



**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Medicina**

**Pós-Graduação em Ciências Médicas**

**Laboratório Interdisciplinar de Biociências**

**Estudo integrativo da patogênese da doença de Chagas**

**Aluna: Marcelle Araujo Ribeiro**

**Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Nadjar Nitz**

**Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Mariana Hecht**

**Brasília – DF**

**2021**

**Marcelle Araujo Ribeiro**

**Estudo integrativo da patogênese da doença de Chagas**

**Tese apresentada ao Programa de  
Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da  
Universidade de Brasília, como requisito  
para obtenção do título de Doutora.**

**Brasília – DF**

**2021**

**O presente trabalho foi realizado no Laboratório Interdisciplinar de Biociências, Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.**

**Financiamento: CAPES**

**“Qualquer sonho pode se tornar realidade se você tiver disciplina e  
trabalho duro”**

**Serena Willians**

## DEDICATÓRIA

**A minha querida avó Maria da Graça (*in memoriam*), com meu profundo amor por tudo que fez por mim ao longo da vida. Amarei-te eternamente!**

## **AGRADECIMENTO**

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora do Santo Cinto por me ampararem nos momentos difíceis, me darem força interior para superar as dificuldades, mostrarem os caminhos nas horas incertas e me suprirem em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais, João Domingos Ribeiro e Edilene Pinheiro Araujo, pelo amor incondicional, por sempre acreditarem em minha capacidade, e por toda dedicação em especial na minha formação. Obrigada por serem meus maiores incentivadores.

Aos meus padrinhos, Marcelo Araujo e Eliane Araujo, por serem meus verdadeiros protetores, obrigada por todo carinho, amparo e conselhos.

Aos meus queridos irmãos, Luciano Ribeiro, Mariana Ribeiro, Mayara Ribeiro, Beatriz Araujo, Luiz Phelipe Araujo e Luiza Araujo, por serem os meus melhores amigos, desde sempre e para sempre, obrigada por todos os momentos da vida, por toda forma de amor e confiança depositados em mim.

Aos meus sobrinhos, Luanna Ribeiro, João Eduardo Ribeiro e Lucas Ribeiro, que são os motivadores da minha maior e melhor forma de amor.

Ao meu companheiro de todas as horas, Luis Filipe, o qual eu escolhi para compartilhar os melhores e os piores momentos da vida. Obrigada por todo companheirismo, compreensão e amor.

Aos amores da minha vida (meus filhos), Jorge e Maria, por me ensinarem tanto sobre a vida mesmo sendo tão pequenos. Obrigada por serem minha fonte de inspiração e me motivarem cada dia a ser uma pessoa melhor.

À minha família, Araujo Ribeiro, a qual amo demais, por todo amparo e carinho, para realização dos meus sonhos. Sem vocês a vida não teria graça!

As minhas orientadoras, Nadjar Nitz e Mariana Hecht, por acreditarem em mim e me mostrarem o caminho da ciência. Tenho muito orgulho de citá-las como uma das responsáveis pela minha formação profissional.

Aos professores Luciana Hagstrom, Juliana Lott, Elza Noronha e Bruno Dallago, que se prontificaram a me auxiliar em todos os momentos necessários.

As queridas Thaís Minuzzi, Barbara Lima, Hilda Benevides e Ana de Cássia, por todo apoio na execução do trabalho.

A toda equipe do núcleo técnico operacional da DASA por todo apoio e palavras de incentivo. Em especial a equipe da Biologia Molecular (Luciana Faro, Barbara Thainara, Jaqueline Osiro, Naomi Souza, Lucas Barbosa e Nayra Suellen), que foram meu ponto de apoio nos momentos em que tive que me ausentar, a conclusão desse trabalho teria sido mais difícil sem vocês.

Ao Jamerson Raposo por todo apoio e compreensão. As queridíssimas: Dona Edna, Silvana e Mariana Ramos, com quem tenho o privilegio de conviver e foram grandes incentivadoras.

As minhas amigas Gabrieli Mendes, Katyucha Samanta, Ana Flavia Silva, Keila Leoncio, que são meus exemplos como supervisoras e profissionais.

Aos meus amigos, Tamires Vital, Aline Silva, Bruna Caroline, Thaís Milene, Ester Rose e Guilherme (Búzios), que deixaram o caminho até aqui mais leve, com momentos de aprendizado e descontração. Obrigada *MANATEALOUCA*s por todos os “cafés com ciência”, todos os dias/noites de trabalho e companherismo.

## Resumo

A doença de Chagas (DC) é uma doença tropical negligenciada transmitida por vetores causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A patologia é endêmica nas Américas, mas devido às migrações, a doença adquiriu importância global. A maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática, entretanto, cerca de um terço dos pacientes progride para a fase crônica sintomática, que inclui sintomas digestivos e/ou cardíacos. Apesar do conhecimento atual, os mecanismos envolvidos na patogênese da DC ainda não estão totalmente elucidados. A hipótese integrativa permite avaliar como múltiplos mecanismos contribuem para a gênese dos sintomas presentes na DC. Assim, o objetivo do nosso estudo foi avaliar de forma integrativa a importância de fatores relacionados ao hospedeiro e o parasita em pacientes com diferentes sintomas da DC crônica. O estudo foi realizado com 176 pacientes, agrupados segundo o perfil clínico. A carga parasitária, os eventos de integração kDNA e a quantidade de LINE-1 foram avaliados por qPCR. A produção de anticorpos específicos contra o parasita e contra autoantígenos, cardíacos e intestinais, foram avaliadas por ELISA. A dosagem de citocinas foi realizada por citometria de fluxo. Nossos resultados confirmaram que a carga parasitária e o tratamento com o fármaco tripanocida durante a fase crônica não influenciam o perfil clínico dos pacientes. Da mesma forma, a análise de citocinas demonstrou a predominância do perfil pró-inflamatório nos grupos estudados. Ademais, todos os pacientes produziram anticorpos contra o parasita, e contra autoantígenos cardíacos e intestinais, independentemente dos sintomas. Tais achados sugerem que nenhum desses fatores influencia significativamente a patogênese da DC quando analisados de forma independente. No entanto, mediante as análises de correlação, foi possível detectar diferentes padrões de citocinas nos pacientes avaliados. Os indivíduos assintomáticos apresentaram uma produção mais equilibrada de citocinas pró e anti-inflamatórias. Além disso, o aumento dos níveis de IL-10 e IL-4 foram associados ao aumento da produção de anticorpos contra o *T. cruzi* e contra antígenos próprios, e o perfil de produção de anticorpos autoreativos diferiu entre os pacientes sintomáticos. Finalmente, os eventos de integração do kDNA não se correlacionaram com a gravidade dos sintomas, sugerindo que o sítio de integração deve ser o fator determinante. Dessa forma, nossos resultados fortalecem a hipótese de que processos patogênicos múltiplos influenciam o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da DC, apoiando o uso de abordagens integrativas para criar uma assinatura clínica para pacientes crônicos com DC.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, fisiopatologia, análise de correlação, integração do kDNA, autoimunidade, análise multiparmétrica.



## Abstract

Chagas disease (CD) is a vector-borne neglected tropical disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. It is endemic in the Americas, but it has spread all over the world due to migrations. CD presents different clinical forms; following infection, while most individuals remain asymptomatic, about a third will progress to symptomatic chronic phase, which includes digestive and/or cardiac symptoms. Despite current knowledge, the mechanisms underlying the symptomatic forms of CD's are not fully elucidated. The integrative hypothesis proposes that multiple mechanisms contribute to the genesis of chronic, symptomatic CD. In the present study, we analyzed different host- and parasite-related factors to develop an integrative analysis to how they relate to the different manifestations of chronic CD. The study was conducted with 176 patients, grouped according to clinical profile. Parasite load, kDNA integration, and LINE-1 quantification were assessed by qPCR. Antibody reactivity against parasite-, cardiac- and intestinal-specific antigens were evaluated by ELISA. Cytokine production was measured by flow cytometry. Our data confirms that parasitic load and trypanocide treatment received during the chronic phase did not influence the patients' clinical profile. Similarly, cytokine analysis demonstrated a pro-inflammatory profile in all CD patients. All patients produced antibodies against the parasite, as well as cardiac and intestinal self-antigens, regardless of the symptoms. Such findings suggest that none of these factors significantly influence CD pathogenesis when taken independently. Nevertheless, using correlation analyses, we detected different cytokine patterns in the different clinical forms of CD, the asymptomatic patients presenting a more balanced production of pro- and anti-inflammatory cytokines. Furthermore, increased IL-10 and IL-4 levels were associated with the production of antibodies against parasite and host antigens, the profile of autoreactive antibody production differs among symptomatic patients. Finally, kDNA integration events failed to correlate with symptom severity, possibly suggesting that the site of integration may be a determining factor in this sense. Taken together, our results strengthen the notion that multiple pathogenic processes influence CD clinical forms, supporting the use of integrative approaches to create a clinical signature for chronic CD patients.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, pathophysiology, correlation analysis, kDNA integration, autoimmunity, multiparametric analysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expansão mundial da doença de Chagas.....	14
Figura 2. Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi.....	18
Figura 3. Esquema de um minicírculo de kDNA e os blocos de sequências conservadas (CSBs).....	20
Figura 4. Curso natural da infecção por Trypanosoma cruzi.....	23
Figura 5. Resposta imunológica ao Trypanosoma cruzi.....	27
Figura 6. Teoria integrativa da patogênese da doença de Chagas.....	34
Figura 7. Curvas padrão de qPCR para nDNA e Kdna.....	40
Figura 8. Determinação da carga parasitária em pacientes com doença de Chagas crônica.....	47
Figura 9. Determinação da razão kDNA/nDNA em pools de amastigotas de Trypanosoma cruzi.....	48
Figura 10. Quantificação de integrações de kDNA e elementos LINE-1 no genoma de pacientes com doença de Chagas crônica.....	49
Figura 11. Quantificação das citocinas pró- e anti-inflamatórias produzidas por pacientes na fase crônica da doença de Chagas.....	51
Figura 12. Quantificação de anticorpos do tipo IgG em pacientes com doença de Chagas crônica.....	52
Figura 13. Correlação entre parâmetros quantitativos avaliados nos pacientes com diferentes apresentações clínicas da Doença de Chagas.....	54
Figura 14. Correlação entre parâmetros quantitativos avaliados nos pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas.....	56
Figura 15. Correlação entre parâmetros quantitativos avaliados nos pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas.....	58
Figura 16. Correlação entre parâmetros quantitativos avaliados nos pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas.....	60
Figura 17. Correlação entre parâmetros quantitativos estudados nos pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas.....	62
Figura 18. Visão integradora da patogênese da doença de chagas.....	72

## Sumário

I. INTRODUÇÃO.....	13
1. História da Doença de Chagas .....	13
2. Epidemiologia.....	13
3. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	16
4. DNA nuclear do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	19
5. DNA do Cinetoplasmo.....	19
6. Unidades de tipagem discreta .....	21
7. Manifestações clínicas.....	22
8. Diagnóstico e Tratamento.....	24
9. Ativação do sistema imunológico pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	25
10. Patogênese da doença de Chagas .....	28
9.1 Persistência do parasito.....	29
9.2 Autoimunidade .....	30
9.3 Mimetismo molecular .....	31
9.4 Ativação <i>Bystander</i> .....	32
9.5 Integração do kDNA.....	32
10. Retroelementos Line-1.....	33
11. Teoria integradora da patogênese da doença de Chagas.....	34
II. Justificativa.....	37
III. Objetivos.....	38
1. Geral.....	38
2. Específicos.....	38
IV. Metodologia .....	39
1. Grupo experimental .....	39
2. Extração de DNA .....	40
3. PCR quantitativa (qPCR) .....	41
4. Ensaio de Imunoabsorção Enzimático Indireto (ELISA).....	43
5. Dosagem de citocinas.....	45
6. Análise estatística.....	46
V. Resultados .....	47
1. Quantificação da carga parasitária e sua influência na evolução clínica da doença de Chagas crônica .....	47
2. Acúmulo de integrações de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma dos pacientes com doença de Chagas crônica .....	48

3.	Quantificação de retroelementos LINE-1 no genoma dos pacientes com doença de Chagas crônica .....	50
4.	Quantificação das citocinas produzidas por pacientes com diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas .....	51
5.	Avaliação de marcadores da resposta imunitária humoral ao <i>Trypanosoma cruzi</i> e a autoantígenos .....	52
6.	Análise de correlação.....	53
6.1.	Análise de correlação de fatores avaliados em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas .....	55
6.2.	Análise de correlação dos fatores analisados em pacientes com forma cardíaca da doença de Chagas .....	57
6.3.	Análise de correlação dos fatores analisados nos pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas .....	60
6.4.	Análise de correlação dos fatores estudados em pacientes com a forma mista da doença de Chagas .....	62
VI.	Discussão .....	64
1.	Persistência do parasito.....	65
2.	Integração do kDNA e mobilização de LINE-1 .....	66
3.	Resposta Imunitária.....	68
4.	Resposta Imunitária Humoral .....	71
5.	Visão integradora da patogênese da doença de Chagas .....	72
VII.	Conclusões.....	75
VIII.	Perspectivas .....	76
IX.	Referências .....	78

## I. INTRODUÇÃO

### 1. História da Doença de Chagas

Durante uma campanha antimalárica no norte de Minas Gerais, em 1908, o médico e pesquisador Carlos Chagas foi procurado por um trabalhador local que relatou a presença de um inseto hematófago grande que tinha hábitos noturnos e era comumente encontrado dentro de casas da região. Ao dissecar o inseto, Chagas descobriu a presença de grande quantidade de tripanossomas no intestino posterior, o qual ele nomeou de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem ao médico e bacteriologista Oswaldo Cruz, seu mentor. Chagas sabia que estava diante de um organismo potencialmente patogênico de uma doença infecciosa humana, mas ainda não sabia do que exatamente se tratava (KROPF E SÁ, 2009; LIDANI *et al*, 2019; STERVEDING, 2014).

A descoberta aconteceu em 1909, quando Carlos Chagas examinou uma menina de 2 anos, chamada Berenice, que apresentava febre, linfonodos inchados e aumento do baço e fígado. Além dos sintomas clínicos, foi identificada a presença do *T. cruzi* circulante no sangue periférico da menina. Chagas descreveu com riqueza de detalhes, o agente etiológico (*T. cruzi*), o vetor (barbeiro) e a fase aguda da doença, que ficou conhecida como doença de Chagas (DC) (KROPF E SÁ, 2009; LIDANI, 2019; STERVEDING, 2014).

### 2. Epidemiologia

A DC foi descrita inicialmente como um problema de saúde em países da América do Sul, principalmente no Brasil e na Argentina. Entretanto nas últimas décadas, o padrão epidemiológico da doença mudou principalmente devido à mobilidade populacional, urbanização e movimentos migratórios (Figura 1). Conseqüentemente, casos frequentes da DC estão sendo reportados em países da Europa, América do Norte e até na Ásia. A Organização Mundial de Saúde estima que existam de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas no mundo, número que pode ser muito maior devido à alta taxa de pessoas não diagnosticadas ou não tratadas. Ademais, cerca de 75 milhões de pessoas vivem em áreas sob o risco de adquirir a infecção (MARTINEZ *et al*, 2019; OMS, 2020).

## Expansão mundial da doença de Chagas (casos estimados)



**Figura 1. Expansão mundial da doença de Chagas** (Adaptado de: Martinez *et al*, 2019)

A DC é considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas da América Latina, afetando principalmente comunidades em vulnerabilidade social que recebem pouca atenção governamental. No Brasil, durante a década de 1950, a DC foi considerada uma doença endêmica rural e seu principal modo de transmissão era por vetores. Entretanto, a industrialização brasileira resultou em um grande processo de urbanização com grandes movimentos migratórios, levando a DC aos centros urbanos e fazendo que esta passasse a representar um importante problema econômico brasileiro e de saúde da América Latina. Iniciativas da OMS em parceria com governos latino-americanos ajudaram a reduzir significativamente o número de casos agudos da doença. Com medidas preventivas para evitar a presença de triatomíneos nas residências, observou-se uma diminuição acentuada dos vetores em ambientes domiciliares. A isso somou-se as ações de triagem de doadores de sangue, o que também contribuiu para uma drástica redução no número de novos casos da DC. Em 2006, o Brasil recebeu o certificado internacional pela interrupção da transmissão da DC por transfusão de sangue

e interrupção da transmissão vetorial causada pelo principal vetor, o *Triatoma infestans* (RASSI *et al*, 2009; MONGE-MAILLO & LÓPEZ-VÉLEZ, 2017; VIZZONI, 2018).

Entretanto, o desequilíbrio causado pelas mudanças ambientais e da biodiversidade associada à presença de atividade humana próxima a ciclos silvestres resultou em um aumento de casos relacionados à via de transmissão por meio de alimentos ou bebidas contaminados pelo *T. cruzi*. No Brasil, mais especificamente na região amazônica, a transmissão oral apresenta grande importância como uma das principais formas de transmissão da DC (SANGENIS *et al*, 2016). Os principais alimentos e bebidas associados à infecção aguda chagásica são caldo-de-cana, açaí, água contaminada, palmito e suco de goiaba (SILVA-DOS-SANTOS *et al*, 2017; COURA, 2014; PACHECO *et al*, 2021).

A situação da DC em outros países da América Latina também é alarmante. A doença é considerada endêmica no México, entretanto, segundo a OMS, há uma alta taxa de subnotificação, sendo o país com mais números de novos casos anuais causados por transmissão congênita e o segundo com mais casos pela via de transmissão vetorial. A estimativa é que existam 1,1 milhão de infectados pelo *T. cruzi* no território mexicano. A Guatemala, El Salvador e Honduras são responsáveis por 85% das notificações da DC, devido à migração de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, sendo a transfusão sanguínea a principal via de transmissão nesses países (CONNERS *et al*, 2017; ROJO-MEDINA *et al*, 2018).

Além disso, a DC pode ser encontrada em países não endêmicos. Nos EUA, estima-se que existam 3 milhões de pessoas com a doença de Chagas crônica (DCC) originárias de países endêmicos. Um pequeno número de infecções adquiridas no próprio país foi relatado, embora o ciclo selvagem tenha sido descrito há algum tempo no sul dos EUA, em especial no Texas, com alguns casos agudos autóctones. Entre os anos de 2007 e 2013 nos EUA, foram identificados 1.752 casos de doadores de sangue positivos na sorologia para DC, dentre os quais mais de 100 eram provenientes do Texas (MONTGOMERY *et al*, 2016; BERN & MONTGOMERY, 2009).

Na Europa, estima-se que existam 59 a 108 mil casos de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*. Porém, apenas uma pequena proporção foi diagnosticada. Espanha e Itália lideram o ranking de infecções, com a maioria dos casos documentados referentes a casos crônicos, apesar de alguns indivíduos terem apresentado a fase aguda da infecção. Até os anos 1980, já havia sido notificado na Europa Ocidental casos da DC transmitidos pela transfusão sanguínea, transmissão congênita e acidentes de trabalho. Devido a um aumento acentuado de migrantes, principalmente para a Espanha, nos anos 1990, a legislação europeia foi alterada em relação à triagem de doadores de sangue e tecido devido ao risco de transmissão da DC (ANDRADE *et al*, 2014; ALBAJAR-VIÑAS & JANNIN, 2011).

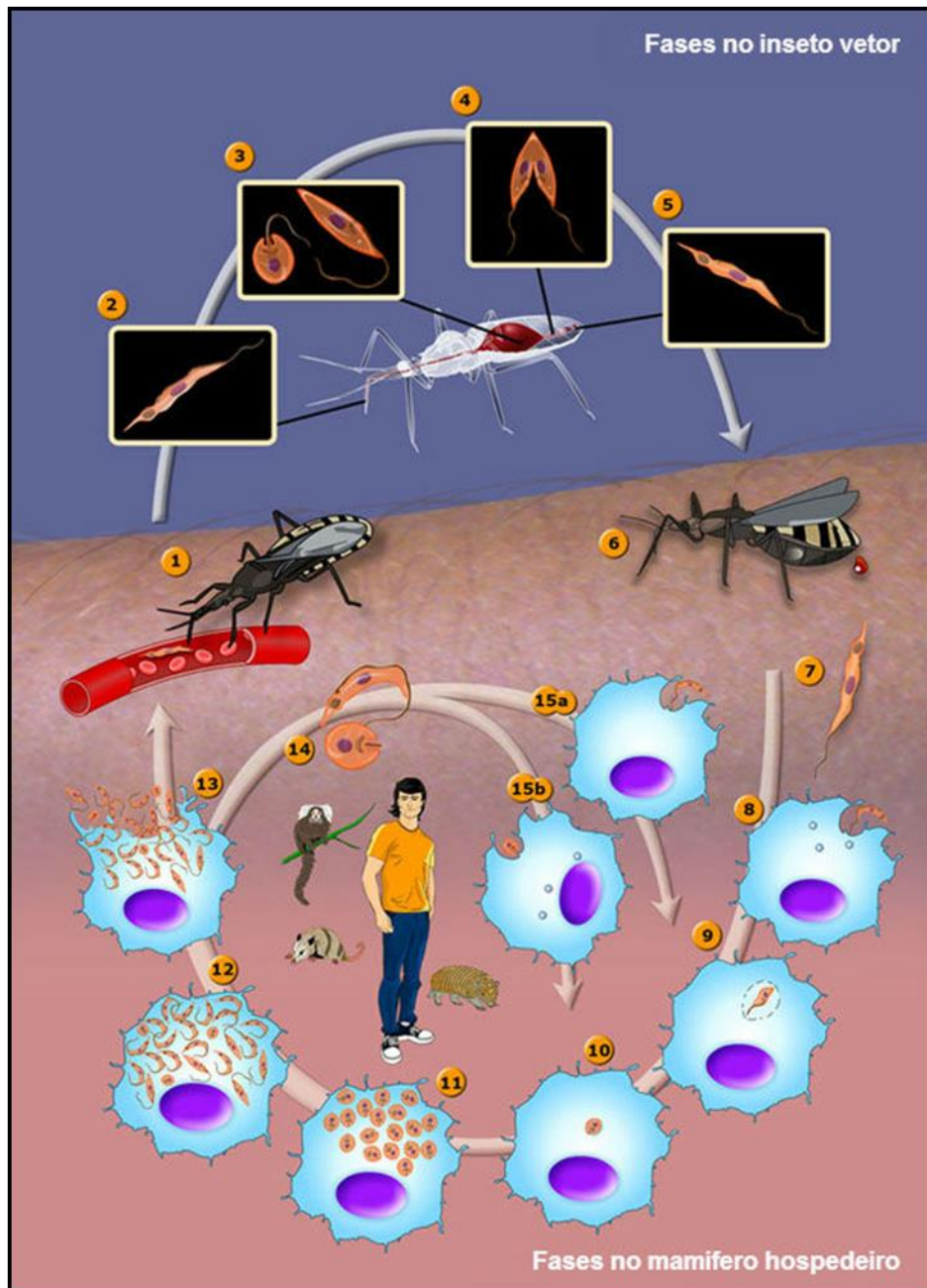
### **3. *Trypanosoma cruzi***

O *T. cruzi*, agente causador da DC, é um protozoário hemoflagelado, pertence ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida família Trypanosomatidae. É um parasito intracelular obrigatório que pode infectar a maioria das células nucleadas, apresentando preferência por linhagens das células musculares e macrófagos. O parasito exibe um ciclo de vida heteroxênico (Figura 2), alternando formas intracelulares e extracelulares entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (RASSI *et al*, 2010).

