2000;May;156(5):1805-9. doi: 10.1016/s0002-9440(10)65052-3. PMID: 10793092; PMCID: PMC1876933.
- Valente VC, Pinto AYN, Valente SAS. Novo episódio familiar com 7 casos de doença de Chagas aguda e autóctone em Bagre Estado do Pará. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXXVI, TL 113, Ver Soc Bras Med Trop. 2000; 33(Supl.I):388–389.
- Valadares HM, Pimenta JR, de Freitas JM, Duffy T, Bartholomeu DC, Oliveira R de P, et al. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int J Parasitol*. 2007;38:839–50.
- Validade do conceito de forma indeterminada de doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1985;jan-mar;18(1):46.
- Vargas N, Pedroso A, Zingales B. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;138:131-141.
- Vasconcelos RH, Azevedo Ede A, Diniz GT, Cavalcanti Mda G, de Oliveira W Jr, de Moraes CN, Gomes Yde M. Interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha serum levels in chronic Chagas disease patients. *Parasite Immunol*. 2015 Jul;37(7):376-9. doi: 10.1111/pim.12183. PMID: 25728555.
- Vejbaesya S, Luangtrakool P, Luangtrakool K, Kalayanaroj S, Vaughn DW, Endy TP, et al. Allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. *J Infect Dis*. 2009;199:1442–8.

- Velásquez-Ortiz N, Ramírez JD. Understanding the oral transmission of *Trypanosoma cruzi* as a veterinary and medical foodborne zoonosis. *Res Vet Sci.* 2020 Oct;132:448-461. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.07.024. Epub 2020 Aug 3. PMID: 32781335.
- Villani FN, Rocha MO, Nunes M do C, Antonelli LR, Magalhães LM, dos Santos JS, *et al.* *Trypanosoma cruzi*-induced activation of functionally distinct $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ CD4- CD8- T cells in individuals with polar forms of Chagas disease. *Infect Immun.* 2010; 78: 4421–4430.
- Vilar-Pereira G, Resende Pereira I, de Souza Ruivo LA, Cruz Moreira O, da Silva AA, Britto C, Lannes-Vieira J. Combination Chemotherapy with Suboptimal Doses of Benznidazole and Pentoxifylline Sustains Partial Reversion of Experimental Chagas' Heart Disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2016;60(7), 4297–4309. <https://doi.org/10.1128/AAC.02123-15>.
- Villela MM, Souza JM, Melo V de P, Dias JC. Avaliação do Programa de Controle da Doença de Chagas em relação à presença de *Panstrongylus megistus* na região centro-oeste do Estado de Minas Gerais, Brasil [Evaluation of the Chagas Disease Control Program and presence of *Panstrongylus megistus* in central-western Minas Gerais State, Brazil]. *Cad Saude Publica.* 2009, Apr;25(4):907-17. Portuguese. doi: 10.1590/s0102-311x2009000400022. PMID: 19347217.
- Vinhaes MC, de Oliveira SV, Reis PO, de Lacerda Sousa AC, Silva RA, Obara MT, *et al.* Assessing the vulnerability of Brazilian municipalities to the vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* using multi-criteria decision analysis. *Acta Trop.* 2014, Sep;137:105-10. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.05.007. Epub 2014 May 22. PMID: 24857942.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, *et al.* Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med.* 2006,144(10):724-34.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Faria AM, *et al.* Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas

- disease. Scand J Immunol. 2008;Nov;68(5):516-25. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02167.x. Epub 2008 Sep 18. PMID: 18803607.
- Volpato FCZ, Sousa GR, D'Ávila DA, Galvão LMDC, Chiari E. Combined parasitological and molecular based diagnostic tools improve the detection of *Trypanosoma cruzi* in single peripheral blood samples from patients with Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop. 2017;50(4):506–515.
- Vossen RH, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. Hum Mutat. 2009;Jun;30(6):860-6. doi: 10.1002/humu.21019. PMID: 19418555.
- Xavier SCdC, Roque ALR, Bilac D, de Araújo VAL, Neto SFdC, Lorosa ES, *et al.* Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(5): e2878.doi:10.1371/journal.pntd.0002878.
- Waghabi MC, de Souza EM, de Oliveira GM, Keramidas M, Feige JJ, Araújo-Jorge TC, & Bailly S. Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009;53(11), 4694–4701. <https://doi.org/10.1128/AAC.00580-09>.
- Waleckx E, Gourbière S, Dumonteil E. Intrusive triatomines and the challenge of adapting vector control practices. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015,110, 324–338.
- Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 1989;44(3):388e96.
- Weiss KM. In search of human variation. Genome Res. 1998;Jul;8(7):691-7. doi: 10.1101/gr.8.7.691. PMID: 9685316.
- Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Genetics. 2005;171, 527-543.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:3195 –3199.

- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997a;22, 130–131, 134–138.
- Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ: The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*. 1997b;22, 176–181.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*. 2003;49:853–860.
- Wittwer CT, Kuskawa N. Real-time PCR. In: *Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications*. Persing DH, Tenover FC, Versalovic J *et al.* (Eds). ASM Press, Washington DC, USA. 2004;71–84.
- Wittwer CT, Kuskawa N: Nucleic acid techniques. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (4th Edition)*. Burtis C, Ashwood E, Bruns D (Eds.). Elsevier, New York, NY, USA. 2005:1407–1449.
- WHO (World Health Organization). Anti-trypanosoma cruzi assays: operational characteristics. Report 1. World Health Organization. 2010,38p <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75844>.
- WHO (World Health Organization) 2015. Chagas diseases in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Available: <https://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1> Accessed: 2021 January 26.
- WHO (World Health Organization) 2021. Fact sheets: Chagass Disease (also known as American trypanosomiasis). Available: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) Accessed: 2021 May 19.
- Wood NAP, Keen LJ, Tilley LA, Bidwell JL. Determination of cytokine regulatory haplotypes by induced heteroduplex analysis of DNA. *J Immunol Methods* 2001;249:191 –198.
- Yang SA. Exonic polymorphism (rs315952, Ser133Ser) of interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN) is related to overweigh/obese with hypertension. *J Exerc*

Rehabil. 2014 Oct 31;10(5):332-6. doi: 10.12965/jer.140155. PMID: 25426473; PMCID: PMC4237851.

Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Acosta N, *et al.* Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5, e1049.

You CG, Li XJ, Li YM, Wang LP, Li FF, Guo XL, *et al.* Association analysis of single nucleotide polymorphisms of proinflammatory cytokine and their receptors genes with rheumatoid arthritis in northwest Chinese Han population. Cytokine. 2013;Jan;61(1):133-8. doi: 10.1016/j.cyto.2012.09.007. Epub 2012 Nov 11. PMID: 23148991.

Zafra G, Morillo C, Martín J, González A, González CI, Polymorphism in the 3 UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy, Microbes Infect. 2007;vol. 9, no. 9, pp. 1049–1052.

Zeggini E, Thomson W, Kwiatkowski D, Richardson A, Ollier W, Donn R, British Paediatric Rheumatology Study Group. Linkage and association studies of single-nucleotide polymorphism-tagged tumor necrosis factor haplotypes in juvenile oligoarthritis. Arthritis Rheum 2002;46(12):3304e11.

Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. J Infect Dis. 1999;Aug;180(2):480-6. doi: 10.1086/314889. PMID: 10395865.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR. *et al.* Molecular epidemiology of American tripanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol*, v. 28, p. 105-12, 1998.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari O, Fernandes O, *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009: v. 104, n. 7, p. 1051-54.


Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira, MM, *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale,

epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2): 240-53.

Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica.* 2017 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>.

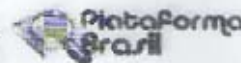
Anexo 1

Documento que consta o CEP autorizando a análise das amostras de sangue dos indivíduos com ou sem DC para a obtenção da carga parasitária e identificação do genótipo de *Trypanosoma cruzi*.

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - IPEC / FIOCRUZ		
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Correlação entre biomarcadores, carga parasitária e formas clínicas da doença de Chagas		
Pesquisador: Roberto Magalhães Saralva		
Área Temática:		
Versão: ?		
CAAE: 46620715.0.0000.5262		
Instituição Proponente: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC / FIOCRUZ		
Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.215.633		
Apresentação do Projeto:		
<p>Trata-se de um projeto de doutoramento que pretende estudar os mecanismos que influenciam a progressão da forma indeterminada para a forma cardíaca ou a ocorrência dos eventos cardiovasculares da forma cardíaca na Doença de Chagas. Segundo a autora, a forma cardíaca da doença possui alta morbimortalidade, seja por insuficiência cardíaca, morte súbita ou eventos embólicos. Além disso, o envelhecimento da população com Doença de Chagas faz com que comorbidades, como a síndrome metabólica, hipertensão e diabetes mellitus, possam influenciar o prognóstico e a qualidade de vida desta população. A persistência do parasito e o desbalanço da resposta imunológica frente ao parasito são fatores considerados importantes para a progressão da doença. Atualmente, estuda-se se biomarcadores, que podem refletir diversos processos da fisiopatologia da Doença de Chagas, e podem ser úteis para sinalizar pacientes com Doença de Chagas que sejam mais graves e/ou que tenham pior prognóstico.</p>		
Objetivo da Pesquisa:		
Objetivo Primário:		
Correlacionar os valores dos biomarcadores e carga parasitária com as formas clínicas da doença de Chagas.		
Objetivos Secundários:		
Endereço: Avenida Brasil 4365		
Bairro: Manguinhos		
UF: RJ		
Município: RIO DE JANEIRO		
CEP: 21.040-360		
Telefone: (21)3865-9585		
E-mail: cep@pec.fiocruz.br		

Página 01 de 04

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Protocolo: 1.215.833

- Determinar os valores séricos de biomarcadores (pro-BNP, troponina, TGF-1, MMP-2 e MMP-9, TNF, IFN-, IL-6, IL-10 e IL-17) na forma Indeterminada e nos diversos estágios da forma cardíaca da Doença de Chagas.
- Determinar a carga parasitária por técnica de PCR quantitativo na forma indeterminada e nos diversos estágios da forma cardíaca da Doença de Chagas.
- Determinar a prevalência de comorbidades na forma indeterminada e nos diversos estágios da forma cardíaca da Doença de Chagas.
- Determinar o perfil metabólico com dosagem sérica de lipidograma, glicemia, leptina, adiponectina e insulina de pacientes na forma Indeterminada e nos diversos estágios da forma cardíaca da Doença de Chagas.
- Correlacionar os níveis séricos de biomarcadores com a carga parasitária na Doença de Chagas.

Critério de Inclusão:

Pacientes com Doença de Chagas em fase crônica com sorologia positiva em dois testes diferentes (imunofluorescência indireta e o ensaio imuno-enzimático), de ambos os sexos, com idade maior que 18 anos.