O inseto da família Reduviidae, subfamília Triatominae, ao fazer o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, ingere formas tripomastigotas sanguíneas que se diferenciam em formas epimastigotas no intestino médio. O flagelado multiplica-se sob forma epimastigota, que migram para o intestino posterior do vetor, aderem à mucosa, sofrem um processo de diferenciação e tornam-se tripomastigotas metacíclicos. Durante repasto sanguíneo, o vetor libera em suas fezes as formas metacíclicas infectantes que penetram a pele lesionada ou mucosa do hospedeiro vertebrado. Nos mamíferos, uma vez que tenham invadido as células hospedeiras, os parasitos escapam do vacúolo parasitóforo para o citosol, diferenciam-se em amastigotas ovoides e se dividem por fissão binária. Após vários ciclos de reprodução assexuada (aproximadamente 4-7 dias), as amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas



móveis flageladas e não replicantes, que promovem a lise celular, e os parasitos são liberados para o meio extracelular e invadem outras células, espalhando-se sistematicamente pelo sangue e fluidos dos tecidos. O ciclo é completado quando o mamífero infectado é picado por outro triatomíneo, ingerindo novamente formas tripomastigotas circulantes, que chegam ao intestino do inseto (MACHADO *et al*, 2012; RASSI *et al*, 2010; TEIXEIRA *et al*, 2012; TAYLOR *et al*, 2020).



**Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** (1) O vetor ingere formas tripomastigotas do *T.cruzi* presentes no sangue periférico de mamíferos infectados. (2) Tripomastigotas (3) No intestino médio do inseto, se diferenciam em epimastigotas e algumas esferomastigotas. (4) Epimastigotas se multiplicam. (5) No intestino posterior se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas. (6) O inseto vetor libera em suas fezes formas tripomastigotas, perto do local da picada. (7) Forma tripomastigota metacíclica. (8) Infectam macrófagos. (9) Tripomastigotas se diferenciam em amastigotas. (10) Amastigotas evadem o vacúolo parasitóforo. (11) Multiplicação das amastigotas no citoplasma. (12) Amastigotas se diferenciam em tripomastigotas. (13) Tripomastigotas rompem as células e são liberadas no meio extracelular. (14) Formas amastigotas e tripomastigotas. (15) A. Tripomastigotas e B. Amastigotas, infectam macrófagos (Adaptado de Texeira *et al*, 2012).

#### 4. DNA nuclear do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* apresenta DNA genômico (nDNA) organizado em um núcleo envolto por membranas contendo poros, típica de eucariotos. A cromatina dos tripanossomas se difere de outros eucariotos superiores e até mesmo de outros protistas em relação a sua organização. Os cromossomos não se condensam durante a divisão celular, apesar da existência de histonas, proteínas essas que são fosforiladas e que se ligam fracamente à cromatina. Além disso, a cromatina do *T. cruzi* apresenta-se pouco compactada quando comparada à cromatina de mamíferos, o que a torna frágil tanto física como enzimaticamente (TEXEIRA *et al*, 2011).

O sequenciamento completo do genoma do *T. cruzi* foi representado pela cepa CL Brener, onde foi revelado que o tamanho do genoma diploide seja entre 106,4 e 110,7 Mb, e pelo menos 50% do genoma é composto por sequencias repetitivas, principalmente por grandes famílias de genes que codificam proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subtelo méricas. O parasito possui cerca de 22.570 proteínas dos quais aproximadamente 12.570 representam cópias alélicas (El SAYED *et al*, 2005)

#### 5. DNA do Cinetoplasmo

O *T. cruzi*, assim como todos cinetoplastídeos, possui uma mitocôndria única e grande que contém uma rede concatenada de DNA, denominada DNA do cinetoplasmo (kDNA). O kDNA representa de 15% a 30% do DNA celular total e é composto por dois tipos de moléculas circulares denominadas de minicírculos e maxicírculos, que se diferem em função e tamanho (TEIXEIRA *et al*, 2011; TOMASINI, 2018; GONÇALVES *et al*, 2018).

Os maxicírculos possuem cerca de 20.000 pb de tamanho e o número de cópias varia de 20 a 50. Podem ser considerados análogos ao DNA mitocondrial dos demais eucariotos, visto que codificam produtos gênicos típicos dessa organela como rRNAs, RNAs guias (gRNAs). A falta de alguns elementos chaves para a tradução, como códons de iniciação ou ORFs (*Open Reading frames*) ou fases abertas de leitura contínuas é resolvido através da editoração dos mRNAs realizada pelos gRNAs, que consiste na inserção ou



## 6. Unidades de tipagem discreta

O *T. cruzi* é caracterizado por uma grande variabilidade intraespecífica genética e fenotípica. A nomenclatura consensual reconhece seis unidades de tipagem discretas (DTU) que vão de TCI a TCVI, e uma sétima proposta que ainda está em debate, o Tcbat. Essa classificação é muito utilizada como referência em estudos epidemiológicos, entretanto não existe consenso sobre qual o melhor método para a identificação dos diferentes DTUs. Muitos autores acreditam que diversidade genética pode influenciar no curso da infecção bem como induzir respostas distintas nos indivíduos infectados, caracterizando diferentes formas clínicas da doença (REIS-CUNHA *et al*, 2018).

As relações evolutivas entre os DTUs e a evolução do *T. cruzi* continuam sendo amplamente estudadas. Vários estudos reconheceram a clonalidade, hibridação e trocas genéticas convencionais e não convencionais, além da extraordinária plasticidade do genoma do *T. cruzi*, como mecanismos de evolução. As relações evolutivas entre os DTUs ainda não foram totalmente elucidadas mas dois deles (TcV e TcVI) têm origem híbrida com TcII e TcIII. Além disso, existem apontamentos que TcIII e TcIV também teriam origem híbrida entre TcI e TcII, apesar de existir controversas (BRENIÈRE *et al*, 2016).

Correlações entre DTUs, distribuição geográfica, espécies hospedeiras e patogenicidade ainda são controversas. Na América Central a prevalência de infecções humanas são causadas por cepas TCI, enquanto infecções humanas por TcII, TcV e TcVI são mais comuns no cone sul da América do Sul, em países como Argentina, Chile, Paraguai, Bolívia e Brasil, e estão classicamente relacionados a casos graves da doença. Casos de infecções por TcVI já foram descritas também na Colômbia. Enquanto que TcIII e TcIV são comumente associados a ciclos silvestres, embora relatos tenham descrito a ocorrência na região amazônica, Colômbia e Venezuela. Apesar de diversos estudos tenham proposto essas e outras correlações, o estudo sobre os DTUs e sua prevalência ainda requer maiores esclarecimentos (BARNABÉ *et al*, 2011; ZINGALES *et al*, 2012; LIMA *et al*, 2014; MESSENGER *et al*, 2016; REIS-CUNHA *et al*, DARIO *et al*, 2016; 2018; RODRIGUES-DOS-SANTOS *et al*, 2018;)

## 7. Manifestações clínicas

A DC tem curso clássico de infecção (Figura 4) com uma fase aguda ou inicial, seguida da fase crônica que pode ser categorizada em indeterminada, digestiva, cardíaca e mista (manifestações cardiodigestivas). A fase aguda é geralmente assintomática e caracterizada por alta parasitemia e subsequente produção de anticorpos. Entretanto, alguns indivíduos infectados podem apresentar manifestações clínicas durante a fase aguda, sendo as mais recorrentes, sinais e sintomas virais inespecíficos, incluindo febre, mal-estar e linfadenopatia. Por esse motivo, muitos pacientes não são diagnosticados nesta fase da DC, pois não procuram atendimento médico. Uma pequena parte dos pacientes, menos de 10%, apresenta sinais e sintomas mais característicos da infecção pelo *T. cruzi*, como nódulo inflamatório no local da inoculação (chagoma de inoculação), sinal de Romaña (inchaço periorbital em tecidos moles após o parasito penetrar a conjuntiva), arritmias e anormalidades transitórias no eletrocardiograma (ECG), e, em formas mais graves, podem apresentar miocardite e meningoencefalite (MALIK *et al*, 2015; NUNES *et al*, 2013; MACHADO *et al*, 2012).

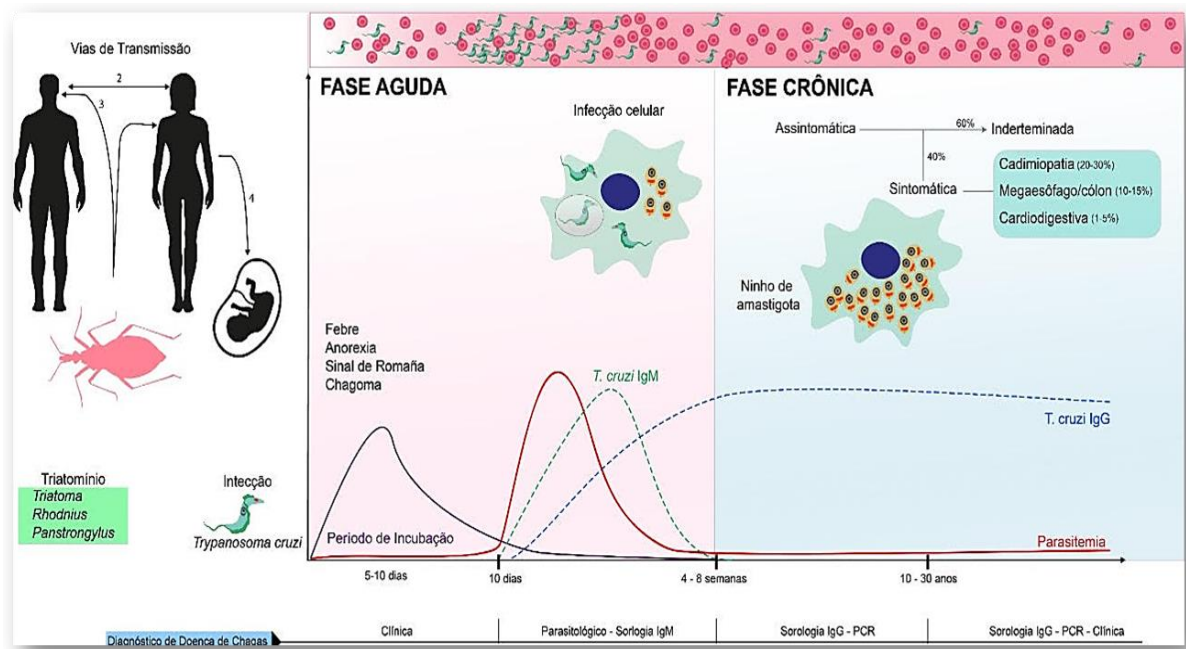
A infecção segue o curso crônico com escassez de parasitos no sangue periférico e nos tecidos. A maioria dos pacientes evolui para uma fase crônica indeterminada com ausência de sintomas e presença de anticorpos específicos para o *T. cruzi*. Cerca de um terço dos indivíduos infectados progride para uma fase crônica determinada, durante a qual surgem sinais e sintomas, podendo eles serem cardíacos, digestivos ou, ainda, cardiodigestivos (ROSA *et al*, 2018; ÁLVAREZ *et al*, 2014; TEIXEIRA *et al*, 2006).

O envolvimento gastrointestinal pode variar entre 5 e 35% dos pacientes, sendo esta taxa mais baixa em países não endêmicos. As manifestações gastrointestinais crônicas da DC são descritas nas glândulas salivares, esôfago, esfíncter inferior do esôfago, estômago, intestino delgado, cólon, vesícula biliar e árvore biliar, e são principalmente o resultado de lesões no sistema nervoso entérico, podendo ser desenvolvida dilatação do trato gastrointestinal (megacólon, mesaesôfago, megaestômago, megaduodeno, megajejuno) e distúrbios motores gastrointestinais, como acalasia do cárdio,

distúrbios de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e cólon alterados e distúrbios motores das vesícula biliar (MATSUDA *et al*, 2009; SÁNCHEZ-MONTALVÁ *et al*, 2016).

Aproximadamente 30% dos pacientes com a DC na fase indeterminada progridem para a forma cardíaca, que é caracterizada por um remodelamento cardíaco que inclui fibrose, uma resposta inflamatória robusta e alterações estruturais/funcionais, e estão associadas a arritmias, insuficiência cardíaca, morte súbita e a alta taxa de morbidade e mortalidade. Os distúrbios da condução atrioventricular e intraventricular são comuns na cardiopatia chagásica e geralmente estão relacionados à disfunção sistólica ventricular e arritmias ventriculares. O bloqueio do ramo direito é a anormalidade eletrocardiográfica mais comum observada na DC e está tipicamente associada ao hemibloqueio anterior esquerdo e batimentos prematuros ventriculares. O bloqueio do ramo esquerdo é menos comum e está associado a um pior prognóstico (LEDOUX *et al*, 2019; BARBOSA *et al*, 2015; BRITO & RIBEIRO, 2018).

A fase crônica pode ser ainda classificada em estágios de envolvimento cardíaco conforme recomendações internacionais adaptadas à etiologia chagásica em estágios A, B, C e D. No estágio A, estão os pacientes sem sintomas presentes ou progressos de insuficiência cardíaca (IC) e com eletrocardiograma (ECG) e radiografia de tórax normais. No estágio B, os pacientes com cardiopatia estrutural que nunca tiveram sinais ou sintomas de IC. Esse estágio se divide em B1, pacientes com alterações no ECG, mas sem disfunção ventricular, e o estágio B2, onde estão os pacientes que já apresentam disfunção ventricular. No estágio C, estão os pacientes com sintomas prévios ou atuais de IC e que possuem disfunção ventricular. No estágio D, os pacientes encontram-se com sintomas de IC em repouso, refratários ao tratamento clínico maximizado e necessitando de intervenções especializadas e intensivas (ANDRADE *et al*, 2011).



**Figura 4: Curso natural da infecção por *Trypanosoma cruzi*.** Transmissão do *T. cruzi* por (1) via vetorial, (2) transplante de órgãos, (3) via oral ou (4) via congênita. O período de incubação dura de 5 a 10 dias seguido pela fase aguda da doença, que perdura de 4 a 8 semanas, e tem como característica formas tripomastigotas circulantes com alta parasitemia e presença de anticorpos IgM. A maioria dos pacientes têm sintomas inespecíficos como febre e anorexia, ou são assintomáticos, podendo desenvolver o chagoma de inoculação ou sinal de Romãia. Na fase crônica a parasitemia cai abaixo de níveis detectáveis microscopicamente, com a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* IgG. Nessa fase a maioria das pessoas infectadas entre em uma forma assintomática conhecida como indeterminada e nunca desenvolvem sintomas relacionados a doença de Chagas. Cerca de 30-40% das pessoas cronicamente infectadas apresentarão algumas manifestações clínicas, incluindo cardíacas, digestivas ou cardiodigestivas (Adpatada de: LIDANI *et al*, 2017).

## 8. Diagnóstico e Tratamento

Para o diagnóstico da DC, é necessária a avaliação clínica do paciente e antecedentes epidemiológicos, levando em consideração a fase da infecção para a tomada de decisão e escolha do teste. Durante a fase aguda, devido a parasitemia elevada, a microscopia convencional para visualização do parasito circulante em sangue periférico continua sendo o padrão ouro para diagnóstico da DC. Entretanto, durante a fase crônica, quando a parasitemia é baixa, podem ser realizados testes de pesquisa indireta do parasito como xenodiagnóstico e hemocultura; porém esses métodos apresentam muitas limitações quanto ao tempo de execução e baixa sensibilidade. Assim, os



testes para pesquisa de anticorpos específicos contra o *T. cruzi* são preconizados rotineiramente no diagnóstico da DC crônica e em triagens de banco de sangue. As principais técnicas empregadas são imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático e hemaglutinação indireta. A OMS aconselha o uso de pelo menos dois ensaios, baseados em fundamentos distintos, para um diagnóstico confiável. O diagnóstico molecular pode ser feito pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e utilizado de forma complementar ao diagnóstico sorológico inconclusivo, devido à alta sensibilidade e especificidade quando mantidos os padrões de qualidade dos reagentes (BALOUZ *et al*, 2017; ABRAS *et al* 2016; SANTOS *et al*, 2016).

Apesar da DC ter sido descrita há mais de um século, seu tratamento ainda é muito limitado, com apenas dois medicamentos disponíveis, o benznidazol e o nifurtimox, fármacos que foram desenvolvidos há mais de 40 anos (DIAS *et al*, 2019). Ambos os medicamentos produzem efeitos colaterais significativos, baixa eficácia para fase crônica da infecção e tolerabilidade extremamente baixa. O fármaco mais adotado no Brasil é o benznidazol devido à sua menor incidência de efeitos colaterais e menor duração de terapia. O principal efeito colateral é a dermatite alérgica, que leva muitos pacientes a interrupção do tratamento. O consenso brasileiro para o uso do medicamento refere-se à fase aguda da infecção, quando a redução da carga parasitária pode representar uma melhor evolução clínica do indivíduo. Entretanto, a eficácia do benznidazol no tratamento de pacientes na fase crônica, com a interrupção da progressão da doença, não foi demonstrada, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, mais seguros e eficazes para o tratamento da DC (MOLINA *et al.*, 2014; LAURIA-PIRES *et al.*, 2000; MUÑOZ-SARAVIA *et al.*, 2011; MORILLO *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al*, 2017).

## **9. Ativação do sistema imunológico pelo *Trypanosoma cruzi***

A resposta imunitária do hospedeiro vertebrado ao *T. cruzi* depende de respostas imunes inata e adaptativa (figura 5), desencadeadas no início da infecção. Macrófagos, células dendríticas, células natural killer (NK) e linfócitos B e T atuam em conjunto para controlar a replicação do parasito, porém não são capazes de erradicar por completo o patógeno (JUNQUEIRA *et al*, 2010).

Os fagócitos, em especial macrófagos, neutrófilos e células dendríticas são a primeira linha de defesa contra os patógenos após atravessarem a barreira epitelial. Essas células expressam receptores de membrana que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), dentre esses, os mais relevantes no reconhecimento do *T. cruzi* são os Toll-like (TLRs). Uma das principais formas que os macrófagos contribuem para a formação de uma resposta imunitária ao parasito é a secreção de citocinas, em particular IL-12, que sinalizam a resposta imunitária em direção a perfis pró e anti-inflamatórios. Além disso, a síntese de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos intensifica a produção do óxido nítrico com atividade microbicida. Ademais, a secreção de IL-12 também ativa as células NK. Contudo, essa ação inflamatória causa danos aos tecidos do hospedeiro sendo necessário um mecanismo de controle da resposta imunitária com citocinas anti-inflamatórias ou reguladoras, como IL-4 e IL-10 (VIRGILIO *et al*, 2014; FURLAN *et al*, 2018).

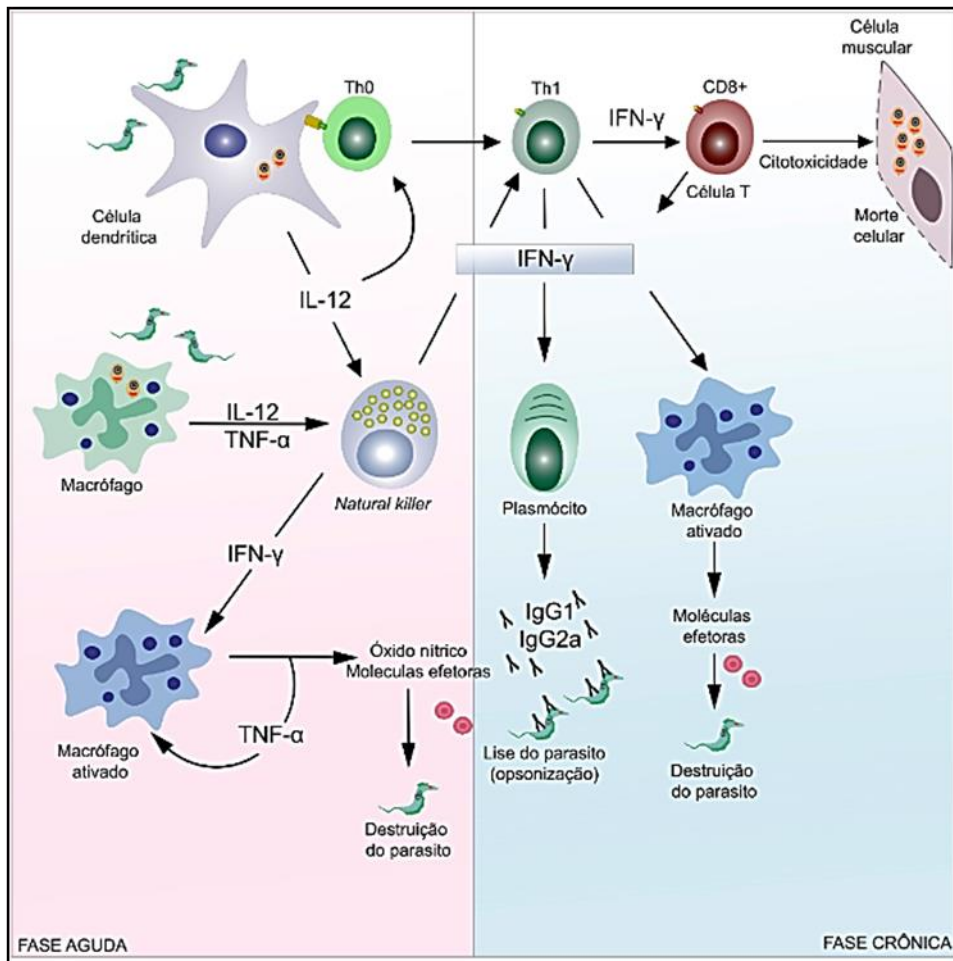
As células dendríticas também são ativadas pela presença de PAMPs e desempenham um elo entre a resposta imunitária inata e a adaptativa. A IL-12 produzida por essas células atua na diferenciação e expansão clonal de linfócitos T para um perfil Th1, assim como TCD8+, e de linfócitos B. Sabe-se que o *T. cruzi* modula a função das células dendríticas através de fatores secretados pelo parasito que induzem um perfil tolerogênico com a diminuição de IL-12 e TNF- $\alpha$  e alteração na sua capacidade de apresentar antígenos (VAN OVERTVELT *et al*, 1999).