Critério de Exclusão:

Pacientes com co-infecção, doença autoimune, doenças crônicas cujo tratamento requer o uso permanente de anti-inflamatórios ou imunossupressores, câncer, gestantes, doenças cardiovasculares associadas que dificultam a classificação da forma cardíaca da Doença de Chagas.

O estudo pretende reunir 302 participantes. Estes serão divididos em grupos, de acordo com o acometimento da Doença de Chagas (forma digestiva: n = 40; forma indeterminada: n = 70; e forma cardíaca: n = 192).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os procedimentos deste projeto oferecem risco mínimo aos pacientes. Haverá uma única coleta de sangue para testes em laboratório. A coleta de sangue pode causar um pequeno desconforto (semelhante a uma picada de inseto), com eventual, transitória e pequena ardência no local da coleta. Outro risco é a confidencialidade dos dados dos pacientes. Este risco será minimizado ao se atribuir um código para cada paciente incluído no estudo. Todas as amostras dos pacientes serão desidentificadas através do uso desse código. O código ficará sob a guarda do pesquisador principal. Os pesquisadores envolvidos se comprometem a manter em sigilo a identidade dos pacientes, assim como a confidencialidade e a privacidade dos dados obtidos.

Benefícios:

Endereço: Avenida Brasil 4365
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3885-9585 E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Controle de Acesso: 1.215.633

Os benefícios gerados por esse estudo são do tipo indireto ao se obter dados que permitirão conhecer melhor a Doença de Chagas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, de extremo interesse no contexto epidemiológico brasileiro. Bem fundamentada, com metodologia detalhada e definição clara dos riscos e benefícios resultantes da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados. TCLE em linguagem clara e acessível.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto candidata a doutorado Veronica Mendes submetido ao CEP.docx	23/06/2015 22:53:08		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE projeto candidata Veronica Mendes.docx	23/06/2015 23:00:05		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto projeto correlação biomarcadores Chagas.pdf	25/06/2015 21:36:16		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_538275.pdf	26/06/2015 17:44:02		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE projeto candidata Veronica Mendes versao 2.docx	14/08/2015 23:38:20		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto candidata a doutorado Veronica Mendes submetido ao CEP_2.docx	14/08/2015 23:38:57		Aceito
Outros	Termo de Compromisso para Armazenamento de Amostras Biológicas Humanas em	14/08/2015 23:38:22		Aceito

Endereço: Avenida Brasil 4385

Bairro: Mangulhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

Anexo 2

Documento que consta o CEP autorizando a análise das amostras de sangue dos indivíduos sem DC para a formação do grupo de controle negativo para a identificação de SNPs em genes de citocina humanos.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da associação de polimorfismos genéticos com a forma de apresentação da fase crônica da doença de Chagas.

Pesquisador: Roberto Magalhães Saralva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 65360017.4.0000.5262

Instituição Proponente: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

Patrocinador Principal: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.222.253

Apresentação do Projeto:

Apesar do sucesso dos programas de combate à transmissão vetorial domiciliar e do controle da transmissão transfusional a doença de Chagas persiste como importante agravo acometendo mais de 4 milhões de brasileiros, segundo a estimativa mais recente. A fase crônica da doença de Chagas possui três formas distintas: indeterminada, cardíaca e digestiva. A forma indeterminada inclui pacientes sem evidência de dano estrutural orgânico cardíaco ou digestivo e que assim podem permanecer por anos a décadas. Ainda que a maioria dos portadores crônicos da doença de Chagas apresentem-se na forma indeterminada, cerca de 20 a 30% apresentam a forma cardíaca ou irão evoluir da forma indeterminada para a forma cardíaca. Porém, ainda hoje não se sabe qual o mecanismo exato que governa a progressão da forma indeterminada para a forma cardíaca e da mesma forma faltam marcadores confiáveis de quais pacientes irão progredir da forma indeterminada para a cardíaca ou dos estágios mais iniciais da forma cardíaca para os estágios mais graves. Acredita-se que a fisiopatologia da doença de Chagas seja governada pela persistência do parasita no miocárdio e o estímulo a respostas inflamatórias, como hipersensibilidade retardada e mecanismos autoimunes com inflamação e fibrose reparativa. Atualmente, considera-se que exista um balanço entre agressão do parasita e resposta do hospedeiro com estímulos inflamatórios e anti-inflamatórios e que o desbalanço entre estes

Endereço: Avenida Brasil 4360
Bairro: Mangueiras CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3465-8248 E-mail: cep@ini.fiocruz.br

Continuação do Parecer 2.265.253

estímulos favoreça a progressão da forma indeterminada para a cardíaca. Nesta linha, nosso grupo tem três projetos aprovados no CEP do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) sob números: 02826212.8.0000.5262, 23959813.7.0000.5262 e 46820715.0.0000.5262 que abordam a correlação do polimorfismo do gene do fator de transformação do crescimento (TGF-1) com as formas da doença de Chagas e a correlação com as formas da doença de Chagas e o valor prognóstico de novas variáveis ecocardiográficas, biomarcadores do hospedeiro e carga parasitária e tipo molecular do *Trypanosoma cruzi*. O presente projeto é uma continuação e extensão destes projetos em andamento.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Correlacionar marcadores genéticos do hospedeiro com as formas clínicas da doença de Chagas e com a suscetibilidade à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Objetivo Secundário:

- Desenvolver metodologia de genotipagem por HRM (High Resolution Melting) e analisar SNPs nos genes TNFA (-308G/A, -238G/A, -1031T/C), IL1B (-5810G/A), IL1RN (.4T/C), IL10 (-1082G/T), IL12B (+1188A/C), TGF1 (101/C), IFNG (+874T/A), IL18 (rs2043055A/G, rs360719C/T), IL4 (-509C/T), LTA (+80A/C, +252A/C), CCL2/MCP-1 (-2518A/G), MIF (-173G/C), BAT1 (-348C/T, -22C/G) humanos, a partir de DNA extraído do sangue de pacientes crônicos, conforme descrito acima- Investigar a correlação entre os biomarcadores analisados e a forma clínica da doença de Chagas crônica.
- Investigar a correlação entre os biomarcadores analisados e a suscetibilidade à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O único risco envolvido para os pacientes é a perda de confidencialidade dos dados já que não está previsto coleta de nova amostra de sangue. Em relação a este aspecto, as amostras guardadas estão deidentificadas através do uso de códigos o que minimiza este risco. Não obstante, anexo à presente submissão o Termo de Compromisso e Responsabilidade devidamente assinado, assumindo o compromisso com o sigilo das informações obtidas.

Benefícios:

Os benefícios gerados por esse estudo são do tipo indireto ao se obter dados que permitirão

Endereço: Avenida Brasil 4366
Bairro: Manguinhos CEP: 21.310-300
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3965-5595 E-mail: cep@n.fiocruz.br

Contrato de Fomento 2.22.259

conhecer melhor a doença de Chagas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo tem caráter seccional. Os pacientes serão agrupados conforme a fase clínica em que se encontravam na época da inclusão no projeto. Serão classificados conforme o Consenso Brasileiro em doença de Chagas. A forma cardíaca da doença de Chagas será classificada em quatro estágios: Estágio A: Eletrocardiograma (ECG) com alterações típicas da doença de Chagas e função sistólica global e segmentar do ventrículo esquerdo (VE) ao ecocardiograma normais; Estágio B: Ausência de clínica de insuficiência cardíaca (IC), com ECG alterado e função sistólica global e/ou segmentar do VE alteradas ao ecocardiograma; Estágio C: clínica compatível com IC presente ou no passado; Estágio D: IC refratária a tratamento clínico. A prevalência dos SNPs de cada gene será determinada e seus valores comparados entre os diversos grupos estudados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto: apresentada adequadamente - folhaderostoprojetopolimorfismo.pdf

Projeto Detalhado/Brochura Investigador: apresentada adequadamente - projeto_polimorfismo_na_doenca_de_ChagasversaoCEPR1.doc

TCLE/Justificativa de Ausência do TCLE: apresentada, mas possui pendências -

projeto_polimorfismo_na_doenca_de_Chagasversao2.doc

Declaração de Pesquisadores: apresentada adequadamente: dispensaTCLEprojetoPolimorfismosChagas.pdf

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Auto	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 861576.pdf	04/08/2017 14:14:22		Aceito
Outros	resposta_ao_CEP_projetoPolimorfismosnaDoencaDeChagas.docx	04/08/2017 14:13:21	Roberto Magalhães Saralva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	dispensaTCLEprojetoPolimorfismosChagas.pdf	04/08/2017 14:09:54	Roberto Magalhães Saralva	Aceito

Endereço: Avenida Brasil 4385

Bairro: Marquinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2065-9595

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 2.222.253

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEprojeto_polimorfismo_na_doenca_de_Chagasversao2.doc	04/08/2017 14:05:51	Roberto Magalhães Saraiva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_polimorfismo_na_doenca_da_C_hagasversaoCEPR1.doc	04/08/2017 14:04:30	Roberto Magalhães Saraiva	Aceito
Folha de Rosto	folhadestoprojetopolimorfismo.pdf	19/02/2017 10:41:13	Roberto Magalhães Saraiva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 16 de Agosto de 2017

Assinado por:
Lãa Ferreira Camillo Coura
(Coordenador)

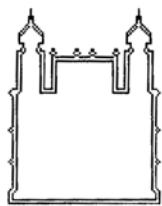
Dr. Lãa Ferreira Camillo Coura
Vice Coordenadora do Comitê de Ética
Méd. SUPLE - Biotério
RPP-00302

Endereço: Avenida Brasil 4366
Bairro: Marquês CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3865-0585 E-mail: cep@ini.fiocruz.br

Forma B- em C4

Anexo 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Versão 2).



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ



INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
LABORATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇA DE CHAGAS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: **Correlação entre biomarcadores, carga parasitária e formas clínicas da doença de Chagas**

Você está sendo convidado a participar de um estudo sobre doença de Chagas. A Doença de Chagas pode provocar danos ao coração mesmo quando tratada corretamente. Nesta pesquisa queremos avaliar a concentração no sangue de algumas substâncias para descobrir se o seu nível aumentado pode ou não fazer com que a pessoa com doença de Chagas tenha maior risco de ter problemas no coração. Estas substâncias são moléculas inflamatórias e marcadores de doença do coração. Além disso, queremos dosar a quantidade de parasitos e o seu tipo no seu sangue para estudar se isso muda o seu risco de ter problemas no coração.

Para participar deste estudo o (a) Sr.(a)., como voluntário, deverá ser submetido a uma coleta de seu sangue para testes em laboratório. A coleta de sangue que será realizada poderá causar um pequeno desconforto (semelhante a uma picada de inseto), com eventual, transitória e pequena ardência no local da coleta.