No início da infecção, as células NK desempenham um papel central na resposta imunitária inata, e um dos principais mecanismos efetores é a citotoxicidade direcionada para eliminação de células infectadas ou danificadas. São responsáveis por produzirem IFN- $\gamma$ , que direciona macrófagos a produzirem óxido nítrico, e influenciam na diferenciação de linfócitos T para um perfil Th1. Todas as funções citotóxicas e modulatórias das células NKs são reguladas positivamente por citocinas, principalmente IL-12, IL-15, IL-18, que aumentam a capacidade citotóxica e a produção de IFN- $\gamma$  (ACEVEDO *et al*, 2018; CARDILLO *et al*, 2015).

Os linfócitos TCD8+ ativam mecanismos efetores de macrófagos para destruição de formas amastigotas e tripomastigotas fagocitadas, além de desenvolverem inúmeros mecanismos com atividade citotóxicas, incluindo secreção de citocinas, como IFN- $\gamma$  e também por meio de atividades citolíticas com a secreção de perforinas e granzinas, que destroem as células infectadas com amastigotas.

Alguns componentes do sistema imune, como a IL-10 na fase aguda e IL-4 na fase crônica, atuam de maneira sinérgica e benéfica no controle do processo inflamatório. Citocinas como IL-4, que induz a expansão dos linfócitos Th2 e alta quantidade de IL-10. TGF- $\beta$  e IL-10 possuem ação anti-inflamatória e são capazes de inibir a ativação dos macrófagos induzido por INF-  $\gamma$ , inibindo a liberação da diferenciação de linfócitos Th1 e a liberação metabólicos tóxicos, estando assim associados ao aumento na susceptibilidade a infecção (GUEDES *et al*, 2009; RIOS *et al*, 2020).

Os anticorpos anti-*T. cruzi* são indispensáveis no controle da infecção e, apesar de não eliminarem o parasita de forma eficaz, modelos experimentais demonstraram maiores taxas de sobrevivência nos animais que produzem anticorpos quando comparados com animais nocauteados e incapazes de produzir anticorpos. Estudos recentes apontam que a maioria dos linfócitos B não sintetizam anticorpos específicos durante os primeiros dias de infecção, ocorrendo esse fenômeno apenas no final da fase aguda. Diferentes imunoglobulinas, principalmente IgG, estão envolvidas na eliminação local e sistêmica do parasito através do complemento, aglutinação e citotoxicidade. Dessa forma, o papel protetor de anticorpos está associado a capacidade de reconhecerem antígenos, formarem agregados que fixam o complemento, aumentando a opsonização e os mecanismos citotóxicos (KUMAR *et al*, 1998; BERMEJO *et al*, 2010).



**Figura 5. Resposta imunológica ao *Trypanosoma cruzi*.** Células do sistema imune inato (macrófagos, células dendríticas e células NK) atuam como linha de frente no combate ao parasito e secretam IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . A IL-12 participa na ativação de células NK, que liberam IFN- $\gamma$  e estimulam a produção de óxido nítrico pelos macrófagos que consequentemente destroem os parasitos. A produção de TNF- $\alpha$  também favorece esse mecanismo. As células dendríticas atuam na resposta imunitária adquirida favorecendo a diferenciação de linfócitos Th1, T CD8+ e linfócitos B. Os linfócitos T CD8+ favorecem a eliminação do parasito pela destruição de células infectadas com formas amastigotas (Adaptada de: JUNQUEIRA *et al*, 2010).

## 10. Patogênese da doença de Chagas

A patogênese da DC é multifatorial, com interações complexas entre patógeno e hospedeiro ainda pouco compreendidas. Várias teorias tentam explicar as lesões presentes na fase crônica da infecção, com mecanismos que incluem dano ao tecido mediado diretamente pelo parasito, dano celular ocasionado por efeitos de respostas imunes não específicas,

microvasculopatia, que leva à isquemia e inflamação do tecido, e autoimunidade, que pode desencadear outros mecanismos patogênicos. Assim, as três principais teorias que utilizam esses processos para elucidar a patogênese da DC são: a teoria da persistência do parasito, a teoria da autoimunidade e a teoria integradora (BONNEY E ENGMAN, 2008; GUTIERREZ *et al*, 2009; NUNES *et al*, 2013; ANDRADE *et al*, 2014, WESLEY *et al.*, 2019).

### **9.1 Persistência do parasito**

A primeira hipótese que tenta explicar a gênese da doença é fundamentada na persistência do parasito, uma vez que o *T. cruzi* tem tropismo por células musculares, em especial as cardíacas. Durante a infecção, as formas tripomastigotas invadem células do hospedeiro (macrófagos, células da neuroglia central e periférica, fibroblastos e células musculares estriadas e lisas), e se transformam em amastigotas que sofrem divisão binária, ocasionando a ruptura das células, liberando antígenos parasitários e ativando a resposta imunitária inflamatória. Essa hipótese se sustenta na detecção do parasito nos tecidos de pacientes infectados pelo *T. cruzi*, que são identificados por técnicas moleculares, como a PCR. A infiltração cardíaca exacerbada por leucócitos também pode causar ruptura mecânica dos miócitos seguido de infiltração mononuclear e fibrose (TEIXEIRA *et al*, 2006; TEIXEIRA *et al*, 2011).

A presença do *T. cruzi* no tecido adiposo foi relatada nas décadas de 1970 (SHOEMAKER *et al*, 1970; SHOEMAKER *et al*, 1974) e 1990 (ANDRADE, 1995), em especial em adipócitos. Estudos demonstraram que o tecido adiposo é um repositório inicial e que o parasito é capaz de persistir no hospedeiro, resultando em um estado inflamatório crônico através de uma superregulação de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas. (FERREIRA *et al*, 2011).

Essa hipótese tem sustentação na detecção do parasito nos tecidos de pacientes crônicos, o uso de imagens de bioluminescência altamente sensíveis que detectam o parasito expressando luciferase permitiu acompanhar por tempos prolongados a infecção em modelos murinos, o que corroborou com novas informações sobre a distribuição tecidual o *T.cruzi*. Durante a fase

crônica do DC o *T. cruzi* teria tropismo por tecidos do sistema gastrointestinal e não se localizaria no coração, apesar dos animais desenvolverem características cardiopatia relacionada à DC. A descrição de que o tecido adiposo e o intestino atuam como reservatórios do *T. cruzi* permitiu a elaboração de uma nova proposta sobre a persistência do parasito, sugerindo que ocorram migrações eventuais para o tecido cardíaco (LEWIS *et al.*, 2014; SILBERSTEIN *et al.*, 2018).

Ademais, esses dados corroboram com achados recentes que demonstram que formas amastigotas podem permanecer em estado de dormência por um período prolongado, e posteriormente se transformam em tripomastigotas, reiniciando novos ciclos de infecção no hospedeiro (SÁNCHEZ-VALDÉZ *et al.*, 2018).

Outro mecanismo que o *T. cruzi* pode induzir dano a célula hospedeira é através do estresse oxidativo. Complexos respiratórios mitocondriais de células infectadas apresentam dano oxidativo com aumento de superóxido e espécies reativas de oxigênio (ROS) no coração, levando à apoptose de cardiomiócitos (BONNEY & ENGMAN, 2015).

Assim, a persistência do parasito e a qualidade da resposta imunitária determinariam a extensão do dano tecidual, entretanto, essa teoria não explica a baixa letalidade nos pacientes com a DC aguda, quando a parasitemia é muito elevada, em contrapartida aos pacientes com a cardiomiopatia crônica, que apresentam carga parasitária frequentemente indetectáveis, mesmo em cortes histológicos das lesões. Dessa forma, a rejeição das células sem a presença do *T. cruzi* reforça o envolvimento dos mecanismos de autoimunidade na patogênese da DC (TEXEIRA *et al.*, 2006).

## **9.2 Autoimunidade**

Doenças autoimunes são consequências de uma resposta imunitária contra autoantígenos que resulta de uma disfunção ou dano eventual no tecido alvo. Apesar de a maioria das doenças autoimunes terem causa desconhecida, é possível que uma infecção parasitária possa ser o evento desencadeante. Uma resposta imunitária eficiente poderia resultar na redução substancial do

número de parasitos com um menor dano tecidual em pacientes assintomáticos. Por outro lado, uma resposta imunitária inadequada poderia levar à persistência do parasito com consequentes lesões teciduais. A hipótese da autoimunidade foi sugerida pioneiramente por Santos-Buch e Teixeira (1974), onde foi observado a interação citotóxica de linfócitos auto-reativos de coelhos infectados pelo *T. cruzi* que rejeitavam e destruíam células embrionárias alogênicas de coração de coelho não parasitado. Além disso, a hipótese de autoimunidade sugere que dano desencadeado pelo parasito levaria a exacerbação da resposta imunitária e quebra da autotolerância, resultando em reação imunológica indesejada contra moléculas próprias. Entre os mecanismos utilizados para elucidar a questão estão o mimetismo molecular, mecanismos de ativação *bystander* e mutações resultantes da integração do kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro (ALBERT *et al*, 1999; ENGMAN E LEON, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 1983; CUNHA-NETO *et al*; 1996).

### **9.3 Mimetismo molecular**

No mimetismo molecular, antígenos próprios do hospedeiro, como a proteína ribossomal B13, apresentam semelhanças imunológicas com antígenos do agente infeccioso, o que leva a quebra de tolerância a autoantígenos por células T, e a resposta imunitária que é gerada contra o patógeno reage de forma cruzada com estruturas do hospedeiro causando danos aos tecidos. A demonstração de células T CD4+ de camundongos com miocardite chagásica capazes de induzir dano cardíaco para camundongos saudáveis corroboram com essa hipótese (ALBERT *et al*, 1999; ENGMAN E LEON, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 1983; CUNHA-NETO *et al*; 1996).

No entanto, não existe consenso sobre as semelhanças moleculares desencadearem dano cardíaco por reação inespecífica, visto que, quando camundongos foram inoculados com parasito morto por aquecimento, não se verificou dano cardíaco com a mesma intensidade que o observado com a inoculação com parasito vivo (BONNEY *et al*, 2013).

#### **9.4 Ativação *Bystander***

Respostas autoimunes por mecanismos de ativação *bystander* poderiam ser desencadeadas por meio da exposição de proteínas intracelulares após danos ao tecido induzido pela persistência do parasito, com consequente liberação de autoantígenos em um ambiente altamente inflamatório. Essa ativação pode ser resultante de uma citólise do miocárdio devido à infecção, o que levaria a liberação de proteínas próprias. Os níveis elevados de proteínas do miocárdio somados ao ambiente pró-inflamatório podem causar um aumento de auto peptídios, estimulando a expansão de células T auto reativas. Além disso, a presença constante de antígenos do parasito pode desencadear respostas imunes mediadas por células T CD4+ e CD8+, capazes de lesar as células infectadas e ainda, as células não-infectadas. Esse estímulo imunológico pode superar o limiar de autotolerância e desencadear a produção de autoanticorpos (BONNEY E ENGMAN, 2008; LEON E ENGMAN, 2001; TEIXEIRA *et al*, 2011; KIERSZENBAUM, 1999).

#### **9.5 Integração do kDNA**

Outra vertente do estudo da autoimunidade da DC é a hipótese que a patogênese ocorra em decorrência de mutações causadas pela integração do kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro. (TEIXEIRA *et al.*, 1983; TEIXEIRA, 1986). Em pesquisas iniciais desenvolvidas por meio de técnicas de citogenéticas e hibridização *in situ*, foi observada a presença do kDNA do *T. cruzi* associado aos cromossomos de macrófagos de camundongos infectados. Em 1994, Teixeira *et al.* demonstraram a integração do kDNA em cultura de macrófagos originados de humanos infectados. Mais tarde, a integração do kDNA de *T. cruzi* foi observada tanto no genoma de hospedeiros humanos infectados, como no genoma de coelhos e aves infectadas em laboratório. Além disso, os estudos do grupo sugerem que o principal sítio de integração do kDNA no genoma do hospedeiro são os elementos retrotransponíveis LINE-1 (TEIXEIRA *et al*, 1991; TEIXEIRA *et al*, 1994; NITZ *et al*, 2004; HECHT *et al*, 2010; TEIXEIRA *et al*, 2006; TEIXEIRA *et al*, 2011).

Nos experimentos realizados em aves isogênicas, foi possível observar as integrações do kDNA de *T. cruzi* nos animais mutados e na progênie. Além



disso, as aves mutadas apresentavam manifestações clínicas como cardiomiopatia e insuficiência cardíaca, semelhantes às observadas em humanos com DC (NITZ *et al*, 2004; TEIXEIRA *et al*, 2011). Posteriormente foram realizados estudos em células germinativas de humanos e a integração do kDNA foi igualmente observada. Os elementos retrotransponíveis LINE-1 foram novamente reconhecidos como o sítio preferencial de integração do kDNA no genoma humano (HECHT *et al*, 2010).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um protocolo de qPCR que permitiu a quantificação das integrações de kDNA no genoma do hospedeiro (WESLEY *et al.*, 2019). Verificou-se que o benznidazol elimina a infecção, porém não previne a integração do kDNA, e que o AZT, uma droga inibidora de retrotransposição, foi eficaz na diminuição do número de integrações no genoma da célula hospedeira. (MORAES, 2016).

## **10. Retroelementos Line-1**

Os elementos que se movem no genoma via RNA e usam a transcriptase reversa, são conhecidos como retrotransposons. Os retrotransposons são divididos em dois grupos, elementos com longas repetições terminais (LTR) e elementos não LTR (HANCKS E KAZAZIAN, 2016; MUÑOZ-LOPEZ *et al*, 2016; RICHARDSON *et al*, 2015; GARCIA-PEREZ *et al*, 2016).

O grupo de retrotransposons LTRs são abundantes no genoma de eucariotos. A estrutura e modo de replicação são similares a de retrovírus e por isso são conhecidos como retrovírus endógenos. Os dois grupos de retroelementos não-LTRs de maior prevalência nos mamíferos são os SINEs (sequências repetitivas curtas) e LINEs (sequências repetitivas longas) (CASSE *et al*, 2006; FINNEGAN, 2012).

Dentro da família dos LINEs, destaca-se o LINE-1 (L1), o mais abundante, representando aproximadamente 17% de todo o genoma de células eucarióticas. Apesar da maioria dos LINEs-1 estarem inativos devido a mutações pontuais, truncamentos e rearranjos, os elementos ativos possuem aproximadamente 6 kb, sendo compostos por uma extremidade 5' UTR onde encontra-se o promotor da RNA polimerase II, duas fases de leitura aberta

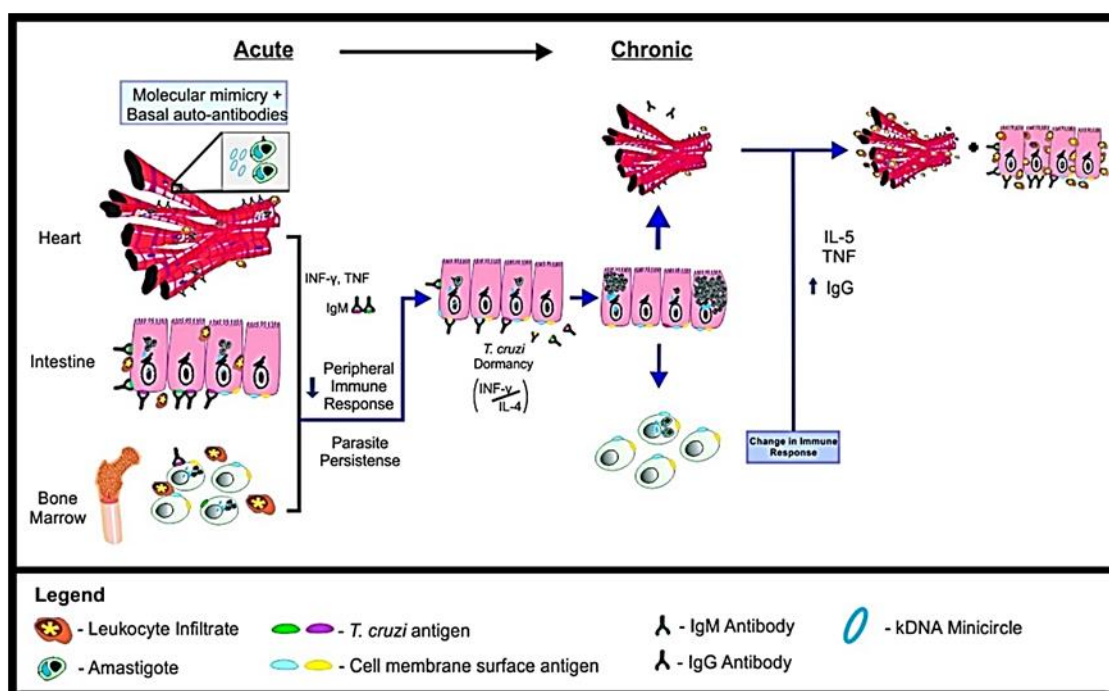
(ORF1 e ORF2), uma extremidade 3'-UTR e uma calda poli-A. A ORF1 codifica uma proteína com afinidade por RNA e com atividade de chaperona, essencial na atividade de retransposição do L1. A ORF2 codifica uma proteína com atividades de endonuclease e transcriptase reversa. O processo de mobilização do L1 inicia-se quando o RNA intermediário é transcrito a partir da ação da RNA Polimerase II, por meio de um promotor atípico localizado dentro da sequência transcrita que irá garantir que o LINE possa ser transcrito independentemente do local de integração. Esse RNA intermediário também irá atuar como mRNA e codifica proteínas importantes para a transposição, as proteínas se ligam ao mRNA L1 e formam um complexo de ribonucleoproteínas que, finalmente, migrará para o núcleo, onde a nova inserção de L1 será realizada por transcrição reversa. (HANCKS E KAZAZIANE, 2016; SCOTT E DEVINE, 2017).

Enquanto algumas inserções de LINEs e SINEs regulam a expressão gênica, em outros momentos, a retrotransposição pode ser deletéria, originando algumas doenças. As inserções de LINEs e SINES estão envolvidas em centenas de doenças genéticas, gerando alterações na metilação do DNA e como consequência o início de diversos processos neoplásicos. Ou ainda a recombinação homóloga mediada por LINE/SINE, leva a perda de sequências de DNA e instabilidade genômica por deleções e rearranjos, tendo como consequência a geração de diferentes tipos de câncer e doenças genéticas, como o câncer de próstata, deficiência do complexo de piruvato desidrogenase, 13 leucemias, síndrome de Alport, câncer de mama, câncer colorretal hereditário não polipósico, doença de Von Hippel-Lindau (ELBARBARY *et al*, 2016).

### **11. Teoria integradora da patogênese da doença de Chagas**

Recentemente, foi proposta uma teoria integradora para esclarecer a questão da patogênese da DC (Figura 6). Essa hipótese propõe que múltiplos mecanismos atuam conjuntamente na gênese das lesões presentes na DC crônica. Após invadir as células hospedeiras, o *T. cruzi* se multiplica e se dispersa por todo corpo, ativando o sistema imune inato e o adaptativo com a produção de citocinas pró inflamatórias, como INF- $\gamma$  e TNF, além de anticorpos IgM, na tentativa de eliminar o parasito. Sinergicamente, à medida que as

células são invadidas, os minicírculos de kDNA são transferidos para o genoma do hospedeiro, o que pode apresentar um mecanismo adaptativo do *T. cruzi*. A presença de parasitos na medula óssea resulta na alteração de células B imaturas e na redução de células B maduras, o que estaria favorecendo a persistência do parasito em estado de latência. Além disso, foi observada uma correlação entre IL-4 e a carga parasitária no intestino, o que não foi visto no coração e na medula óssea. Os autores sugerem que a IL-4 favoreceria a localização do parasito no intestino evitando respostas autoimunes. Dessa forma, o INF- $\gamma$  teria um papel crucial na resposta imunológica contra o parasito e também na produção de anticorpos autoreativos. A quebra do equilíbrio entre IL-4 e INF- $\gamma$  levaria à interrupção da latência do *T. cruzi*, que poderia migrar novamente para medula óssea e retomar o processo patológico, com a integração do kDNA, produção de autoanticorpos, inflamação crônica do tecido e lesão (WESLEY *et al*, 2019).



**Figura 6. Teoria integradora da patogênese da doença de Chagas.** Durante a fase aguda da doença de Chagas, o *T. cruzi* se multiplica e se espalha pelo corpo, ativando o sistema imune e consequente produção de citocinas próinflamatórias e IgM. À medida que o parasito invade as células do hospedeiro, os minicírculos de kDNA são transferidos para o genoma do hospedeiro. Parasitos presentes na medula óssea comprometem a produção de células B maduras e favorecem a persistência do parasito em estado de latência no intestino. O equilíbrio entre IL-4 e IFN- $\gamma$  pode ser decisivo, o desequilíbrio dessas citocinas leva a interrupção do

estado de latência do *T. cruzi* que poderá migrar para medula óssea novamente e retomar o processo patológico (Wesley *et al*, 2019).