Esteja ciente que sua participação é VOLUNTÁRIA, o que significa que o (a) Sr. (a) poderá decidir se quer ou não participar deste estudo, ou caso haja qualquer DESCONFORTO ou CONSTRANGIMENTO durante o mesmo o Sr.(a) poderá solicitar a não participação ou desistência do estudo. Caso não aceite ou desista de participar do estudo, seu tratamento ocorrerá sem nenhum prejuízo.

Este estudo ocorrerá de forma CONFIDENCIAL e manterá seu ANONIMATO em todos os exames que realizar e também sobre seu diagnóstico. Somente a equipe de profissionais envolvida neste estudo terá conhecimento dos resultados dos exames que realizar e do conteúdo que foi informado durante a(s) consulta(s).

A sua participação neste estudo é fundamental e poderá gerar benefícios para as pessoas portadoras de doença de Chagas ao se obter informações que permitirão conhecer melhor a doença de Chagas.

Rubrica do Paciente do Estudo: _____ Rubrica do Representante Legal "se houver": _____ Rubrica do membro da equipe que obteve o Termo: _____

O Sr.(a) deverá estar ciente que participando deste projeto, estará autorizando o armazenamento da amostra de sangue utilizada por um período mínimo de 5 anos. Esta amostra não será utilizada para outra finalidade ou outra pesquisa.

Em caso de participação voluntária, este documento deverá ser assinado em duas vias onde uma ficará com você voluntário ou responsável e outra com o pesquisador.

Em caso de qualquer dúvida, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com o Coordenador do Projeto Roberto Magalhães Saraiva, no IPEC – FIOCRUZ no endereço: Av. Brasil, 4365, IPEC, Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP.: 21.040-361. Telefones: 38659648/999809930.

Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IPEC. Se você deseja obter maiores informações relacionadas ao CEP, por favor, entre em contato com o comitê pelo telefone 38659595 ramal 9585.

Após ter pessoalmente lido ou ter ouvido atentamente a leitura deste termo e da informação contida em todas as páginas deste documento, tive a oportunidade de fazer perguntas relacionadas à minha participação neste estudo que foram respondidas de forma satisfatória e compreensível. Confirmando meu consentimento voluntário para participar nesta pesquisa e entendo que tenho o direito de me retirar do estudo a qualquer momento sem que esta decisão afete de alguma maneira o meu cuidado médico.

NOME DO PARTICIPANTE: _____

ASSINATURA DO PARTICIPANTE: _____

DATA: _____

Se o participante não puder ler e ou assinar :

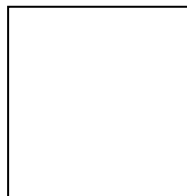
Certifico que este documento de consentimento informado foi lido de maneira completa e clara e que o voluntário teve a oportunidade de fazer perguntas que foram respondidas satisfatoriamente. Confirmando que o participante deu seu consentimento para participar nesta pesquisa de maneira voluntária.

NOME DA TESTEMUNHA: _____

ASSINATURA DA TESTEMUNHA: _____

DATA: _____

Polegar Direito do Participante:



Certifico que verifiquei pessoalmente a leitura pelo voluntário, ou li para ele de modo completo este termo de consentimento livre e esclarecido. O paciente teve a oportunidade de perguntar e recebeu respostas satisfatórias. Confirmando que o paciente forneceu seu consentimento voluntariamente.

NOME DO INVESTIGADOR: _____

ASSINATURA DO INVESTIGADOR: _____

DATA: _____

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi entregue ao participante _____ (iniciais do paciente)

Anexo 4

Dados dos 130 pacientes analisados com relação à carga parasitária, genótipo de *T. cruzi*, sexo, forma clínica da doença de Chagas e naturalidade.

Pacientes	Carga Parasitária (eq. parasitos/mL)	DTU	Sexo	Forma clínica	Naturalidade
1	5,60 ±0,11	II	M	Estágio A	MG
2	0,41 ±0,16	II	H	Estágio B1	PE
3	1,85 ±0,94	VI	M	Indeterminada	BA
4	3,56 ±0,07	II	M	Estagio C	GO
5	0,05 ±0,03	VI	M	Mista	MG
6	3,06 ± 2,43	II/VI	H	Indeterminada	PE
7	2,70 ±1,33	VI	M	Estagio A	MG
8	0,97 ±0,15	II	M	Indeterminada	MG
9	0,003 ±0,001	VI	H	Estagio C	MG
10	0,21 ±0,04	VI	H	Digestiva	PERU
11	2,77 ± 1,97	II/VI	M	Indeterminada	AL
12	2,26 ±0,50	VI	H	Indeterminada	BA
13	2,46 ± 1,33	II/VI	M	Estágio A	BA
14	0,103 ±0,003	II/VI	H	Estágio B1	PB
15	0,19 ±0,01	II/VI	M	Mista	BA
16	2,05 ± 1,95	II/VI	M	Estágio B1	PI
17	1,40 ±0,85	II	M	Estágio A	MG
18	0,44 ±0,39	II	M	Mista	PE
19	0,09 ±0,01	II	M	Estágio A	PB
20	0,04 ±0,03	II/VI	M	Mista	BA
21	0,04 ±0,04	VI	M	Estágio B1	MG
22	0,22 ±0,03	VI	M	Estágio A	MG
23	6,15 ± 1,43	II/VI	M	Estágio B2	MG
24	2,49 ±2,1	II/VI	M	Estágio A	BA
25	0,02 ±0,01	VI	H	Estágio B2	BA
26	0,04 ±0,03	II	M	Estágio C	MG
27	0,05 ±0,01	VI	M	Digestiva	SE
28	0,005 ±0,03	VI	H	Estágio B1	BA
29	0,04 ± 0,03	VI	M	Estágio A	MG
30	10,12 ±2,44	II	M	Estágio A	BA
31	0,44 ±0,16	V	M	Estágio C	BA
32	0,35 ±0,11	II	H	Indeterminada	PE
33	0,05 ±0,02	VI	M	Estágio B1	MG
34	1,81 ± 1,73	VI	M	Digestiva	BA
35	0,80 ±0,35	II	M	Estágio B1	CE
36	2,09 ±0,34	II/VI	M	Indeterminada	CHILE
37	0,20 ±0,16	VI	H	Indeterminada	MG
38	9,00 ±0,29	II	M	Estágio A	PE
39	0,07 ±0,03	II/VI	M	Estágio A	BA

40	4,48 ±1,81	VI	M	Indeterminada	BA
41	0,23 ±0,15	VI	M	Indeterminada	RS
42	27,88 ±2,86	VI	H	Mista	BA
43	0,33 ±0,16	II	M	Mista	PE
44	0,05 ±0,006	IV	M	Estágio A	PE
45	0,41 ±0,05	II+V	H	Indeterminada	PB
46	25,71 ± 6,09	VI	M	Estágio A	MG
47	5,58 ±1,86	II	H	Mista	PB
48	1,23 ±0,37	VI	M	Indeterminada	MG
49	0,15 ±0,008	II/VI	M	Estágio B1	MG
50	0,011 ±0,008	VI	H	Estágio A	BA
51	0,44 ±0,12	II	M	Estágio A	PB
52	2,53 ±0,82	II	M	Estágio A	RJ
53	0,17 ±0,06	II/VI	H	Estágio C	MG
54	0,39 ± 0,05	II/VI	H	Indeterminada	RJ
55	58,26 ±8,24	VI	H	Estágio C	PB
56	9,87 ±4,40	VI	H	Estágio A	PB
57	14,82 ± 4,68	II/VI	M	Indeterminada	RJ
58	0,42 ±0,02	VI	H	Estágio C	CE
59	0,02 ±0,01	II/VI	H	Estágio B1	PB
60	0,003 ±0,002	II/VI + V	H	Indeterminada	MG
61	2,10 ±0,4	VI	M	Estágio A	AL
62	0,68 ±0,23	VI	M	Estágio C	AL
63	0,04 ±0,02	VI	H	Estágio B1	GO
64	1,03 ±0,23	VI	M	Estágio B1	MG
65	2,17 ±0,62	VI	H	Estágio B2	MG
66	0,12 ±0,05	II/VI	M	Estágio D	BA
67	0,63 ±0,35	VI	M	Indeterminada	BA
68	2,71 ±0,36	II	M	Estágio A	RJ
69	0,82 ±0,29	II	M	Mista	RJ
70	0,77 ±0,33	II	H	Estágio B1	GO
71	0,02 ±0,01	VI	H	Estágio A	AL
72	0,10 ±0,05	II	M	Indeterminada	PB
73	72,21 ±8,56	II	H	Estágio B1	PE
74	0,23 ±0,04	II+IV	H	Estágio C	PE
75	7,60 ±0,93	II	H	Indeterminada	PE
76	0,03 ±0,01	VI	H	Indeterminada	BA
77	1,48 ±0,21	II	H	Estágio B1	MG
78	0,82 ±0,56	II	H	Estágio C	PE
79	0,87 ±0,50	II	H	Estágio B1	PE
80	0,09 ±0,03	II	H	Estágio B1	AL
81	0,39 ±0,20	II	M	Estágio A	BA
82	0,05 ±0,01	VI	M	Mista	CE
83	21,65 ±1,79	VI	M	Mista	CE
84	4,68 ±0,32	II	M	Estágio A	BA
85	0,09 ±0,02	II	M	Mista	AL

86	0,36 ±0,20	II/VI	M	Estágio A	CE
87	0,04 ±0,02	II	H	Estágio A	CE
88	0,034 ±0,008	II	M	Estágio A	PB
89	1,73 ±0,40	II	H	Estágio C	BA
90	0,07 ±0,05	II	M	Indeterminada	BA
91	0,03 ±0,01	II	M	Estágio C	PE
92	1,44 ±0,35	II	H	Indeterminada	MG
93	0,58 ±0,29	VI	M	Indeterminada	MG
94	0,14 ±0,03	II	H	Mista	PE
95	2,10 ±0,44	II	M	Indeterminada	BA
96	0,18 ±0,07	VI	H	Estágio D	PB
97	0,13 ±0,09	VI	H	Estágio A	PB
98	0,007 ±0,002	II	H	Indeterminada	PE
99	0,008 ±0,003	II	M	Estágio C	PE
100	1,23 ±0,09	VI	H	Estágio C	PB
101	32,33 ±10,60	VI	M	Indeterminada	BA
102	1,51 ±0,31	II	H	Digestiva	SE
103	0,31 ±0,23	VI	H	Indeterminada	AL
104	0,022 ±0,004	VI	M	Mista	BA
105	0,51 ±0,39	VI	H	Estágio B1	PB
106	0,05 ±0,04	VI	M	Estágio A	AL
107	1,05 ±0,22	II	M	Digestiva	BA
108	0,28 ±0,08	VI	M	Estágio B1	BA
109	0,28 ± 0,17	VI	M	Indeterminada	RJ
110	0,43 ±0,25	II	M	Estágio C	PB
111	0,28 ±0,14	II	H	Estágio A	BA
112	5,18 ±1,55	II	H	Estágio A	CE
113	0,11 ±0,09	II	M	Indeterminada	MG
114	1,16 ±0,72	II	H	Estágio A	BA
115	0,011 ±0,008	II	M	Estágio A	PE
116	0,09 ±0,04	II/VI	M	Mista	PE
117	0,02 ±0,01	VI	H	Indeterminada	PE
118	0,02 ±0,01	II/VI	H	Mista	BA
119	0,006 ±0,002	VI	H	Estágio A	MG
120	0,50 ±0,03	II	M	Estágio B1	SE
121	0,11 ±0,014	VI	M	Indeterminada	BA
122	0,17 ±0,15	VI	M	Mista	AL
123	0,07 ±0,06	II	M	Mista	BA
124	2,42 ± 0,81	VI	M	Indeterminada	MS
125	0,19 ± 0,08	II/VI	M	Mista	PE
126	0,01 ± 0,01	II/VI	M	Estágio A	MG
127	0,17 ±0,15	II/VI	M	Estágio B1	BA
128	0,07 ±0,01	II	M	Digestiva	PB
129	4,77 ±2,05	II	M	Estágio A	AL
130	0,005 ±0,005	II/VI	M	Indeterminada	RS