## **II. Justificativa**

A DC é um importante problema de saúde pública mundial. Não há vacina para auxiliar na prevenção e controle da doença e os medicamentos disponíveis não são eficazes na fase crônica da infecção, além de apresentarem efeitos colaterais graves. Os esforços para gerar novas terapias são dificultados por limitações da compreensão da biologia do parasito e dos mecanismos patogênicos. Isso reflete em múltiplas teorias que tentam explicar os processos envolvidos nas lesões características da DC, ora ressaltando a importância do parasito e, em outros momentos, indicando a participação de respostas autoimunes. Apesar de distintas, tais teorias não são excludentes e necessitam ser avaliadas de maneira integrada.

Assim, é imprescindível aprofundar o conhecimento relacionado a patogênese da doença, avaliando a ação conjunta de diversos fatores na gênese das lesões teciduais e conseqüentemente, na diversidade das manifestações clínicas presentes na DC. Identificar tais fatores poderá auxiliar no processo de elaboração de novas estratégias para o tratamento.

### **III. Objetivos**

#### **1. Geral**

Estudar a patogênese da doença de Chagas de forma integrativa, avaliando a influência de fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro nas diversas manifestações clínicas durante a fase crônica da doença de Chagas.

#### **2. Específicos**

- Avaliar a influência da carga parasitária na evolução clínica da doença de Chagas crônica;
- Detectar o acúmulo de integrações de kDNA de *T. cruzi* no genoma dos pacientes e avaliar se está associado à progressão da doença;
- Quantificar as sequências de retroelementos LINE-1 no genoma dos pacientes com diferentes sintomas da DC crônica;
- Avaliar a produção de citocinas nas diferentes apresentações clínicas da doença de Chagas crônica;
- Detectar e associar a produção de anticorpos anti-*T. cruzi* e de autoanticorpos com as manifestações cardíacas, digestivas, cardiodigestivas e com a forma indeterminada da doença de Chagas crônica;
- Realizar a análise de correlação dos fatores associados ao parasito e ao hospedeiro nas diferentes apresentações clínicas da doença de Chagas crônica.

## **IV. Metodologia**

### **1. Grupo experimental**

Foram coletadas amostras de sangue de 176 pacientes com diagnóstico sorológico positivo para Doença de Chagas, atendidos no ambulatório de Doenças Infecto-parasitárias do Hospital Universitário da UNB (HUB) de abril de 2016 a maio de 2017. Os critérios de inclusão foram:

- Ser maior de 18 anos;
- Ter em seu prontuário comprovação do diagnóstico da DC através de pelo menos dois testes sorológicos positivos, entre os quais imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência indireta, e/ou hemaglutinação indireta;
- Estar em acompanhamento regular ou em primeira consulta no HUB.

Foram critérios para exclusão ter valvopatias de repercussão pelo menos moderada, doença arterial coronária, hipertensão arterial grave, diabetes mellitus descompensada ou alguma outra doença infecto-contagiosa.

Todos os pacientes foram convidados a participar da pesquisa durante a consultas clínicas no serviço de infectologia, receberam informações sobre o estudo e, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foram encaminhados para coleta de sangue periférico e agendamentos de exames cardiológicos e raio X de tórax.

Todos os indivíduos estavam na fase crônica da infecção e eram provenientes de diferentes localidades: Bahia, Ceará, Goiás, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Tocantins, sendo o estado da Bahia com maior número de representantes, 99 pacientes. A média de idade dos pacientes era de 46,8 anos.

Os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com a apresentação clínica (Tabela 1). O grupo cardíaco foi composto por 49 pacientes, dentre eles, 17 haviam realizado tratamento com Benznidazol. O grupo Indeterminado foi constituído por 115 indivíduos, dentre eles, 38 passaram por tratamento. No

grupo digestivo, se enquadraram 22 pacientes, onde 6 foram tratados com benznidazol. E por fim, o grupo de apresentação mista foi composto por 9 pacientes com manifestações cardíacas e digestivas, e 3 haviam realizado tratamento.

**Tabela 1:** Divisão dos grupos experimentais de acordo com a apresentação clínica

Forma clínica	Feminino/Masculino	Média de idade	Tratados com Benznidazol
Indeterminada	84/31 (115)	47,3	46
Cardíaca	17/13 (30)	45,1	11
Digestiva	12/10 (22)	45,8	6
Mista	4/5 (9)	49,0	3

Foi coletado sangue da veia braquial seguindo todos os padrões de qualidade pré-analítica. Os tubos de coleta utilizados foram tubos com tampa roxa (EDTA) e tubos com tampa vermelha e aro amarelo contendo gel separador. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em caixa de transporte contendo gelo e temperatura entre 2° e 4°C até a chegada no Laboratório Interdisciplinar de Biociências (LabIBC) da Universidade de Brasília (UNB), onde foram processadas para extração de DNA e separação de soro.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília com número de parecer 1.521.680.

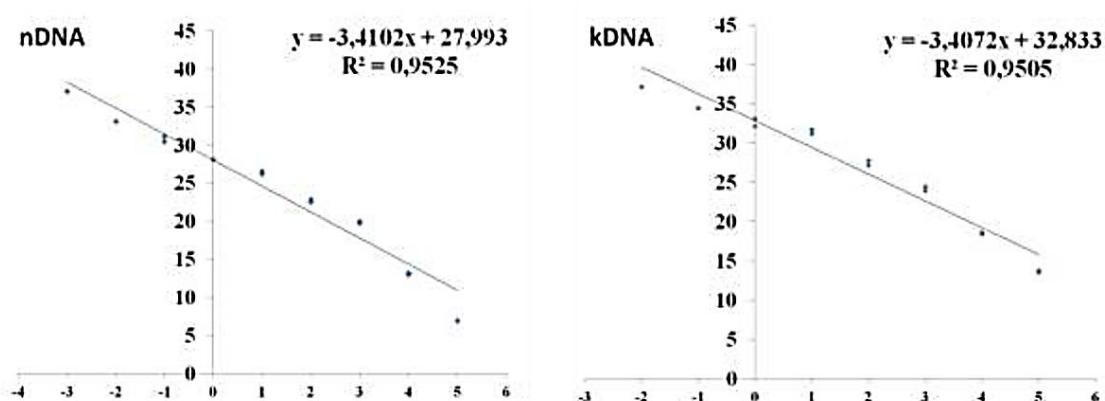
## 2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com o kit Wizard Genomic DNA Purification da Promega, de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado no aparelho Nanovue (GE life Science). A qualidade do DNA extraído foi testada a partir de PCR utilizando *primers* para o gene da  $\beta$ -actina e a visualização dos produtos amplificados foi feita pela eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) 0,8%, corado com Brometo de Etídio 0,5 mg/mL, em tampão de TAE (Tris acetato 90mM pH 8,0; EDTA 24Mm). O DNA foi mantido a – 20 °C até o momento do uso.



### 3. PCR quantitativa (qPCR)

Os dados das qPCRs foram analisados por quantificação absoluta. Para isso, foram construídas curvas padrão a partir de diferentes concentrações de DNA de *T. cruzi*. Foram realizadas diluições seriadas de DNA do parasito (de  $10^5$  a  $10^{-3}$  parasitos equivalentes /100ng de DNA para o nDNA, e de  $10^5$  a  $10^{-2}$  parasitos equivalentes /100ng de DNA para o kDNA). A curva padrão do nDNA apresentou eficiência de 96.4%,  $R^2 = 0.953$  e *slope* de  $-3.41$ , enquanto a de kDNA apresentou eficiência de 96.6%,  $R^2 = 0.951$  e *slope* de  $-3.41$  (Figura 7). Essas curvas foram salvas e utilizadas para a quantificação de todas as reações de qPCR através do uso da equação da reta ( $y = a+b$ , onde  $y$  é o Cq da amostra;  $x$  é a quantidade do produto amplificado a ser calculada;  $a$  é o coeficiente angular da reta e  $b$  é o coeficiente linear).



**Figura 7: Curvas padrão de qPCR para nDNA e kDNA.** As curvas foram obtidas a partir de diferentes concentrações do *Trypanosoma cruzi*.

A qPCR para amplificação de nDNA do *T.cruzi* foi utilizada para a determinação da carga parasitária e usou os iniciadores TcZ3 (5' TGC ACT CGG CTG ATC GTT T 3') e TcZ4 (5'-ATT CCT CCA AGC AGC GGA TA 3'), gerando um produto de aproximadamente 168 pb (NDAO *et al.*, 2000). Cada reação continha 100 ng de DNA molde, 0,2  $\mu$ M de cada iniciador, 10  $\mu$ L de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20 $\mu$ L. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®), em triplicata, no termociclador

7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA), nas seguintes condições:

50 °C/10 min  
95 °C/10 min  
95 °C/15 seg }  
60 °C/45 seg } X 40  
72 °C/10 seg }

Para a quantificação dos minicírculos de kDNA, foram utilizados os iniciadores S36 (5'GGT TCG ATT GGG GTT GGT G3') e S67rev (5'GAA CCC CCC TCC CAA AAC C3'), gerando um produto de cerca de 250pb (Hecht *et al*, 2010). As demais condições da reação foram as mesmas da qPCR de nDNA, nas seguintes condições:

50 °C/2 min  
95 °C/10 min  
95 °C/15 seg }  
60 °C/45 seg } X 40  
72 °C/10 seg }

Com a utilização do sistema SYBR Green, foi possível obter a curva de dissociação (*Melting curve*) no final dos ciclos de amplificação da qPCR. Essa curva indica o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos iniciadores específicos para as sequências-alvo pesquisadas. A curva de dissociação é essencial para verificar se a amplificação foi específica, com a formação do produto de PCR desejado. Neste caso, a curva de dissociação apresenta um pico único. O aparecimento de vários picos na curva sugere a

formação de produtos inespecíficos na reação ou dímeros de iniciadores. Além disso, para quantificar as integrações do kDNA do *T. cruzi* foi utilizado protocolo padronizado por Moraes, 2016, onde a razão kDNA/nDNA representa o acúmulo de integrações de kDNA no genoma hospedeiro.

Para quantificação de LINE-1 no genoma de pacientes com a DC, realizamos um qPCR foram utilizados iniciadores L1-ORF1 (5'-ACA CCT ATT CCA AAA TTG ACC AC-3 ') e L1-ORF1-REV (5'-TTC CCT CTA CAC ACT GC TTTGA-3 '), conforme descrito por Sunami *et al*, 2008. As reações foram padronizadas com 2 µL de DNA, 0,8 µM de cada primer, 10 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, EUA), em um volume final de 20 µL. As condições da reação foram:

50 °C/2 min	
95 °C/10 min	
95 °C/30 seg	} X 35
64 °C/30 seg	
72 °C/30 seg	

#### 4. Ensaio de Imunoabsorção Enzimático Indireto (ELISA)

Os soros dos pacientes foram obtidos a partir de 3 mL de sangue, coletados sem anticoagulante e em tubo com gel separador. A separação do soro foi realizada após centrifugação dos tubos por 15 min a 10000 rpm. Os soros foram armazenados a – 20 °C até o momento do uso. Para determinar o título de anticorpos anti-*T.cruzi*, anti-proteínas cardíacas e intestinais produzidos pelos pacientes, as amostras de soro foram submetidas à técnica de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto (ELISA) (Lauria-Pires,2000).

Para a produção de antígenos totais de *T. cruzi*, foram centrifugados 1 mL das formas epimastigotas de *T. cruzi* crescidas em meio Mínimo Essencial (DMEM) (4.500 rpm por 10 minutos), o sedimento foi lavado três vezes com PBS 1X pH 7,4 (Phosphate Buffered Saline, 58,44M NaCl; 74,55M KCl; 136,09M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 141,96M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e o *pellet* foi ressuscitado em 3 mL de

água Milli-Q. As células foram lisadas por congelamento (-20°C) e descongelamento (temperatura ambiente) por três ciclos e centrifugadas novamente (14.000 rpm, por 10 minutos). Após esse procedimento, foi determinada a concentração proteica do antígeno total de *T. cruzi* por espectrofotometria, com o NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Science, UK).

Para a produção de antígenos cardíacos e intestinais, foram centrifugados 20 µL de células cardíacas (cardiomiócito), derivadas da linha celular DF-19-9-11T de células-tronco pluripotentes induzidas, que foram diferenciadas em cardiomiócitos usando o protocolo GiWi (LIAN et al., 2013; ZHANG et al., 2019) (> 80% puro), e 20 µL de células epiteliais intestinais (CACO-2) crescidas em DMEN 10% (4.500 rpm por 10 min), lavadas por três vezes com PBS 1X pH 7,4 (Phosphate Buffered Saline, 58,44M NaCl; 74,55M KCl; 136,09M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 141,96M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e ressuspendidos em 3 mL de água Milli-Q. As células foram lisadas por congelamento (-80° C) e descongelamento (37° C) por três ciclos e centrifugadas novamente (14.000 rpm, por 10 minutos). Após esse procedimento, foi feita a quantificação da concentração proteica do antígeno por meio de espectrofotometria, com o NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Science UK).

**Sensibilização das placas:** As placas de fundo chato com 96 poços foram sensibilizadas com os antígenos extraídos (0,2 µg/poço de antígeno de *T. cruzi* solubilizado em tampão PBS 1X pH 7,4; 0,5 µg/poço de antígeno cardíaco solubilizado em tampão PBS 1X pH 7,4; 2µg/poço de antígeno intestinais solubilizado em tampão PBS 1X pH 7,4) em um volume de 50 µL/poço e incubadas *overnight* em câmara úmida, a 37°C. Para retirar o excesso de antígeno, as placas foram lavadas com PBS-Tween (PBS com 0,05% de Polissorbato 20) e, posteriormente, foram acrescentados 150 µL de PBS- Leite 1X (pH 7,4, com 5% de leite desnatado) para bloquear a adesão de proteínas nos sítios inespecíficos. Então, foram incubadas novamente por 1 hora à temperatura ambiente em câmara úmida e, posteriormente, lavadas com PBS-Tween por três vezes.

**Incubação do 1º anticorpo:** os soros dos pacientes foram diluídos na razão 1:100 em PBS- Leite 1X (pH 7,4, com 2% de leite desnatado) e foram

adicionados 50 µL/poço, em triplicata. Seguiu-se com a incubação por 1 hora e meia a 37°C, em câmara úmida. O excesso de soro diluído foi descartado e foram realizadas três lavagens com PBS-Tween.

**Incubação do 2º anticorpo:** Depois, as placas foram incubadas com o anticorpo secundário, Anti-IgG humana (Sigma-Aldrich®) conjugado a enzima peroxidase, diluído 1:5000 em PBS-Leite 1X (pH 7,4, com 2% de leite desnatado), adicionando 50 µL/poço, seguindo com a incubação na câmara úmida nas mesmas condições usadas para o 1º anticorpo.

Revelação da reação: Adicionou-se 50 µL/poço da solução reveladora (Sigma) composta pelo cromógeno pnPP (p-nitrofenol fosfato), diluído em Tampão de Dietanolamina pH 9,8 (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>). A placa foi incubada por 12 minutos a temperatura ambiente, na ausência de luz e a leitura foi realizada a 490 nm no espectrofotômetro (*BioTeK®- Synergy HT*).

O ponto de corte das amostras foi estabelecido por meio da fórmula [(média dos controles negativos x 2) – (média dos brancos)] (Nybo, 2010). A partir do valor do ponto de corte, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram uma densidade óptica (DO) 10% acima desse valor e negativas, aquelas com DO 10% abaixo do ponto de corte.

## 5. Dosagem de citocinas

Foi realizada a dosagem de interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-17A (IL-17A), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon-γ (IFN-γ) com o kit Cytometric Bead Array (CBA) human Th1/Th2 Cytokine Kit (BD Bioscience), respeitando as recomendações do fabricante. Inicialmente, adicionou-se 25 µL dos soros em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL devidamente identificados. Além dos soros, também foram adicionados os controles da reação que foram preparados por meio de diluição seriada a partir do *Top Standard*, incluído no kit. Em sequência, foram adicionados 25 µL de *capture beads* e 25 µL de *Human Th1/Th2 PE Reaction Reagent*. Os tubos foram incubados por três horas à temperatura ambiente em local sem exposição de luz. Após o período de incubação, adicionou-se 500 µL de *Wash Buffer* em cada tubo e centrifugou-se a 200 x g por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se

mais 250  $\mu$ L de *Wash Buffer* em cada tubo, ressuspensando o precipitado. Duzentos microlitros do conteúdo total dos tubos foram transferidos para uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em citômetro D LSRFortessa™. Os dados foram analisados no software FCAP 3.0 (BD Biosciences®, USA).

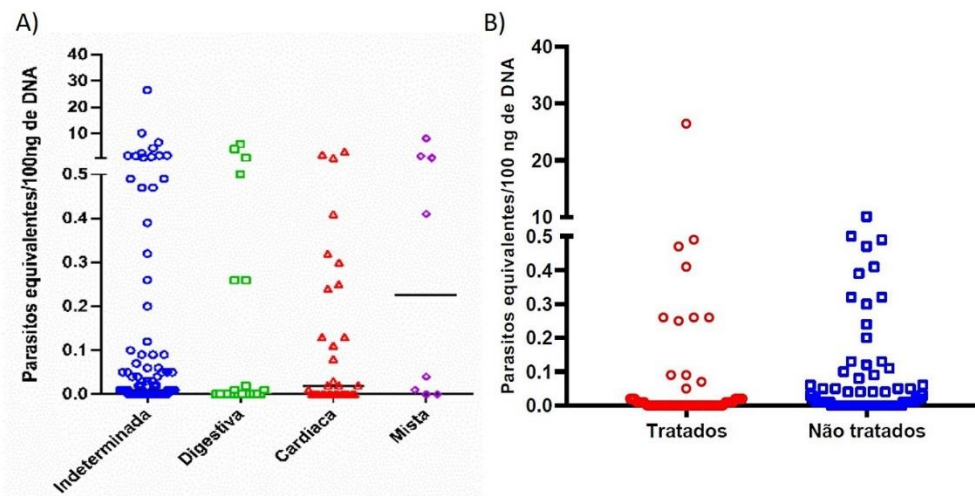
## **6. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SAS® (v.9.4, Cary, Carolina do Norte), considerando-se 5% de nível de significância. Os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Comparações considerando as formas de apresentação da doença como fator fixo foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis com posterior comparação 2 a 2 pelo teste de Wilcoxon. Para as variáveis qualitativas, foram realizadas análises de frequência utilizando o teste do qui-quadrado. Não obstante, análise de correlação foi efetuada a fim de evidenciar as correlações entre as variáveis estudadas em cada grupo experimental. Por último, os dados foram submetidos a análise de componentes principais no intuito de descrever graficamente a variação do conjunto de variáveis.

## V. Resultados

### 1. Quantificação da carga parasitária e sua influência na evolução clínica da doença de Chagas crônica

Para quantificar a carga parasitária do *T. cruzi*, foi realizada PCR quantitativa com *primers* específicos para o DNA nuclear do parasito e, posteriormente, foi analisado se esta carga parasitária estava diretamente relacionada com o surgimento e agravamento dos sintomas clínicos na fase crônica da infecção. No grupo dos indeterminados, a média da quantidade de parasitos detectados foi de  $0,54 \pm 2,34$  parasitos equivalentes/100 ng de DNA. No grupo dos pacientes com manifestações digestivas, a média foi muito similar:  $0,54 \pm 2,35$  parasitos equivalentes /100 ng de DNA. De interesse, em 72,72% desses pacientes, não foi possível detectar carga parasitária. No grupo cardíaco, a média da quantidade de parasitos detectados foi a menor ( $0,25 \pm 2,37$  parasitos equivalentes /100 ng de DNA), enquanto o grupo da forma mista da infecção teve uma maior concentração de parasitos detectados, com média de  $1,3 \pm 0,99$  parasitos equivalentes / 100 ng de DNA. Apesar das diferentes concentrações do DNA do *T. cruzi* identificadas nos pacientes, os dados não apresentaram diferença significativa, como demonstrado na figura 8A. Foi analisada também a carga parasitária entre pacientes tratados e não tratados com Benznidazol e novamente não se observou diferença estatística entre os grupos (Figura 8B).



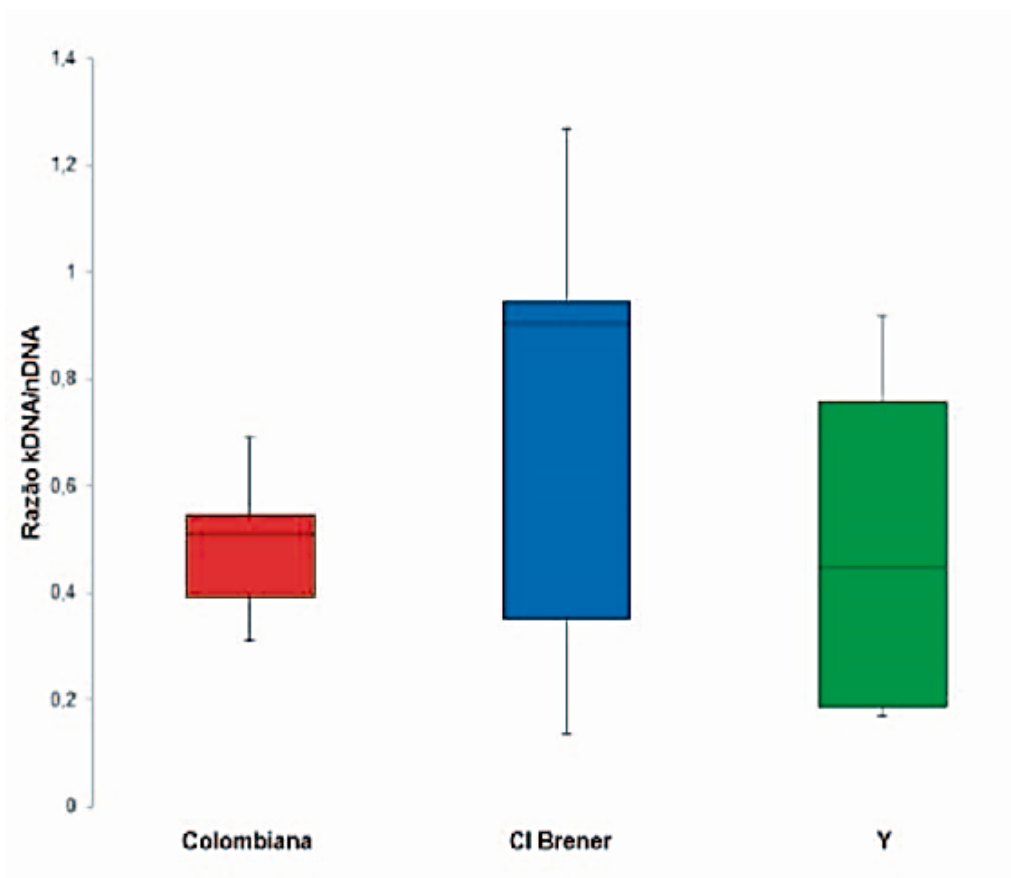
**Figura 8: Determinação da carga parasitária em pacientes com doença de Chagas crônica.** A) Carga parasitária entre os grupos com diferentes manifestações clínicas. B) Carga parasitária entre pacientes tratados e não tratados com Benznidazol.

## 2. Acúmulo de integrações de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma dos pacientes com doença de Chagas crônica

Com o intuito de quantificar as integrações do kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro e avaliar como essas integrações estariam influenciando no surgimento e gravidade das manifestações clínicas, foram utilizados *primers* específicos para regiões conservadas de kDNA. Para calcular a quantidade de sequências de kDNA integradas no genoma dos pacientes, foi utilizada a razão kDNA/nDNA, e dessa forma, foi possível excluir as sequências de kDNA presentes no parasito. O ponto de corte utilizado foi de 0,9, por ser a maior razão kDNA/nDNA encontrada nos *pools* das diferentes cepas de *T. cruzi* testadas (Figura 9). Quando avaliados qualitativamente, 81,8% dos 176 pacientes apresentaram integrações do kDNA, sendo que, no grupo dos cardíacos, 70% tiveram integrações detectadas, 85,22% no grupo dos indeterminados, 77,28% no grupo das manifestações digestivas e 88,89% no grupo da manifestação mista. Analisando os dados quantitativamente, o grupo indeterminado teve maior quantidade de integrações ( $14.136,16 \pm 51.756,5$ ),



seguido do grupo cardíaco ( $10.096,82 \pm 52.184,66$ ), digestivo ( $5.468,12 \pm 52.622,89$ ) e misto ( $231,4 \pm 59.561,87$ ) (Figura 10A).

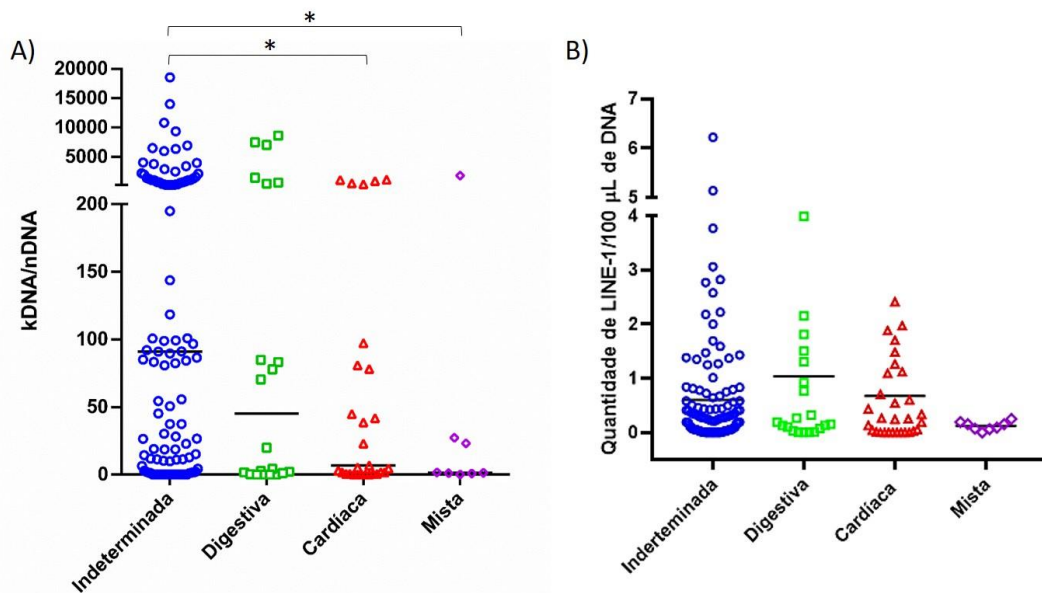


**Figura 9: Determinação da razão kDNA/nDNA em pools de amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.** A proporção de DNA mitocondrial (kDNA) e DNA nuclear (nDNA) das linhagens Colombiana, CL Brener e Y de *T. cruzi* foi determinada mediante amplificação das sequências-alvo por qPCR. Valores superiores à razão máxima obtida para cada cepa representa o ponto de corte a partir do qual se considerou que ocorreu integração dos minicírculos de kDNA no genoma do hospedeiro.

Quando realizada uma análise de dois em dois grupos (Wilcoxon), foi possível observar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a quantidade de integração do grupo da forma indeterminada em relação ao grupo da forma cardíaca, sendo o mesmo observado ao se comparar o grupo indeterminado e o grupo da forma mista (Figura 10A).

### 3. Quantificação de retroelementos LINE-1 no genoma dos pacientes com doença de Chagas crônica

Para avaliar se a infecção pelo *T. cruzi* influencia a quantidade de retroelementos LINE-1, principal sítio de integração do kDNA no genoma humano (HECHT *et al*, 2010) foi realizada uma qPCR utilizando *primers* específicos para a enzima transcriptase reversa do LINE-1 humano. Entretanto, nossos resultados não mostraram diferença estatística na quantidade de LINE-1 entre os pacientes com diferentes formas de apresentação da doença (Figura 10B).



**Figura 10: Quantificação de integrações de kDNA e elementos LINE-1 no genoma de pacientes com doença de Chagas crônica.** A) O acúmulo das integrações de kDNA foi avaliada em pacientes com diferentes apresentações clínicas da doença de Chagas (indeterminada, digestiva, cardíaca e mista). O grupo da forma indeterminada difere estatisticamente do grupo da forma cardíaca ( $p < 0,05$ ) e do grupo da forma mista ( $p < 0,05$ ). B) Quantificação de retroelementos LINE-1 no genoma dos pacientes. Não foi possível observar diferença estatística entre os grupos.

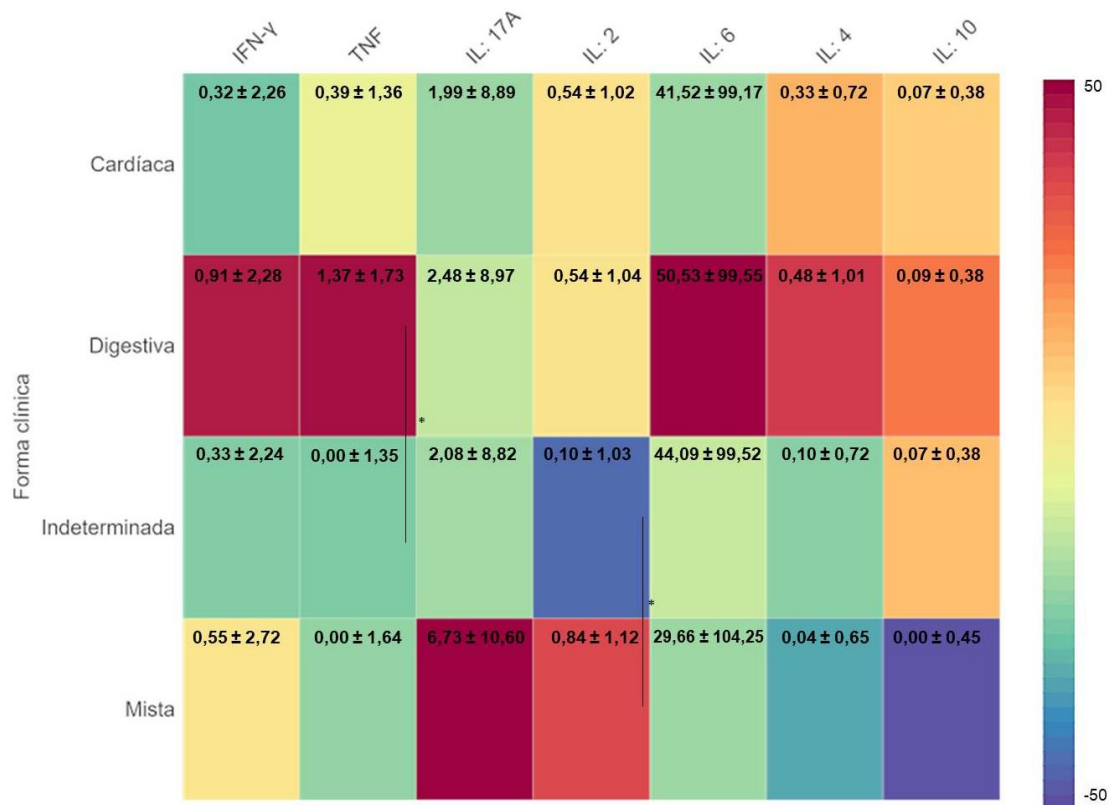
#### **4. Quantificação das citocinas produzidas por pacientes com diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas**

Para quantificar concentrações plasmáticas de interleucinas e citocinas pró inflamatórias e anti-inflamatórias envolvidas no processo da resposta imunológica do hospedeiro ao *T. cruzi*, realizamos, por citometria de fluxo, a dosagem de IL-2 (envolvida no processo anti e pró-inflamatório), IL-6, IL-17A, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (relacionadas a uma resposta pró-inflamatória), e IL-4 e IL-10, (implicadas em uma resposta anti-inflamatória) (Figura 11).

Em relação a concentração de IL-2, foi observada diferença estatística apenas entre o grupo formado por pacientes com a forma indeterminada ( $0,10 \pm 1,03$  pg/mL) e o grupo de indivíduos com forma mista ( $0,84 \pm 1,12$  pg/mL), com  $p < 0,05$  (grupo cardíaco:  $0,55 \pm 1,02$  pg/mL; digestivo:  $0,54 \pm 1,04$  pg/mL). Já em relação à produção de IL-6, IL-17A e INF- $\gamma$ , não houve diferença significativa entre os pacientes com diferentes manifestações clínicas.

Também foram quantificadas as concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ , observando-se que os pacientes com a forma digestiva ( $1,37 \pm 1,73$  pg/mL) apresentavam maiores concentrações de produção dessa citocina em relação aos demais pacientes, com diferença estatística quando comparado ao grupo de indivíduos com a forma indeterminada ( $0,05 \pm 1,35$  pg/mL;  $p < 0,05$ ), sugerindo a ação de um processo inflamatório mais acentuado nesse grupo.

Finalmente, quando quantificadas as citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), não foi identificada diferença significativa na produção dessas citocinas entre os pacientes dos grupos estudados.



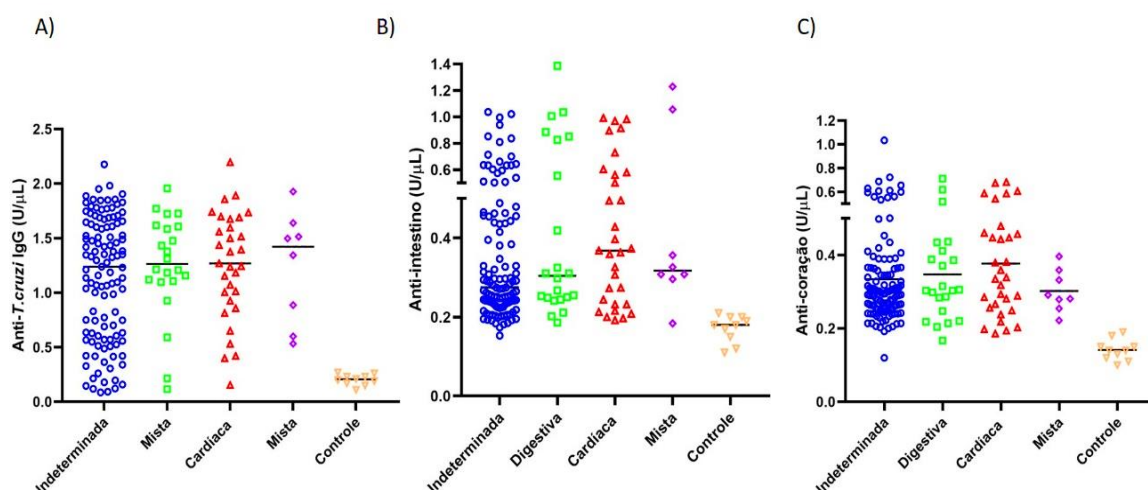
**Figura 11: Quantificação das citocinas pró- e anti-inflamatórias produzidas por pacientes na fase crônica da doença de Chagas.** Avaliação da produção de citocinas circulantes, por citometria de fluxo, em pacientes com diferentes apresentações clínicas da doença de Chagas. Os valores em cada retângulo representam a média de produção de cada citocina para seu respectivo grupo. Os asteriscos representam a diferença estatística das concentrações de produção de determinada citocina entre os diferentes grupos. A saber, a quantificação de IL-2 demonstrou diferença estatística entre o grupo de forma indeterminada e o grupo de forma Mista ( $p < 0,05$ ). A quantificação de TNF- $\alpha$  nos grupos experimentais demonstrou diferença estatística entre o grupo de forma Digestiva e o grupo de forma Indeterminada ( $p < 0,05$ ).

## 5. Avaliação de marcadores da resposta imunitária humoral ao *Trypanosoma cruzi* e a autoantígenos

Para avaliar a resposta imunitária humoral nos pacientes estudados, realizamos a quantificação de anticorpos específicos para o *T. cruzi* e também de anticorpos séricos contra antígenos de células cardíacas e intestinais pelo método de ELISA. Como todos os pacientes se encontravam na fase crônica da infecção, foi realizada apenas a quantificação de anticorpos do tipo IgG. Em

relação a resposta humoral contra o *T. cruzi*, verificou-se a presença de anticorpos específicos em todos os pacientes testados, mas sem diferença estatística entre os grupos (forma indeterminada:  $1,13 \pm 0,53$  U/ $\mu$ L; cardíaca:  $1,25 \pm 0,53$  U/ $\mu$ L; digestiva:  $1,25 \pm 0,53$  U/ $\mu$ L; mista:  $1,24 \pm 0,55$  U/ $\mu$ L) (Figura 12A).

Ao analisar a produção de autoanticorpos do tipo IgG, observamos que todos os pacientes apresentavam anticorpos reagentes contra antígenos extraídos de células cardíacas (forma indeterminada:  $0,33 \pm 0,13$  U/ $\mu$ L; cardíaca:  $0,37 \pm 0,13$  U/ $\mu$ L; digestiva:  $0,34 \pm 0,13$  U/ $\mu$ L; mista:  $0,30 \pm 0,11$  U/ $\mu$ L) e de células intestinais (forma indeterminada:  $0,36 \pm 0,24$  U/ $\mu$ L; cardíaca:  $0,45 \pm 0,24$  U/ $\mu$ L; digestiva:  $0,48 \pm 0,24$  U/ $\mu$ L; mista:  $0,50 \pm 0,26$  U/ $\mu$ L), entretanto, a análise estatística não mostrou diferenças entre os grupos (Figuras 12B e 12C).

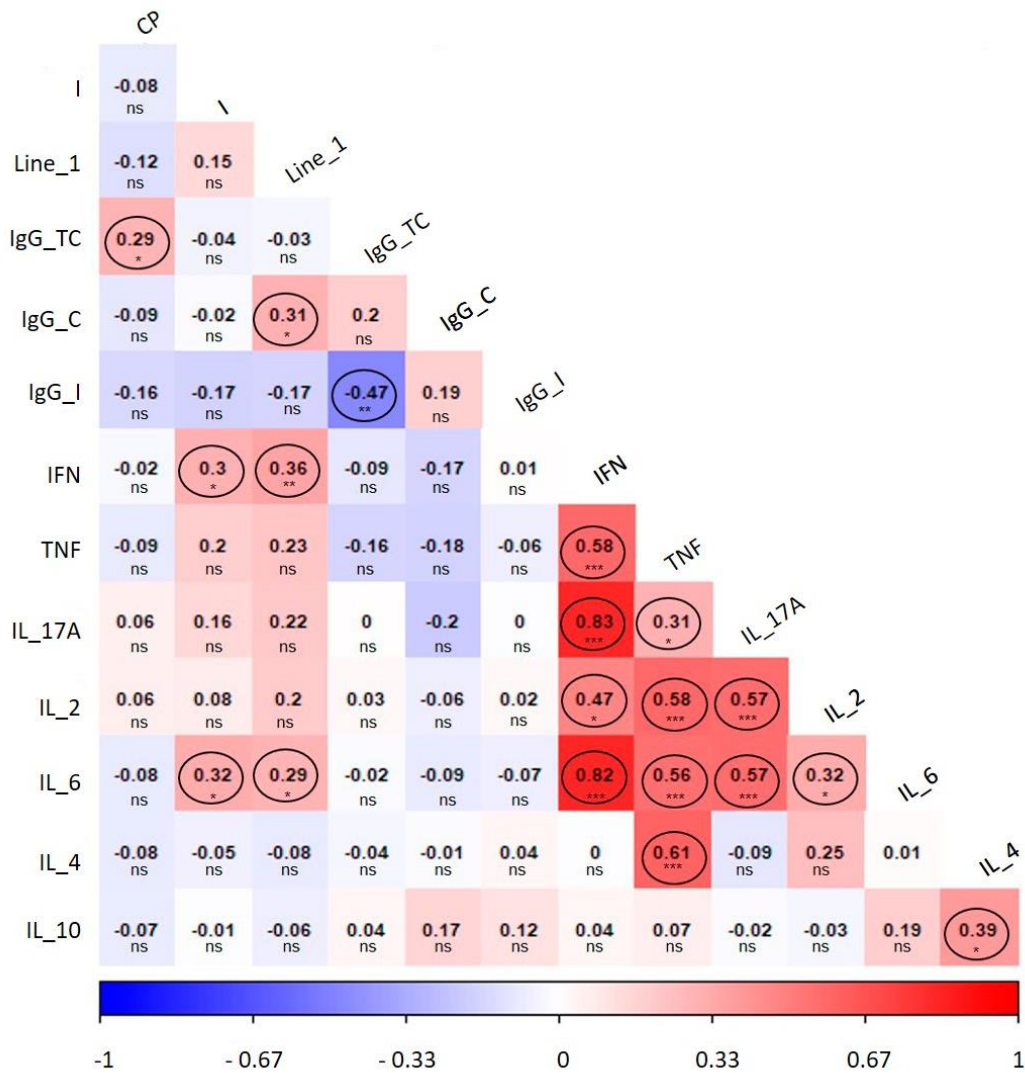


**Figura 12: Quantificação de anticorpos do tipo IgG em pacientes com doença de Chagas crônica. A)** Quantificação de anticorpos específicos ao *Trypanosoma cruzi*. **B)** Quantificação de autoanticorpos contra antígenos extraídos de células cardíacas. **C)** Quantificação de autoanticorpos a antígenos extraídos de células intestinais.

## 6. Análise de correlação

A interação entre os diversos fatores avaliados neste estudo, em pacientes com diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas, foi verificada através de uma análise de correlação. Inicialmente, foi analisada a correlação entre os diferentes valores quantitativos obtidos no estudo sem

separação dos pacientes segundo a apresentação clínica. Assim, na Figura 13, observamos uma correlação entre a carga parasitária e quantidade de anticorpos específicos contra o *T. cruzi* ( $p < 0,05$ ), bem como entre a quantidade de integrações com a produção de IFN- $\gamma$  e IL-6 ( $p < 0,05$ ). De interesse, as citocinas e interleucinas avaliadas apresentaram diferentes correlações com significância estatística, a saber: a maior produção de TNF- $\alpha$  está relacionada a uma maior produção de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-4 ( $p < 0,001$ ) e IL-17A ( $p < 0,05$ ). O mesmo foi observado com a IL-2, onde sua maior produção estava relacionada ao aumento na produção de IL-17A ( $p < 0,001$ ), IFN- $\gamma$  e IL-6 ( $p < 0,05$ ). O aumento de IL-6 mostrou correlação com a produção de IL-17A, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,001$ ). Já a interleucina anti-inflamatória IL-10 apresentou correlação com a maior produção de IL-4 ( $p < 0,05$ ). Ademais, foi observada correlação entre a quantidade de retroelementos LINE-1 com a produção de autoanticorpos contra proteínas de células cardíacas ( $p < 0,05$ ), INF- $\gamma$  ( $p < 0,01$ ) e IL-6 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 13: Correlação entre parâmetros quantitativos avaliados nos pacientes com diferentes apresentações clínicas da Doença de Chagas.** \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ . CP: quantificação de DNA nuclear; I: quantificação de integrações do kDNA no genoma do hospedeiro; quantidade de LINE-1: LINE-1; IgG\_TC: Anticorpos IgG específicos para o *Trypanosoma cruzi*; IgG\_C: Autoanticorpos anti proteínas de células cardíacas; IgG\_I: Autoanticorpos anti proreínas de células intestinais; IL-17A: Interleucina 17A; IFN: Interferon  $\gamma$ ; TNF: Fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; IL-10: Interleucina 10; IL-6: Interleucina 6; IL-4: Interleucina 4; IL-2: Interleucina 2.