Legenda: M-mulher, H-homem, Estágios (A, B1, B2, C e D) correspondem a forma clínica cardíaca

Anexo 5

Resultado do sequenciamento dos produtos de PCR contendo as sequências de DNA dos SNPs de citocinas humanas.

Amostra	Gene	SNP	Genótipo	Número de acesso do NCBI	Descrição	Query cover	Identidade	E- value
1	TNFA	rs1800629G/A	AG	KP339511.1	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF) gene, TNF-308 allele, partial sequence	100%	99.39%	2e-75
2	TNFA	rs1800629G/A	GG	KP339511.1	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF) gene, TNF-308 allele, partial sequence	100%	100%	9e-60
3	TNFA	rs1800629G/A	AA	KP339511.1	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF) gene, TNF-308 allele, partial sequence	100%	99.46%	5e-89
4	TNFA	rs1800629G/A	AG	KP339511.1	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF) gene, TNF-308 allele, partial sequence	100%	99.46%	9e-87
5	TNFA	rs1800629G/A	GG	KP339511.1	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF) gene, TNF-308 allele, partial sequence	100%	100%	3e-93
6	TNFA	rs1800629G/A	AA	KP339511.1	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF) gene, TNF-308 allele, partial sequence	100%	99.47%	2e-89
7	TNFA	rs1800629G/A	AG	KP339511.1	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF) gene, TNF-308 allele, partial sequence	100%	99.50%	3e-94
8	IL10	rs1800896G/A	AG	NG_012088.1	Homo sapiens interleukin 10 (IL10), RefSeqGene (LRG_1230) on chromosome 1	100%	98.80%	3e-81
9	IL10	rs1800896G/A	AA	NG_012088.1	Homo sapiens interleukin 10 (IL10), RefSeqGene (LRG_1230) on chromosome 1	100%	100%	4e-35
10	IL10	rs1800896G/A	GG	NG_012088.1	Homo sapiens interleukin 10 (IL10), RefSeqGene (LRG_1230) on chromosome 1	100%	99.14%	2e-50
11	IL10	rs1800896G/A	AG	NG_012088.1	Homo sapiens interleukin 10 (IL10), RefSeqGene (LRG_1230) on chromosome 1	100%	100%	3e-55
12	IL10	rs1800896G/A	AG	NG_012088.1	Homo sapiens interleukin 10 (IL10), RefSeqGene (LRG_1230) on chromosome 1	100%	97.74%	2e-56
13	IL18	rs2043055A/G/T	A-	NG_028143.1	Homo sapiens interleukin 18 (IL18), RefSeqGene on chromosome 11	100%	100%	2e-90
1	IL18	rs2043055A/G/T	GG	NG_028143.1	Homo sapiens interleukin 18 (IL18), RefSeqGene on chromosome 11	100%	99.32%	3e-66
2	IL18	rs2043055A/G/T	AA	NG_028143.1	Homo sapiens interleukin 18 (IL18), RefSeqGene on chromosome 11	100%	100%	5e-111
14	IL18	rs2043055A/G/T	GG	NG_028143.1	Homo sapiens interleukin 18 (IL18), RefSeqGene on chromosome 11	100%	99.54%	6e-103
15	IL18	rs2043055A/G/T	AA	NG_028143.1	Homo sapiens interleukin 18 (IL18), RefSeqGene on chromosome 11	100%	100%	1e-92
16	IL18	rs360719C/T	TT	NG_028143.1	Homo sapiens interleukin 18 (IL18), RefSeqGene on chromosome 11	100%	100%	7e-115
15	IL18	rs360719C/T	CC	NG_028143.1	Homo sapiens interleukin 18 (IL18), RefSeqGene on chromosome 11	100%	99.59%	4e-119
1	IL18	rs360719C/T	TT	NG_028143.1	Homo sapiens interleukin 18 (IL18), RefSeqGene on chromosome 11	100%	100%	5e-117