### 6.1. Análise de correlação de fatores avaliados em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas

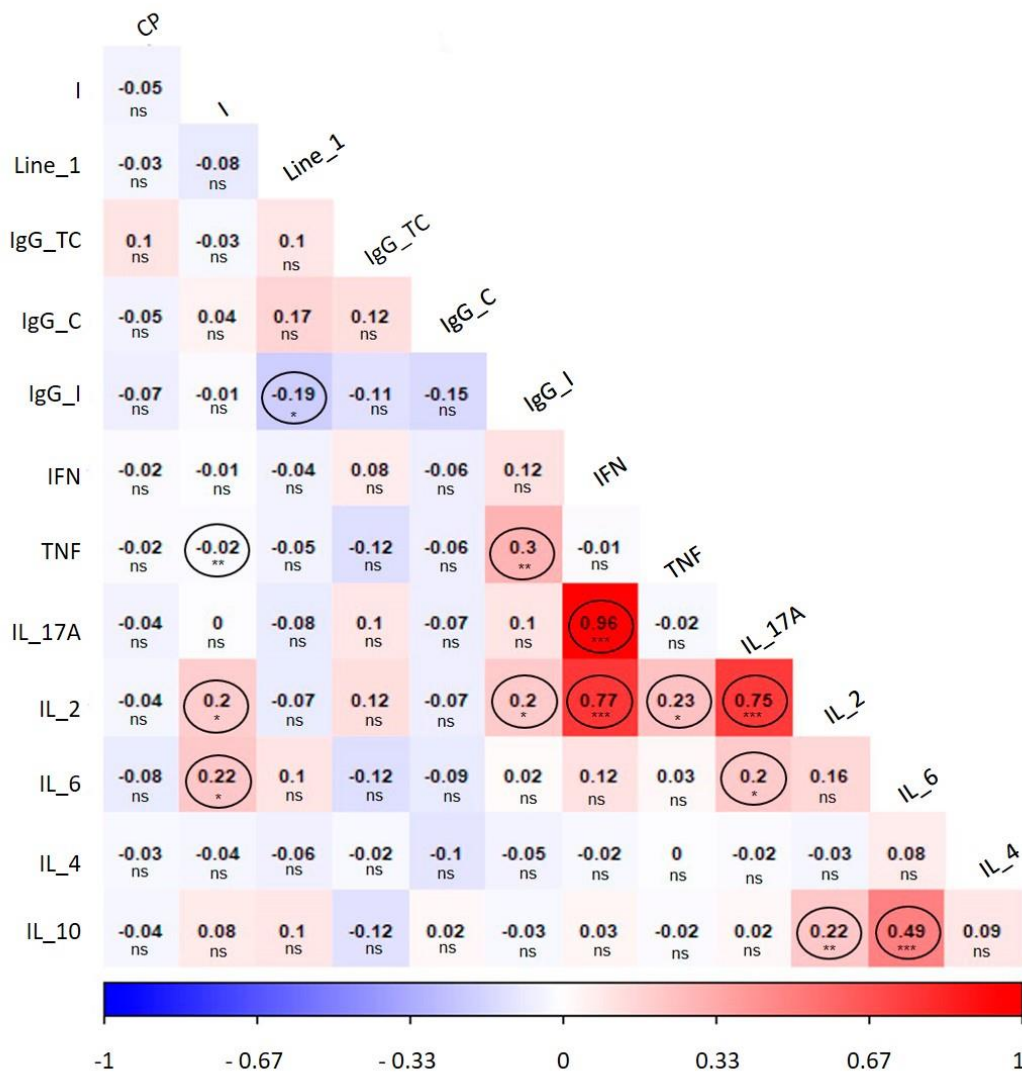
A análise de correlação realizada com os dados quantitativos dos pacientes com a forma indeterminada (Figura 14) demonstrou relação significativa entre interleucinas pró-inflamatórias, tais como: IL-2 X IL-17A ( $p < 0,001$ ), IL-2 X INF- $\gamma$  ( $p < 0,001$ ), IL-2 X TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), IL-6 X IL-17A ( $p < 0,05$ ), IL-17A X INF- $\gamma$  ( $p < 0,001$ ). Entre as citocinas anti-inflamatórias,

apenas a IL-10 teve relação significativa com outras citocinas, IL-6 ( $p < 0,001$ ) e IL-2 ( $p < 0,05$ ).

Observados os parâmetros da resposta imunitária humoral, ficou evidenciado que a produção de auto-anticorpos contra proteínas de células intestinais se correlacionou às interleucinas inflamatórias IL-2 ( $p < 0,05$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ).

A quantidade de integrações de kDNA no genoma dos pacientes se associou diretamente com a produção de IL-2 e IL-6 ( $p < 0,05$ ), além de apresentar uma correlação negativa com a produção de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ). Ademais, houve correlação negativa entre a quantidade de LINE-1 e a produção de auto-anticorpos anti-proteínas de células intestinais ( $p < 0,05$ ).





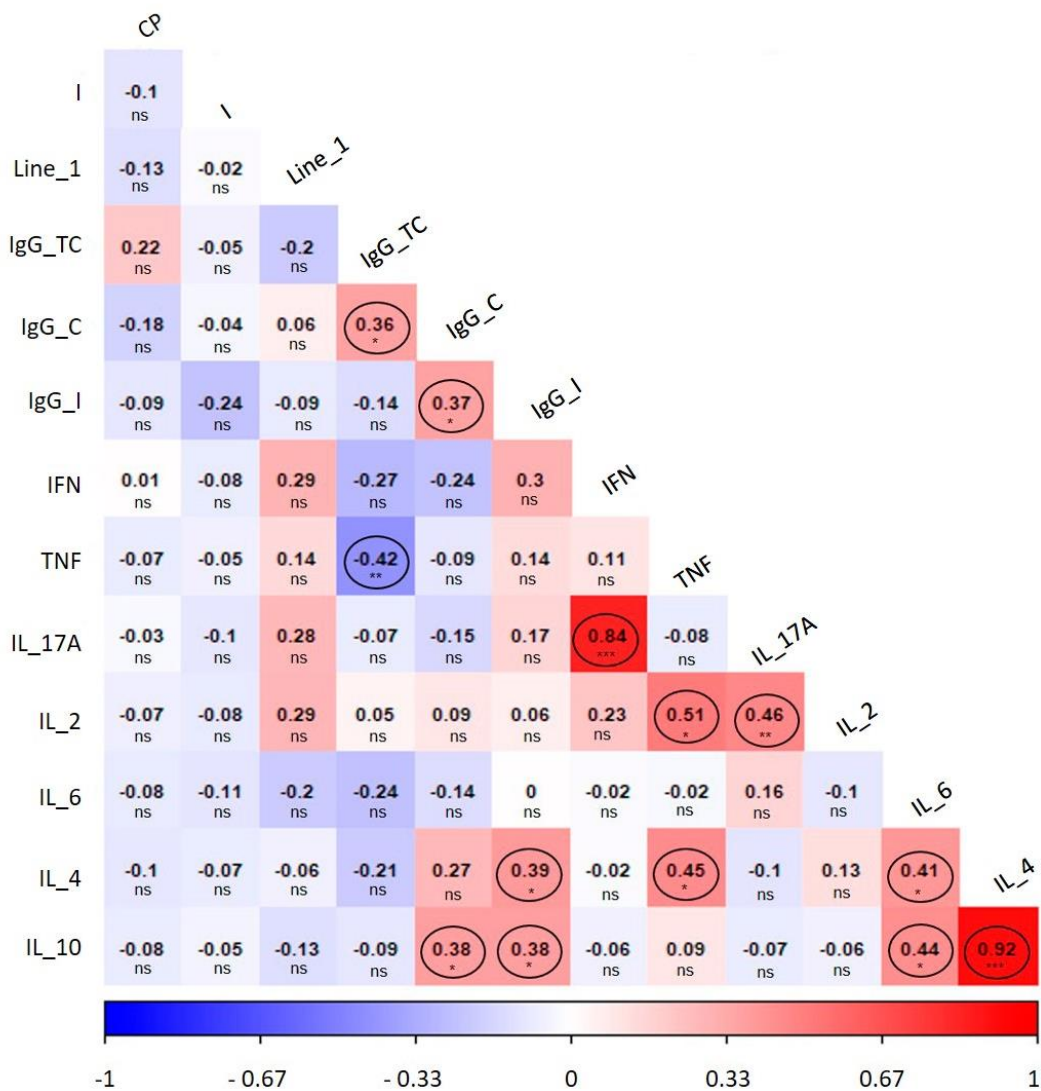
**Figura 14: Correlação entre parâmetros quantitativos avaliados nos pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas.** \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ . CP: quantificação de DNA nuclear; I: quantificação de integrações do kDNA no genoma do hospedeiro; LINE-11; IgG\_TC: Anticorpos IgG específicos para o *Trypanosoma cruzi*; IgG\_C: Autoanticorpos anti proteínas de células cardíacas; IgG\_I: Autoanticorpos anti proteínas de células intestinais; IL-17A: Interleucina 17A; IFN: Interferon  $\gamma$ ; TNF: Fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; IL-10: Interleucina 10; IL-6: Interleucina 6; IL-4: Interleucina 4; IL-2: Interleucina 2.

## 6.2. Análise de correlação dos fatores analisados em pacientes com forma cardíaca da doença de Chagas

A análise de correlação dos fatores analisados nos pacientes com a forma cardíaca (Figura 15) identificou que a maior produção de interleucinas pró inflamatórias se associava da seguinte forma, quanto maior a produção de

IFN- $\gamma$ , maior a produção de IL-17A ( $p < 0,001$ ). Esta última também teve correlação com a IL-2 ( $p < 0,01$ ). Houve relação da maior produção de IL-2 com TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) e o mesmo ocorreu entre a IL-6 e a IL-10 ( $p < 0,05$ ). A maior produção de autoanticorpos contra células cardíacas mostrou associação com o aumento de anticorpos específicos contra o *T. cruzi* ( $p < 0,05$ ), bem como a maior produção desses anticorpos associava-se à maior produção de anticorpos anti-proteínas de células intestinais ( $p < 0,05$ ).

Além disso, observamos que, juntamente com uma resposta imunintária mediada por citocinas pró-inflamatórias, estava ocorrendo um equilíbrio na resposta adaptativa com a produção citocinas anti-inflamatórias, onde a IL-4 se correlacionou com a maior produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 ( $p < 0,05$ ). Ainda, foi observado que a maior produção de IL-4 estava relacionada com maior produção de IL-10 ( $p < 0,001$ ), outra interleucina anti-inflamatória. Interessantemente, quanto maior a produção de autoanticorpos anti-proteínas de células intestinais, maior era a produção de IL-4 e IL-10 ( $p < 0,05$ ). Já em relação à produção de autoanticorpos anti-proteínas de células cardíacas, estes apresentaram relação com a produção de IL-10 ( $p < 0,05$ ). A produção de anticorpos específicos contra o *T. cruzi* mostrou correlação negativa com a produção de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ).



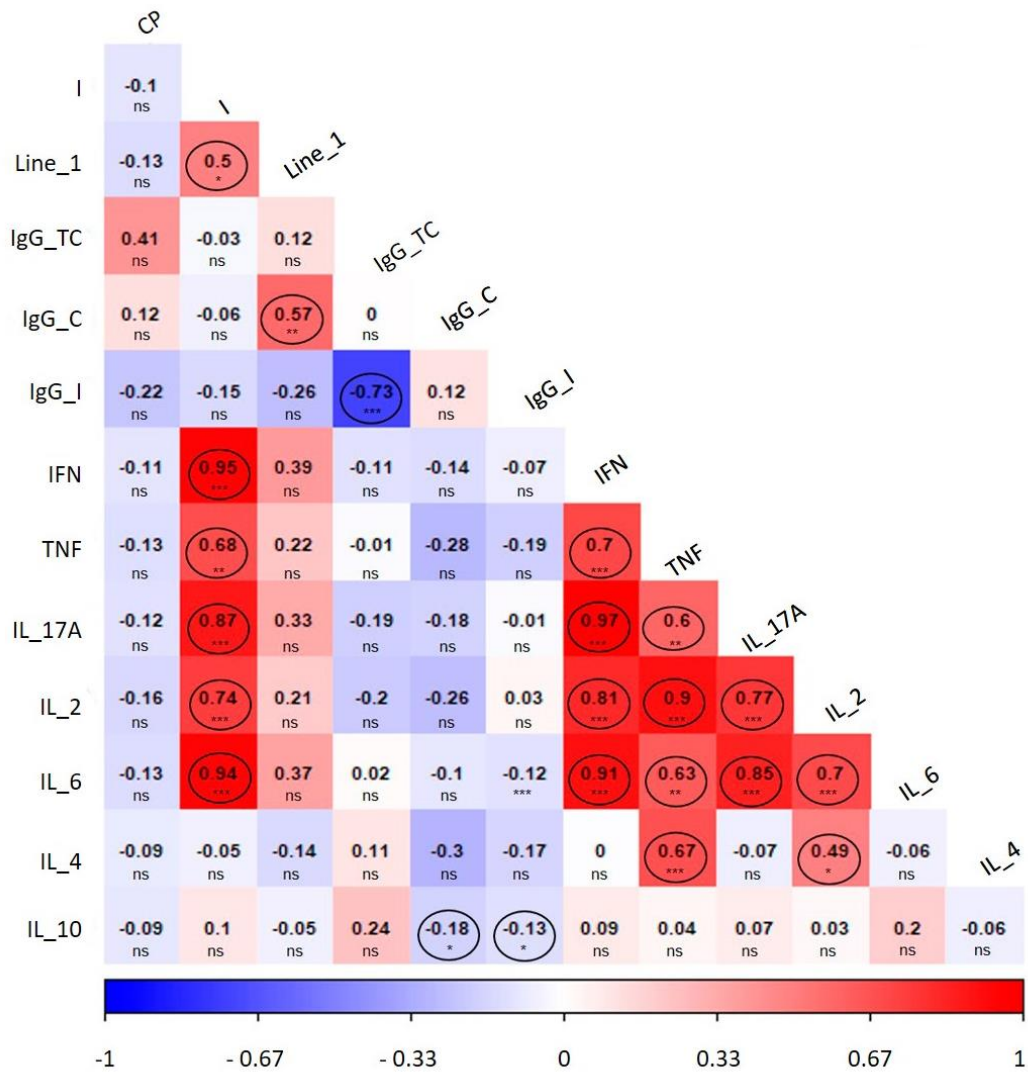
**Figura 15. Correlação entre parâmetros quantitativos avaliados nos pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas.** \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ . CP: quantificação de DNA nuclear; I: quantificação de integrações do kDNA no genoma do hospedeiro; LINE-1; IgG\_TC: Anticorpos IgG específicos para o *Trypanosoma cruzi*; IgG\_C: Autoanticorpos anti-proteínas de células cardíacas; IgG\_I: Autoanticorpos anti-proteínas de células intestinais; IL-17A: Interleucina 17A; IFN: Interferon  $\gamma$ ; TNF: Fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; IL-10: Interleucina 10; IL-6: Interleucina 6; IL-4: Interleucina 4; IL-2: Interleucina 2.

### **6.3. Análise de correlação dos fatores analisados nos pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas**

Na forma digestiva da DC, a análise de correlação (Figura 16) entre os valores numéricos dos parâmetros estudados demonstrou que quanto maior a produção de IL-17A, maior a produção de IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-2 ( $p < 0,001$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ). O mesmo ocorreu com a IL-2, que se relacionou a uma maior produção de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ( $p < 0,001$ ) e IL-6 ( $p < 0,01$ ). A maior produção de IL-6 também estava relacionada ao aumento da produção de IFN- $\gamma$  ( $p < 0,001$ ) e de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ), e, uma maior quantificação de TNF- $\alpha$ , estava associada ao aumento na quantidade de IFN- $\gamma$  produzido ( $p < 0,01$ ). Finalmente, a análise mostrou que o aumento da produção de IL-2 ( $p < 0,05$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ) foi relacionado ao aumento da produção da interleucina anti-inflamatória, IL-4.

Em relação à resposta imunitária humoral, foi observado que quanto maior a produção de anticorpos específicos para o *T. cruzi*, menor a produção de autoanticorpos contra proteínas de células intestinais ( $p < 0,001$ ). O mesmo foi observado entre a IL-10 e a produção de autoanticorpos contra proteínas de células intestinais e cardíacas ( $p < 0,05$ ).

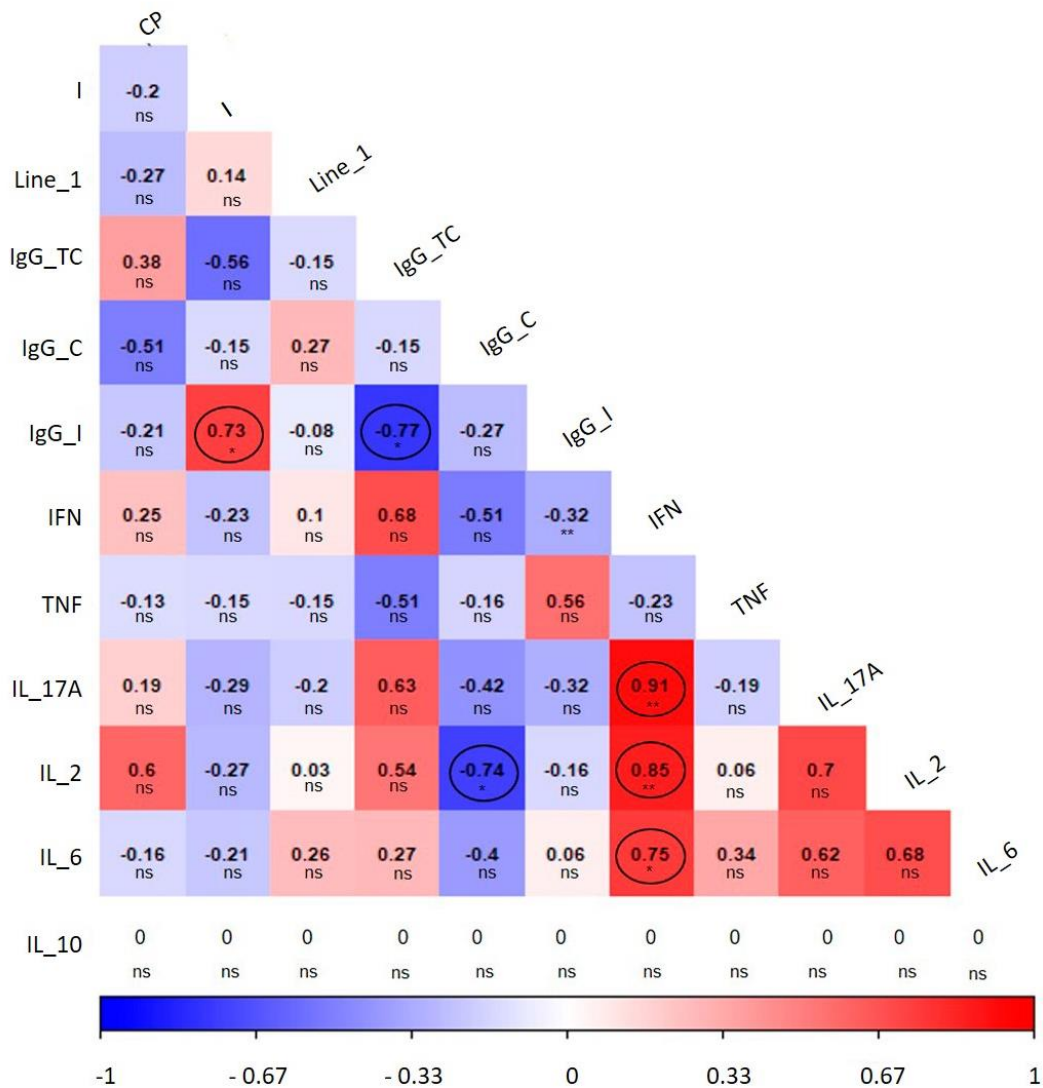
A quantidade de integrações de kDNA no genoma dos pacientes apresentou relação diretamente proporcional à quantidade LINE-1 ( $p < 0,05$ ) e a produção de IL-2, IL-6, IL-17A, IFN- $\gamma$  ( $p < 0,001$ ), e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ). A quantidade de LINE-1 no genoma dos hospedeiros se correlacionou positivamente com a produção de autoanticorpos anti-proteínas de células cardíacas ( $p < 0,01$ ).



**Figura 16. Correlação entre parâmetros quantitativos avaliados nos pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas.** \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ . CP: quantificação de DNA nuclear; I: quantificação de integrações do kDNA no genoma do hospedeiro; LINE-1; IgG\_TC: Anticorpos IgG específicos para o *Trypanosoma cruzi*; IgG\_C: Autoanticorpos anti-proteínas de células cardíacas; IgG\_I: Autoanticorpos anti-proteínas de células intestinais; IL-17A: Interleucina 17A; IFN: Interferon  $\gamma$ ; TNF: Fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; IL-10: Interleucina 10; IL-6: Interleucina 6; IL-4: Interleucina 4; IL-2: Interleucina 2.

#### **6.4. Análise de correlação dos fatores estudados em pacientes com a forma mista da doença de Chagas**

A análise de correlação dos valores quantitativos dos parâmetros estudados nos pacientes com a forma mista da infecção pelo *T. cruzi* (Figura 17) mostrou que quanto maior a produção de INF- $\gamma$ , maior a produção de interleucinas relacionadas a uma resposta pró-inflamatória: IL-2, IL17A ( $p < 0,01$ ) e IL-6 (0,05). Ademais, o aumento da produção de autoanticorpos contra proteínas de células cardíacas apresentou uma correlação negativa com a produção de IL-2 ( $p < 0,05$ ). De interesse, o aumento da produção de autoanticorpos contra proteínas de células intestinais, apresentou uma relação negativa à produção de autoanticorpos contra proteínas de células cardíacas ( $p < 0,05$ ) e com o aumento da quantidade de integrações de kDNA ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17. Correlação entre parâmetros quantitativos estudados nos pacientes com a forma mista da doença de Chagas.** \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ . CP: quantificação de DNA nuclear; I: quantificação de integrações do kDNA no genoma do hospedeiro; LINE-1; IgG\_TC: Anticorpos IgG específicos para o *Trypanosoma cruzi*; IgG\_C: Autoanticorpos anti-proteínas de células cardíacas; IgG\_I: Auto-anticorpos anti-proteínas de células intestinais; IL-17A: Interleucina 17A; IFN: Interferon  $\gamma$ ; TNF: Fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; IL-10: Interleucina 10; IL-6: Interleucina 6; IL-4: Interleucina 4; IL-2: Interleucina 2.

## VI. Discussão

A DC é um importante problema de saúde pública em países da América Latina e vem sendo extensivamente estudada por mais de 100 anos. Ainda que muito conhecimento tenha sido adquirido ao longo desse tempo, diversos aspectos de sua patogenia ainda não foram elucidados. Em especial, ainda não se sabe definir quais pacientes infectados pelo *T. cruzi* permanecerão assintomáticos e quais evoluirão para manifestações cardíacas e/ou digestivas (BONNEY *et al*, 2018).

Nas últimas décadas, várias hipóteses foram propostas para explicar o surgimento dos sintomas da DC (KIERSZENBAUM, 1999 ; ENGMAN E LEON, 2002 ; BILATE *et al.*, 2003; CUNHA-NETO *et al.*, 2006 , 2009 ; HYLAND E ENGMAN, 2006 ; MARIN-NETO *et al.*, 2007 ; BILATE E CUNHA-NETO, 2008 ; BONNEY E ENGMAN, 2008 , 2015 ; SCHARFSTEIN *et al.*, 2009 ; DE BONA *et al.*, 2018 ; BONNEY *et al.*, 2019; DE SOUZA-BASQUEIRA *et al.*, 2020; LIZARDO *et al.*, 2021), sendo as mais aceitas a teoria da persistência do parasito e a teoria da autoimunidade. Entretanto, nenhuma delas conseguiu esclarecer por completo como ocorre a progressão da doença, muito provavelmente por avaliarem os diferentes mecanismos da patogênese de maneira isolada, sem vislumbrar a complexa contribuição de diferentes fatores do parasito e do hospedeiro (BONNEY *et al.*, 2019). A esse respeito, a necessidade de se associar dois ou mais estímulos para que se inicie o efeito deletério à saúde é conhecida em várias doenças, como na asma e na miocardite autoimune (ROOT-BERNSTEIN E FAIRWEATHER., 2015; ROOT-BERNSTEIN E FAIRWEATHER., 2014; ROJAS *et al.*, 2018). Tais estímulos podem apresentar pesos distintos no surgimento das manifestações clínicas, sendo classificados como elementos primários ou secundários de patogenia.

Neste contexto, o presente trabalho vem se somar a artigos recentes (WESLEY *et al.*, 2019; SANTI-ROCCA *et al.*, 2019; SANTI-ROCCA *et al.*, 2017) que demonstram que a análise conjunta de aspectos relacionados ao *T. cruzi* e ao hospedeiro é de extrema importância para identificar aqueles que, em associação, contribuem para o desfecho da DC. Outrossim, vale ressaltar que os demais estudos foram realizados em modelo experimental, sendo este o



primeiro trabalho a realizar a análise multiparamétrica da patogênese da DC em humanos.

### **1. Persistência do parasito**

A hipótese de que a parasitemia teria um papel direto na manutenção da inflamação crônica e consequente surgimento de dano tecidual é o cerne da teoria da persistência do parasito (CRUZ *et al*, 2016, Teixeira *et al.*, 2011). Entretanto, contradiz-se a esse racional o fato de o surgimento de manifestações clínicas da fase crônica da infecção ocorrer no período em que observado declínio da carga parasitária (CHAO *et al.*, 2020). Em nosso estudo, analisamos a carga parasitária em amostras de sangue periférico de pacientes cronicamente infectados pelo *T. cruzi* e observamos que 134 das 176 (76,1%) amostras analisadas apresentaram carga parasitária indetectável pela qPCR, corroborando com o que é descrito na literatura (DUFFY *et al*; 2013; D'ÁVILA *et al*; 2018; OLIVEIRA *et al*; 2020).

Consistentemente com outros estudos (PIRON *et al*, 2007; QVARNSTROM *et al*, 2012; MUÑOZ *et al*, 2017; HERNÁNDEZ *et al*, 2017; MOREIRA *et al*, 2013; MELO *et al*, 2015), a análise estatística de nossos grupos demonstrou não haver diferença significativa entre a carga parasitária de pacientes com a forma indeterminada e pacientes com manifestações clínicas. É importante ressaltar, entretanto, que a quantificação de parasitos circulantes não reflete de maneira fidedigna o que é observado nos tecidos. Caldas *et al*, 2012, traçaram estratégias de PCR para quantificação do *T. cruzi* em amostras de sangue e tecidos de camundongos, nas fases aguda e crônica da infecção. Os autores observaram que na qPCR, durante a fase aguda, a quantidade de parasitos no sangue era maior do que no coração, já na fase crônica, os resultados demonstraram que o coração apresentava maior carga parasitária do que o sangue.

Em relação ao uso de Benznidazol, 66 dos 120 pacientes de nosso estudo realizaram o tratamento com o medicamento há pelo menos uma década, já no estágio crônico da infecção. Ao compararmos a carga parasitária dos pacientes tratados e não tratados nos diferentes grupos, não observamos diferença estatística, o que corrobora com o ensaio clínico multicêntrico

“Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis” (BENEFIT), que demonstrou não haver melhorias clínicas em indivíduos com problemas cardíacos já estabelecidos (Morillo *et al*, 2015). Isso sugere que, apesar de não existir DC sem a presença do parasito, este não teria um papel primário na patogênese da doença, o que é reforçado pelo fato de a carga parasitária não se correlacionar com nenhum outro aspecto avaliado em nosso estudo, exceto a produção de IgG contra o próprio *T. cruzi*.

## **2. Integração do kDNA e mobilização de LINE-1**

Dentre os mecanismos sugeridos para explicar a resposta autoimune da DC, a teoria da integração do kDNA do parasito no genoma do hospedeiro tem sido sustentada por evidências experimentais usando diferentes metodologias, como FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), Southern blotting genômico (TEIXEIRA *et al*, 1991, 1994; SIMÕES-BARBOSA *et al*, 2006), PCR e suas variações (HECHT *et al*, 2010, GUIMARO *et al*, 2012). Interessantemente, a integração do kDNA já foi demonstrada em coelhos, camundongos, galinhas e humanos (NITZ *et al*, 2004; HECHT *et al*, 2010; TEIXEIRA *et al*, 2011; GUIMARO *et al*, 2014), sugerindo que tal fenômeno tenha um caráter universal nas infecções pelo *T. cruzi*. A esse respeito, Wesley *et al*. (2019) propõem que a transferência do kDNA do *T. cruzi* para o genoma da célula-alvo seja um mecanismo adaptativo à invasão e sobrevivência do parasito nas células hospedeiras.

Em nosso estudo, a análise das integrações do kDNA nos diferentes grupos identificou quantidades significativamente maiores no grupo de pacientes indeterminados em relação aos pacientes com as apresentações cardíacas e mistas. Tal achado poderia indicar um papel irrisório da transferência do kDNA na patogênese da DC. Entretanto, não podem ser ignoradas as pesquisas realizadas em modelos não permissivos à infecção do *T. cruzi* (aves congênicas) que demonstraram que, mesmo na ausência do parasito, os animais que continham as integrações de kDNA em seu genoma desenvolviam uma cardiomiopatia similar à de pacientes com DC (TEIXEIRA *et al*, 2011, 2012). Desta forma, é possível que, não o acúmulo de sequências de kDNA integradas, mas principalmente o sítio de inserção no genoma, tenha

uma maior influência no surgimento das manifestações clínicas. Em consonância com isto, sabe-se que a transferência horizontal de DNA para sítios específicos é crucial no desenvolvimento, emergência e recorrência de várias doenças, como câncer, doenças genéticas, metabólicas e neurodegenerativas (EMAMALIPOUR *et al.*, 2020).

Ademais, a análise individualizada desse fenômeno parece ser muito simplória para ajudar na compreensão da patogênese da DC, visto que uma série de correlações com os demais parâmetros investigados neste estudo puderam ser identificadas, principalmente em relação à produção de citocinas, sugerindo que a integração pode estar atuando na modulação do perfil Th1/Th2 dos pacientes com DC.

Considerando que as sequências de kDNA integram-se preferencialmente em retrotransposons LINE-1 (HECHT *et al.*, 2010), elementos móveis que correspondem a 17% do genoma humano e cuja mobilização está associada ao surgimento de diversas doenças, como hemofilia e câncer (PAÇO *et al.*, 2015; LANDER *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2020), nós também realizamos a quantificação desses elementos no genoma dos pacientes dos diferentes grupos, não sendo possível identificar diferenças significativas entre eles. Entretanto, ao se observar sua correlação com os demais parâmetros, verificamos que, em pacientes sintomáticos, o aumento de L1 parece contribuir para o quadro de autoimunidade, associando-se a um aumento de autoanticorpos contra antígenos cardíacos, IFN- $\gamma$  e IL-6. A esse respeito, a desregulação do funcionamento de L1 também já foi associada, por exemplo, à geração de anticorpos contra componentes nucleares próprios, mediada pela via de IFN- $\gamma$ , em pacientes com lúpus (KELLY *et al.*, 2018).

Outro achado interessante é que, em pacientes com a forma indeterminada da DC, uma maior quantidade de LINE-1 se correlacionou, de maneira inversamente proporcional, à produção autoanticorpos contra antígenos intestinais e não houve associação com a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Visto que é neste grupo de pacientes que encontramos uma maior quantidade de integrações de kDNA, é possível que, inicialmente, a inserção do kDNA em retroelementos L1 altere sua atividade, tornando o

ambiente celular mais propício ao parasito. Isto ajudaria a explicar por que o intestino é um dos principais reservatórios do *T. cruzi* no organismo (LEWIS *et al.*, 2014; SILBERSTEIN *et al.*, 2018).

### 3. Resposta Imunitária

Após a infecção, o *T. cruzi* induz uma resposta imunitária inata e adaptativa em seu hospedeiro, a qual desempenha um papel importante durante as fases aguda e crônica da doença. Essa resposta, entretanto, não é suficiente para eliminação total do parasito, fato explicado pelo extenso processo de coevolução entre o parasito e seu hospedeiro, o qual possibilitou que o *T. cruzi* desenvolvesse vários mecanismos de escape, visando se manter no organismo sem causar grandes danos ao hospedeiro (ACEVEDO *et al.*, 2018).

Em nosso estudo, realizamos a dosagem de alguns marcadores de interesse da resposta imune inata e adaptativa. Ao compararmos os diversos grupos de pacientes infectados com o grupo de pacientes não infectados, observamos baixas concentrações de secreção de citocinas, o que demonstra que a produção exacerbada não seria o fator determinante na patogênese da DC, como já sugerido na teoria de ativação *bystander* (GINORÉS *et al.*, 2005).

Ainda assim, foi possível se notar um perfil distinto de produção de citocinas para cada conjunto de pacientes analisado, apesar de poucas diferenças estatísticas terem sido identificadas entre os grupos (IL-2: grupo indeterminado versus misto,  $p < 0,05$ ; TNF- $\alpha$ , grupo digestivo versus indeterminado,  $p < 0,05$ ). Interessantemente, pacientes com a forma indeterminada da DC produzem menores quantidades da maioria das citocinas avaliadas, seja Th1, Th2 ou Th17, o que corrobora com os achados de Llaguno *et al.*, 2019, que sugerem que pacientes assintomáticos com DC crônica apresentam uma proporção mais equilibrada de citocinas pró- e anti-inflamatórias. Tais resultados demonstram que, nesta fase da doença, o sistema imune parece não reconhecer o parasito como algo a ser combatido e, como consequência, isto acaba por amenizar as respostas autoimunes.

Em contrapartida, observamos uma maior produção de citocinas, especialmente das pró-inflamatórias, em pacientes com a forma digestiva da

DC. De maneira similar aos nossos dados, Ribeiro *et al.*, 2008, verificaram que a produção basal de IFN- $\gamma$  era maior na forma digestiva quando comparada com a forma indeterminada da DC. Assim, os autores sugerem que indivíduos com a forma digestiva da DC não sofrem supressão imunológica para conter a resposta Th1 e isso favorece uma resposta inflamatória que pode contribuir para as lesões mioentéricas.

Fato é que a definição de um perfil de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em pacientes com diferentes formas clínicas da DC é bastante controverso. Trabalhos anteriores demonstram que formas cardíacas apresentam concentrações mais elevadas de IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  associadas a concentrações mais baixas de IL-4 ou IL-10, enquanto concentrações elevadas de IL-10 associadas a concentrações moderadas de IFN- $\gamma$  eram observados na forma indeterminada (CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2003; WESLEY *et al.*, 2019), diferindo dos resultados de nosso estudo. Outros trabalhos apresentam correlações opostas entre a gravidade da doença e a baixa produção de citocinas pró-inflamatórias (LAUCELLA *et al.*, 2004). Corroborando com nossos resultados, Ward *et al.*, 1999, não observaram diferença na produção de citocinas entre pacientes com diferentes formas da infecção.

O assunto torna-se mais peculiar ao analisarmos a correlação das citocinas entre si e com os demais parâmetros investigados neste estudo. Em pacientes com a forma indeterminada da DC, observamos uma forte associação entre INF- $\gamma$ , IL-17 e IL-2, sugerindo a participação de uma resposta pró-inflamatória. Igualmente, uma correlação robusta é observada entre IL-10 e IL-6. A esse respeito, sabe-se que o equilíbrio entre essas duas citocinas serve como marcador para se estabelecer o equilíbrio da resposta Th1/Th2, indicando se o organismo está preparado para combater o patógeno, ao mesmo tempo em que evita a exacerbação da resposta pró-inflamatória (MOCELIN *et al.*, 2005; MARIN-NETO *et al.*, 2007).

Já na análise de correlação em pacientes sintomáticos, as correlações de maior robustez foram verificadas entre as citocinas do perfil Th1, indicando um nítido perfil pró-inflamatório nesses pacientes. De interesse, não se

verificou correlação de IL-10 com nenhuma citocina do perfil Th1, apenas com IL-4, demonstrando que não está havendo um controle adequado das respostas pró-inflamatórias. Em conjunto, tais dados ajudam a explicar o surgimento de respostas autoimunes (YUSOFF *et al.*, 2019; MAHLANGU *et al.*, 2020).

Destrinchando o perfil de citocinas de acordo com a apresentação clínica, torna-se evidente a distinção entre as correlações estabelecidas em cada grupo. Em pacientes com DC cardíaca, é observada uma correlação altamente significativa entre INF- $\gamma$  e IL-17. A associação entre essas citocinas já foi estabelecida como fonte primária de dano tecidual em outras patologias, como na cirrose causada pelo vírus da hepatite B (CHEN *et al.*, 2013; GUEDES *et al.*, 2012). Destaca-se também o fato de que, nesses pacientes, as citocinas anti-inflamatórias estão correlacionadas apenas entre elas, sem associação com nenhuma citocina pró-inflamatória. Novamente, isso indica que IL-10 e IL-4 estão atuando pouco para o controle do processo inflamatório.

Pacientes com a forma digestiva da DC apresentam uma gama de associações entre as citocinas do perfil Th1 e nenhuma correlação é observada para IL-10 e IL-4, que apenas se associa, de maneira positiva, a TNF- $\alpha$ . Esta última correlação poderia ser considerada inesperada, visto que IL-4 é capaz de suprimir a expressão do mRNA de TNF- $\alpha$  (ESSNER *et al.*, 1989; WOODWARD *et al.*, 2010). Entretanto, ela pode indicar que à medida que o organismo tenta combater o patógeno com a secreção de TNF- $\alpha$ , mais IL-4 é produzida para contrabalancear a resposta inflamatória. Ainda assim, neste cenário, continuamos observando a pouca participação de citocinas anti-inflamatórias, porém, num ambiente onde a interação de citocinas pró-inflamatórias está muito mais acentuada.

Finalmente, ao avaliarmos os pacientes com apresentação mista da DC, verificamos uma ausência de correlação com citocinas anti-inflamatórias, fato que se torna mais crítico ao verificarmos a não produção de IL-4 pelos pacientes deste grupo. Ademais, nota-se que as principais correlações foram estabelecidas com o INF- $\gamma$  (com IL-17, IL-2 e IL-6), uma citocina sintetizada por células NK ou linfócitos T ativados e que está profundamente relacionada com

o desenvolvimento de várias doenças autoimunes, como lúpus, artrite reumatoide, diabetes mellitus (VAKALOGLOU *et al.*, 2011; NORDMARK *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2020). PEREIRA *et al.* (2018) notaram uma maior expressão de INF- $\gamma$  em pacientes com a forma mista da DC em comparação com aqueles da forma indeterminada, as alterações fisiopatológicas do sistema digestivo durante o curso da infecção pelo *T. cruzi* resultam na destruição do sistema nervoso entérico. O processo inflamatório ao redor dos neurônios leva a degeneração, reduzindo o número de células nervosas e levando ao desenvolvimento de megacólon e megaesôfago.

#### **4. Resposta Imunitária Humoral**

Dosagens produção de anticorpos do tipo IgG específicos contra o *T. cruzi* realizada por testes sorológicos já estão bem fundamentadas na DC (KELLY *et al.*, 2021). Em nosso estudo, os resultados do ELISA comprovam e evidenciam que esses pacientes já tiveram contato com o parasito e que não existem diferenças estatísticas entre os títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* produzidos pelos pacientes dos diferentes grupos, o que foi semelhante a estudos anteriores (NUNES *et al.*, 2013; NORMAN *et al.*, 2019). Tais achados sugerem que a reação cruzada de anticorpos produzidos contra o parasito não parece representar um mecanismo primário de indução da patogênese da DC, como sugerido pelas teorias de mimetismo molecular.

Ineditamente, também realizamos o teste de ELISA para dosagem de autoanticorpos contra proteínas de cardiomiócitos e proteínas de CACO-2. Nossos resultados demonstraram que, independentemente da apresentação clínica, detectou-se a produção de autoanticorpos cardíacos e intestinais em todos os pacientes, sem diferenças estatísticas entre os grupos. Desta forma, é possível que nossos dados estejam refletindo um processo basal de autoimunidade, que é sugerido por alguns autores, no qual os autoanticorpos podem se acumular em tecidos intestinais e cardíacos lesados, provendo uma limpeza das células deterioradas. Assim, a resposta autoimune detectada pode estar associada tanto à lesão tecidual, como à reparação do tecido (WESLEY *et al.*, 2019; NAHRENDORF *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2012; NUNES-SILVA *et al.*, 2017). É importante ressaltar que, por utilizarmos como alvo o extrato de

proteínas totais das células cardíacas e intestinais, não foi possível estabelecer qual o antígeno causador da reação.

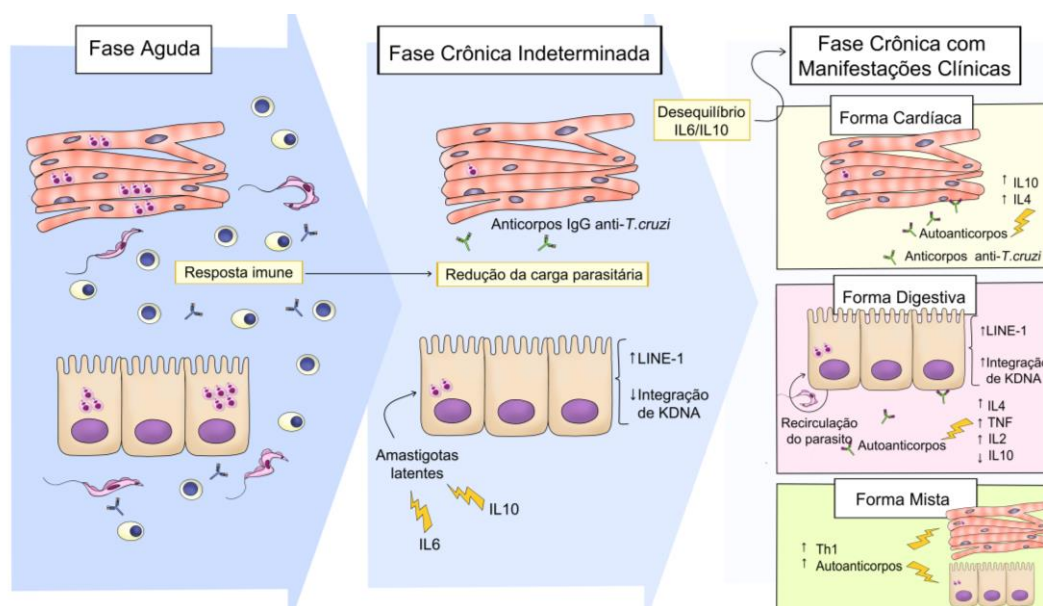
Como esperado, a análise de correlação demonstrou que o aumento da carga parasitária se associa com o aumento de anticorpos específicos contra o *T. cruzi* (Wesley *et al*, 2019). Em pacientes sintomáticos, uma relação inversamente proporcional foi observada entre os níveis de IgGs contra o parasito e contra os autoantígenos intestinais, mecanismo que pode contribuir para a migração do *T. cruzi* para o intestino, como sugerido por (Wesley *et al*, 2019). Este aspecto também foi identificado quando analisamos os grupos de pacientes com as formas digestiva e mista da DC, indicando que o aumento dos níveis de anticorpos contra o *T. cruzi*, resultante do aumento da quantidade de parasito circulante, pode favorecer a permanência do parasito no intestino, visto que esse órgão está sendo pouco atacado por autoanticorpos. O acúmulo dos parasitos no intestino, no entanto, contribuiria para o comprometimento do órgão.

Já em pacientes com a forma cardíaca da DC, há correlação positiva entre a produção de autoanticorpos contra antígenos cardíacos e a produção de IgG contra o *T. cruzi*, sugerindo a existência de um mecanismo de autoimunidade mediado por mimetismo molecular. CUNHA-NETO *et al* (2008) propôs o mimetismo molecular entre a miosina cardíaca e a proteína B13 do *T. cruzi*.

## **5. Visão integradora da patogênese da doença de Chagas**

A partir da visão de que a patogênese da DC é o resultado da interação de diferentes fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro, nós realizamos, no presente estudo, uma análise de correlação para tentar compreender como os diversos elementos envolvidos neste processo interagem entre si e contribuem para o surgimento das manifestações cardíacas e/ou digestivas da DC (Figura 18).





**Figura 18. Visão integradora da patogênese da doença de chagas.** Durante a fase aguda da DC, o *T. cruzi* invade e se replica no interior das células hospedeiras, provocando resposta imuni. Apesar disso, o parasita não é completamente eliminado e persiste indefinidamente nos tecidos do hospedeiro em estado dormente. Durante vários ciclos intracelulares de reprodução, o *T. cruzi* libera sequências de kDNA que se integram aos elementos LINE-1 no genoma do hospedeiro. Após o desenvolvimento da imunidade adquirida, a parasitemia diminui substancialmente e a maioria dos pacientes permanece assintomática, ou seja, na forma indeterminada da doença, estabelecendo um equilíbrio entre as respostas imunes Th1 e Th2. Amastigotas latentes contribuem para a diminuição da liberação de Il-6 e IL-10, reduzindo a resposta pró-inflamatória e possivelmente levando a um aumento na atividade do LINE-1, além de um declínio na quantidade de eventos de integração de kDNA. No entanto, o aumento da relação IL-6 / IL-10 leva à piora dos sintomas. A resposta inflamatória é predominante em pacientes com manifestações cardíacas, com aumento da liberação de IL-10 e IL-4. A produção de anticorpos específicos ao *T. cruzi* se correlaciona com o aumento de autoanticorpos. Em pacientes com distúrbios digestivos, os níveis de citocinas pró-inflamatórias também estão aumentados, assim como os autoanticorpos, mas nenhuma correlação entre IL-6 e IL-10 pode ser observada. O reservatório do parasita no intestino pode facilitar a ocorrência de eventos de integração de kDNA e mobilização do LINE-1. Resposta inflamatória exacerbada notável é observada em pacientes com a forma mista devido à predominância do perfil de citocinas Th1. A ausência de citocinas imunossupressoras está relacionada à produção de autoanticorpos, que podem provocar a reação autoimune que leva à lesão tecidual.