17	<i>IL18</i>	rs360719C/T	CC	NG_028143.1	Homo sapiens interleukin 18 (IL18), RefSeqGene on chromosome 11	100%	99.57%	5e-111
18	<i>IL18</i>	rs360719C/T	TT	NG_028143.1	Homo sapiens interleukin 18 (IL18), RefSeqGene on chromosome 11	100%	100%	2e-121
19	<i>IL18</i>	rs360719C/T	CC	NG_028143.1	Homo sapiens interleukin 18 (IL18), RefSeqGene on chromosome 11	100%	99.59%	1e-118
20	<i>TGFB1</i>	rs1800470 T/G/C	TC	LM651053.1	Homo sapiens partial TGFB1 gene for transforming growth factor, beta 1, allele TGFB1*p030, exon 1	100%	100%	2e-90
18	<i>TGFB1</i>	rs1800470 T/G/C	TT	LM651053.1	Homo sapiens partial TGFB1 gene for transforming growth factor, beta 1, allele TGFB1*p030, exon 1	100%	100%	5e-84
21	<i>TGFB1</i>	rs1800470 T/G/C	T-	LM651053.1	Homo sapiens partial TGFB1 gene for transforming growth factor, beta 1, allele TGFB1*p030, exon 1	100%	100%	6e-89
22	<i>TGFB1</i>	rs1800470 T/G/C	T-	LM651053.1	Homo sapiens partial TGFB1 gene for transforming growth factor, beta 1, allele TGFB1*p030, exon 1	100%	100%	6e-89
7	<i>MIF</i>	rs755622G/C	CC	NG_012099.1	Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (MIF), RefSeqGene on chromosome 22	100%	100%	9e-114
21	<i>MIF</i>	rs755622G/C	GG	NG_012099.1	Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (MIF), RefSeqGene on chromosome 22	100%	99.57%	2e-110
23	<i>MIF</i>	rs755622G/C	C-	NG_012099.1	Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (MIF), RefSeqGene on chromosome 22	100%	100%	1e-104
24	<i>MIF</i>	rs755622G/C	GG	NG_012099.1	Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (MIF), RefSeqGene on chromosome 22	100%	99.54%	6e-103
22	<i>MIF</i>	rs755622G/C	CC	NG_012099.1	Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (MIF), RefSeqGene on chromosome 22	100%	100%	1e-111
4	<i>MIF</i>	rs755622G/C	GG	NG_012099.1	Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (MIF), RefSeqGene on chromosome 22	100%	99.57%	1e-112
4	<i>IL1RN</i>	rs315952T/C/A	T-	NG_021240.1	Homo sapiens interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN), RefSeqGene (LRG_188) on chromosome 2	100%	100%	1e-92
14	<i>IL1RN</i>	rs315952T/C/A	T-	NG_021240.1	Homo sapiens interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN), RefSeqGene (LRG_188) on chromosome 2	99%	100%	4e-99
25	<i>IL1RN</i>	rs315952T/C/A	TT	NG_021240.1	Homo sapiens interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN), RefSeqGene (LRG_188) on chromosome 2	100%	100%	1e-79
7	<i>IL17A</i>	rs2275913G/A	GG	NG_033021.1	Homo sapiens interleukin 17A (IL17A), RefSeqGene (LRG_1223) on chromosome 6	100%	98.31%	4e-79

8	IL17A	rs2275913G/A	GG	NG_033021.1	Homo sapiens interleukin 17A (IL17A), RefSeqGene (LRG_1223) on chromosome 6	100%	100%	8e-88
26	IL17A	rs2275913G/A	GG	NG_033021.1	Homo sapiens interleukin 17A (IL17A), RefSeqGene (LRG_1223) on chromosome 6	100%	100%	2e-89
13	IL17F	rs763780T/C	T-	NG_031869.1	Homo sapiens interleukin 17F (IL17F), RefSeqGene (LRG_356) on chromosome 6	100%	100%	8e-108
18	IL17F	rs763780T/C	T-	NG_031869.1	Homo sapiens interleukin 17F (IL17F), RefSeqGene (LRG_356) on chromosome 6	100%	100%	2e-115
5	IL17F	rs763780T/C	T-	NG_031869.1	Homo sapiens interleukin 17F (IL17F), RefSeqGene (LRG_356) on chromosome 6	100%	100%	4e-112
27	IL17F	rs763780T/C	T-	NG_031869.1	Homo sapiens interleukin 17F (IL17F), RefSeqGene (LRG_356) on chromosome 6	100%	100%	5e-111
28	IL17F	rs763780T/C	T-	NG_031869.1	Homo sapiens interleukin 17F (IL17F), RefSeqGene (LRG_356) on chromosome 6	100%	100%	9e-114
23	IL17F	rs763780T/C	T-	NG_031869.1	Homo sapiens interleukin 17F (IL17F), RefSeqGene (LRG_356) on chromosome 6	100%	100%	2e-121
13	IL1B	rs16944A/G	-G	LC333977.1	Homo sapiens IL1B gene, interleukin 1 beta -511 promoter, partial sequence	100%	100%	1e-44
26	IL1B	rs16944A/G	A-	LC333977.1	Homo sapiens IL1B gene, interleukin 1 beta -511 promoter, partial sequence	100%	99.03%	5e-42
1	IL1B	rs16944A/G	-G	LC333977.1	Homo sapiens IL1B gene, interleukin 1 beta -511 promoter, partial sequence	100%	100%	3e-44
16	IL1B	rs16944A/G	A-	LC333977.1	Homo sapiens IL1B gene, interleukin 1 beta -511 promoter, partial sequence	100%	100%	1e-43
19	IL1B	rs16944A/G	-G	LC333977.1	Homo sapiens IL1B gene, interleukin 1 beta -511 promoter, partial sequence	100%	100%	3e-44
7	IL1B	rs16944A/G	AA	NG_008851.1	Homo sapiens interleukin 1 beta (IL1B), RefSeqGene on chromosome 2	100%	99%	2e-40