Ao longo do processo de cronificação, verifica-se uma importante redução da carga parasitária, fato comum a pacientes assintomáticos e sintomáticos da DC e que está associado à resposta imunitária desencadeada contra o *T. cruzi*, desde a fase aguda da infecção (EGUEZ *et al*, 2017). Assim,

visando se proteger da destruição mediada pelos componentes da resposta imunitária, muitos parasitos adentram e se estabelecem nos tecidos. Durante este processo, o *T. cruzi* é capaz de modular a atividade de retroelementos LINE -1 (ROSE *et al*, 2020) e integrar os minicírculos de kDNA no genoma do hospedeiro (HECHT *et al*, 2010).

Imediatamente após a fase aguda, os indivíduos entram na fase crônica da doença, denominada forma indeterminada, período em que ocorre o declínio da parasitemia plasmática e surgimento de anticorpos específicos contra o parasito, na ausência de sintomas. Neste momento, é possível se verificar uma migração preferencial dos parasitos para o intestino (LEWIS E KELLY, 2017), fato que pode ser explicado pela menor produção de autoanticorpos contra proteínas intestinais, e que está associado ao aumento da atividade de LINE-1, porém sem correlação com a integração do kDNA. De interesse, no intestino, é possível se observar a presença de ninhos de amastigota não replicativos, isto é, latentes (SÁNCHEZ-VALDÉZ & PADILLA, 2019; SÁNCHEZ-VALDÉZ *et al.*, 2018). Tal latência pode ser promovida pela forte correlação observada entre as citocinas IL-6 e IL-10, tendo como consequência uma baixa produção de citocinas pró-inflamatórias e a ausência de correlação com autoanticorpos.

Assim, o rompimento do equilíbrio IL-6/IL-10 poderia levar ao surgimento das manifestações clínicas da DC. Em pacientes com a apresentação cardíaca, a significância estatística da correlação IL-6/IL-10 diminuiu, ao mesmo tempo que se observou um aumento de produção de IL-10, causando também o aumento dos níveis de IL-4. Em conjunto, IL-10 e IL-4 diminuem a resistência do organismo ao *T. cruzi* (OLIVEIRA *et al.*, 1996), o que poderia contribuir para a saída dos parasitos do seu estado de dormência e sua recirculação por órgãos e tecidos. Ao mesmo tempo, maiores quantidades de IL-4 e IL-10 resultarão na ativação de linfócitos B e contribuirão para produção de anticorpos (OLIVEIRA *et al.*, 2011). De interesse, a produção de IgGs contra o parasito está associada à produção de autoanticorpos cardíacos, o que também foi influenciado pela secreção de IL-10, sugerindo um cenário de retroalimentação positiva. Ressalta-se o fato de que IL-4 e IL-10 também se correlacionaram com a produção de autoanticorpos intestinais, porém a ausência de lesão no órgão pode ser explicada pela falta de correlação com

anticorpos contra o *T. cruzi*. Desta forma, os autoanticorpos intestinais teriam um papel protetivo, ajudando no reparo das lesões (NAHRENDORF *et al.*, 2007; ROOT-BERNSTEIN E FAIRWEATHER, 2015; WESLEY *et al.*, 2019)

No grupo de pacientes com apresentação digestiva, não verificamos correlação entre IL-6 e IL-10. O papel do intestino como reservatório do parasito parece facilitar a ocorrência de eventos de integração de kDNA e mobilização de LINE-1. Essa alteração genômica se correlacionou fortemente com a produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais se retroalimentam. O papel de IL-4 na inibição de INF- $\gamma$  (CHENG HO E MIAW, 2016), como tentativa de controlar o processo inflamatório, parece estar anulado por sua correlação com TNF- $\alpha$  e IL-2. Como consequência da secreção de IL-4, ocorre uma inibição da síntese de IL-10, associando-se a um aumento de autoanticorpos contra proteínas do intestino e do coração. Entretanto, é possível que tais anticorpos desempenhem apenas papel de proteção (WESLEY *et al.*, 2019).

A ausência de correlação entre IL-6 e IL-10 também foi um fator marcante em pacientes com a forma mista da DC. Curiosamente, as correlações sugeridas para explicar o comprometimento cardíaco ou intestinal dos outros grupos não foram verificadas nesse grupo. Notou-se a prevalência de um perfil de citocinas Th1, com retroalimentação positiva, sem contribuição de citocinas do perfil Th2 para controle do quadro pró-inflamatório. A ausência das citocinas imunossupressoras IL-4 e IL-10 podem fazer com que os autoanticorpos, que em outras situações desempenhavam um papel protetivo, passem a desempenhar um papel patológico, gerando autoimunidade (SOUZA *et al.*, 2010; SKAPENKO *et al.*, 2004)

## VII. Conclusões

- Não houve relação entre a carga parasitária e o surgimento das manifestações clínicas da DC;
- O tratamento não influenciou na melhora clínica dos pacientes;
- O acúmulo de integrações do kDNA e as grandes quantidade de retroelementos LINE-1 no genoma dos pacientes não mostrou relação com agravamento dos sintomas;

- O aumento de integrações do kDNA se correlacionou de maneira positiva com a citocinas da resposta imunitária Th1/Th2;
- Em pacientes sintomáticos a quantidade de LINE-1 se correlacionou com o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e autoanticorpos contra proteínas do coração, sugerindo um possível envolvimento com os processos de autoimunidade.
- Em pacientes assintomáticos houve correlação inversa com uma maior quantidade de LINE-1 e com autoanticorpos contra proteínas do intestino. Entretanto, não houve correlação com citocinas pró-inflamatórias, o que poderia favorecer o estado de dormência do parasito.
- Pacientes com as diferentes formas da DC apresentam baixos níveis de produção de citocinas, sugerindo que a resposta imunitária exacerbada não seria fator determinante na gênese da doença.
- A produção de citocinas pró e anti-inflamatórias apresenta-se de forma equilibrada na forma indeterminada da infecção;
- A produção de anticorpos específicos contra o *T. cruzi* foi verificada em todos os grupos, confirmando a ativação da resposta imunitária humoral contra o parasito, porém não foi correlacionada com a gravidade dos sintomas;
- A detecção de autoanticorpos contra antígenos de coração e intestino em todos os pacientes, independente da apresentação clínica, sugere a participação de um mecanismo basal de autoimunidade.

## VIII. Perspectivas

Diante da proposta da visão integradora da patogênese da doença de Chagas, alguns aspectos precisam ser melhor analisados, como:

1. Estabelecer os fatores que rompem o equilíbrio entre as citocinas;
2. Estudar a importância do *background* genético do hospedeiro na progressão da doença;
3. Compreender melhor o papel da transferência de minicírculos de kDNA para o genoma do hospedeiro na infecção pelo *T. cruzi*;

4. Determinar se o sítio de integração do kDNA está associado às alterações de funcionamento das células do sistema imune, e consequentemente, se influencia nas manifestações clínicas;
5. Compreender por que o longo período de infecção é um fator determinante para o desenvolvimento da doença.

## IX. Referências

- Abras, A., Gállego, M., Llovet, T., Tebar, S., Herrero, M., Berenguer, P., *et al.* (2016). Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is It Time for a Change? *J Clin Microbiol.* 54(6):1566-1572. doi: 10.1128/JCM.00142-16.
- Acevedo, G.R., Girard, M.C., Gómez, K.A. (2018). The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Front Immunol.* 9: 1929. doi: 10.3389/fimmu.2018.01929
- Albajar-Viñas, P., Jannin. (2011). The hidden Chagas disease in Europe. *Euro Surveill* 16: 1-2.
- Albert, L. J., Inman, R. D. (1999). Molecular Mimicry and Autoimmunity. *The new England journal of Medicine.* 341:2068-2074.
- Álvarez, J.M., Fonseca, R., Silva, H.B., Marinho, C.R.F., Bortoluci, K.R., Sardinha, L.R., Epiphanyo, S., Lima, M.R.D. (2014). Chagas Disease: Still Many Unsolved Issues. *Mediators Inflamm.* 2014:912965. doi: 10.1155/2014/912965. Epub 2014 Jun 29.
- Andrade, D.V., Gollob, K.J., Dutra, W.O. (2014). Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 31;8(7):e3010. doi: 10.1371/journal.pntd.0003010.
- Andrade, J. P., Marin-neto, J. A., Paola, A. A., Vilas-boas, F., Oliveira, G. M., Bacal, F, *et al.* (2011). I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol*, 97(2 Suppl 3):1-48.
- Andrade, Z.A., Silva, H.R. (1995). Parasitismo de adipócitos por *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 90: 521–522.
- Aragão, M.M.B. Herança e fixação de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de chagásicos e seus familiares. (2013). Dissertação de mestrado patologia molecular, Universidade de Brasília.
- Balouz, V., Agüero, F., Buscaglia, C.A. (2017). Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. *Adv Parasitol.* 97:1-45. doi: 10.1016/bs.apar.2016.10.001.
- Barbosa, M.P.T., Carmo, A.A.L., Rocha, M.O.C., Ribeiro, A.L.P. ( 2015). Ventricular Arrhythmias in Chagas Disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 48(1):4-10. doi: 10.1590/0037-8682-0003-2014.
- Barnabé, C., De Meeûs, T., Noireau, F., Bosseno, M.F., Monje, E.M., Renaud, F, *et al.* (2011). *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs): microsatellite loci and population genetics of DTUs TcV and TcI in Bolivia and Peru. *Infect Genet Evol.* 11:1752–1760. doi: 10.1016/j.meegid.2011.07.011.

- Bern, C., Montgomery, S.P. (2009). An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 1;49(5):e52-4. doi: 10.1086/605091.
- Bilate, A. M. B., and Cunha-Neto, E. (2008). Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev. Inst. Med. Trop.* 50, 67–74. doi: 10.1590/S0036-46652008000200001
- Bonney, K. M., Gifford, K.M., Taylor, J.M., Chen, C., Engman, D.M. (2013). Cardiac damage induced by immunization with heat-killed *Trypanosoma cruzi* is not antibody mediated. *Parasite Immunology*, v. 35, n. 1, p. 1–10.
- Bonney, K.; Engman, D. (2008). Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many? *Current Molecular Medicine.* 8(6): 510–518.
- Bonney, K.M., Engman, D.M. (2015). Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. *Am J Pathol.* 185(6):1537-47. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.12.023.
- Bonney, K.M., Luthringer, D.J., Kim, S.A., Garg, N.J., Engman, D.M. (2019). Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annu Rev Pathol.* 24;14:421-447. doi: 10.1146/annurev-pathol-020117-043711. Epub 2018 Oct 24.
- Botero, A., Kapeller, I., Cooper, C., Clode, P.L., Shlomai, J., Thompson, R.C.A. (2018). The kinetoplast DNA of the Australian trypanosome, *Trypanosoma copemani*, shares features with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma lewisi*. *Int J Parasitol.* 48(9-10):691-700. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.02.006.
- Brenière, S. F., Waleckx, E., Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand *Trypanosoma Cruzi* Strains Classified Into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis.* 29;10(8):e0004792.
- Brito, B.O.F., Ribeiro, A.L.P. (2018). Electrocardiogram in Chagas Disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 51(5):570-577. doi: 10.1590/0037-8682-0184-2018.
- Callahan, K. E., Hickman, A. B., Jones, C. E., Ghirlando, R., Furano, A. V. (2012). Polymerization and nucleic acid-binding properties of human L1 ORF1 protein. *Nucleic Acids Research.* 40 (2).
- Cardillo, F., Pinho, R.T., Antas, P.R.Z. (2015). Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Pathog Dis.* 73(9): ftv082. doi: 10.1093/femspd/ftv082
- Chen, H., Zhang, D., Wang, S., Wang, X., Yang, C. (2013). Significance of correlation between interferon- $\gamma$  and soluble intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-17 in hepatitis B virus-related cirrhosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 37(6):608-13. doi: 10.1016/j.clinre.2013.05.010. ub 2013 Jun 21.
- Connors, E.E., Ordoñez, L.T., Cordon-Rosales, C., Casanueva, C.F., Miranda, S.M., Brouwer, K.C. (2017). Chagas Disease Infection Among Migrants at the Mexico/Guatemala Border. *Am J Trop Med Hyg.* 97(4):1134-1140. doi: 10.4269/ajtmh.16-0777. Epub 2017 Oct 10.

Correa-Oliveira, R., Gomes, J., Lemos, E.M., Cardoso, G.M., Reis, D.D., Adad, S., *et al.* (1999). The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 Suppl 1; 253-5.

Cossio, P.M., Laguens, R.P., Diez, C., Szarfman, A., Segal, A., Arana, R.M. (1974). Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation*. 50(6):1252-9. doi: 10.1161/01.cir.50.6.1252.

Costa, G.C., da Costa Rocha, M.O., Moreira, P.R., Menezes, C.A., Silva, M.R., *et al.* (2009). Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis* 199: 451–454.

Coura, J.R. (2015). The Main Sceneries of Chagas Disease Transmission. The Vectors, Blood and Oral Transmissions--A Comprehensive Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110(3):277-82. doi: 10.1590/0074-0276140362.

Coura, J.R., Viñas, P.A., Junqueira, A.C.V. (2014). Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 109(7): 856-862

Cruz, J. S., Santos-Miranda, A., Sales-Junior, P. A., Monti-Rocha, R., Campos, P. P., Machado, F. S., *et al.* (2016). Altered cardiomyocyte function and *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 1028–1033. doi: 10.4269/ajtmh.15-0255

Cunha-Neto, E., Nogueira, L. G., Teixeira, P. C., Ramasawmy, R., Drigo, S. A., Goldberg, A. C., *et al.* (2009). Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(Suppl. 1), 252–258. doi: 10.1590/s0074-02762009000900032

Cunha-Neto, E; Coelho, V., Guilherme, L., Fiorelli, A., Stolf, N., Kalil, J. (1996). Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest*, 5;98(8):1709-12.

Daliry, A., Pires, M.Q., Silva, C.F., Pacheco, R.S., Munde, M., Stephens, C.E., *et al.* (2011). The trypanocidal activity of amidine compounds does not correlate with their binding affinity to *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(10):4765-73. doi: 10.1128/AAC.00229-11. Epub 2011 Aug 1.

Daniela A Bermejo, D.A.B., Amezcua-Vesely, M.C., Montes, C.L., Merino, M.C., Gehrau, R.C., Cejas, H., Acosta-Rodríguez, E.V., Gruppi, A. (2010). BAFF mediates splenic B cell response and antibody production in experimental Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 4;4(5):e679. doi: 10.1371/journal.pntd.0000679.

Dario, M.A., Rodrigues, M.S., Barros, J.H.D., Xavier, S.C.C., D'Andrea, P.S., Roque, A.L.R., Jansen, A.M. (2016). Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case



transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasit Vectors*. 31;9(1):477. doi: 10.1186/s13071-016-1754-4.

D'Ávila, D.A., Galvão, L.M.C., Sousa, G.R., Britto, C., Moreira, O.C, Chiari E. (2018). Monitoring the parasite load in chronic Chagas disease patients: comparison between blood culture and quantitative real time PCR. *PLoS One*. 29;13(11): e0208133. doi: 10.1371/journal.pone.0208133

De Souza-Basqueira, M., Ribeiro, R. M., De Oliveira, L. C., Moreira, C. H. V., Martins, R. C. R., Franco, D. C., *et al.* (2020). Gut Dysbiosis in Chagas Disease. A Possible Link to the Pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10.3389/fcimb.2020.00402

Dias, N., Nitz, N., Hagström, L., Vital, T., Hecht, M. (2019). Congenital Chagas disease: alert of research negligence. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V. 52, p. 1-6, 2019.

Duffy, T., Cura, C.I., Ramirez, J.C., Abate, T., Cayo, N.M., Parrado, R. (2013). 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*. 7(1): e2000. doi:10.1371/journal.pntd.0002000

Egüez, K. E., Alonso-Padilla, J., Téran, C., Chipana, Z., García, W., Torrico, F., *et al.* (2017). Rapid diagnostic tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 11(4): e0005501.

Eloan Pinheiro, E., Brum-Soares, L., Reis, R., Cubides, J. Chagas Disease: Review of Needs, Neglect, and Obstacles to Treatment Access in Latin America. *Rev Soc Bras Med Trop*. 50(3):296-300. doi: 10.1590/0037-8682-0433-2016.

EL-SAYED, N.M., MYLER, P.J., BARTHOLOMEU, D.C., *et al.* (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309:409-415.

Emamalipour, M., Seidi, k., Vahed, S.Z., Jahanban-Esfahlan, A., Jaymand, M., Majdi, H., *et al.* (2020). Horizontal Gene Transfer: From Evolutionary Flexibility to Disease Progression. *Front Cell Dev Biol*. 19;8:229. doi: 10.3389/fcell.2020.00229.

Engman, D. M.; Leon, J. S. (2002). Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta tropica*. 81(2): 123–32.

Essner, R., Rhoades, K., McBride, W.H., Morton, D.L., Economou, J.S. (1989). IL-4 down-regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J Immunol*.142 (11) 3857-3861;

Ferreira, A.V.M., Segatto, M., Menezes, Z., Macedo, A.M., Gelape, C., Andrade, L.O., Nagajyothi, F., Scherer, P.E., Teixeira, M.M., Tanowitz, H.B. (2011). Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect*. 13(12-13):1002-5. doi: 10.1016/j.micinf.2011.06.002.

Furlan, C.L.A., Boari, J.T., Rodriguez, C., Canale, F.P., Vernengo, F.F., Boccardo, S., Beccaria, C.G., Adoue, V., Joffre, O., Gruppi, A., Montes, C.L., Rodriguez, E.V.A. (2018). Limited Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Response During Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Is Required to Allow the Emergence of Robust Parasite-Specific CD8<sup>+</sup> T Cell Immunity. *Front Immunol.* 9: 2555. doi: 10.3389/fimmu.2018.02555

Gironès, N., Carrasco-Marin, E., Cuervo, H., Guerrero, N. A., Sanoja, C., John, S., et al. (2007). Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1107, 434–444. doi: 10.1196/annals.1381.046

Gironès, N., Cuervo, H., Fresno, M. (2005). *Trypanosoma cruzi*-Induced Molecular Mimicry and Chagas' Disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 296:89-123. doi: 10.1007/3-540-30791-5\_6.

Gomes, J.A., Bahia-Oliveira, L.M., Rocha, M.O., Busek, S.C., Teixeira, M.M., et al. (2005) Type 1 chemokine receptor expression in Chagas disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun* 73: 7960–7966.

Gomes, J.A., Bahia-Oliveira, L.M., Rocha, M.O., Martins-Filho, O.A., Gazzinelli, G., Correa-Oliveira, R. (2003). Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1- specific immune response. *Infect Immun.* 71(3): 1185-93.

Gonçalves, C.S., Ávila, A.R., Souza, W., Motta, M.C.M., Cavalcanti, D.P. (2018). Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. *Parasit Vectors.* 6;11(1):83. doi: 10.1186/s13071-018-2664-4.

Guedes, P. M., Veloso, V. M., Afonso, L. C., Caliari, M. V., Carneiro, C. M., Diniz, L. F., et al.(2009). Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-gamma, TNF-alpha, and low IL-10 production during the acute infection phase. *Veterinary immunology and immunopathology.* 130(1-2), p. 43-52.

Guedes, P.M.M., Gutierrez, F.R.S., Silva, G.K., Dellalibera-Joviliano, R., Rodrigues, G.J., Bendhack, L.M., et al. (2012). Deficient Regulatory T Cell Activity and Low Frequency of IL-17-Producing T Cells Correlate with the Extent of Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(4): e1630. doi: 10.1371/journal.pntd.0001630

Guimaro, M. C., Alvez, R. M., Rose, E., Sousa, A.O., Rosa, A.C., Hecht, M..M., et al. (2014). Inhibition of Autoimmune Chagas-Like Heart Disease by Bone Marrow Transplantation. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 8 (12).

Gutierrez, F. R. S., Guedes, P.M.M., Gazzinelli, R.T., Silva, J.S. (2009). The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology.* 31(11): 673–685.

Gutiyama, L.M., Cunha, J.P.C., Schenkman, S. (2008). Histone H1 of *Trypanosoma cruzi* Is Concentrated in the Nucleolus Region and Disperses upon Phosphorylation during Progression to Mitosis. *Eukaryot Cell.* 7(4): 560–568. doi: 10.1128/EC.00460-07

- Hecht, M. M.; Nitz, N.; Araujo, P. F.; Sousa, A. O.; Rosa, A. C.; Gomes, D. A.; et al. (2010). Inheritance of DNA Transferred from American Trypanosomes to Human Hosts. *PLoS ONE*. 5 (2).
- Hernández, C., Cucunubá, Z., Flórez, C., Olivera, M., Valencia, C., Zambrano, P., et al. (2016). Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia: Parasite loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases. *PLoS Negl Trop Dis*. 10(10):e0005112
- Ho, I-C., Miaw, S-C. (2016). Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 941:31-77. doi: 10.1007/978-94-024-0921-5\_3. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000600007>
- Hyland, K. V., and Engman, D. M. (2006). Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. *Trends Parasitol*. 22, 101–102. doi: 10.1016/j.pt.2006.01.001
- Jiang, J., Zhao, M., Chang, C., Wu, H., Lu Q. (2020). Interferons Tipo I na Patogênese e Tratamento de Doenças Autoimunes. *Clin Rev Allergy Immunol*. 59 (2): 248-272. doi: 10.1007 / s12016-020-08798-2
- Jones, E.M., Colley, D.G., Tostes, S., Lopes, E.R., Vnencak, J.C., McCurley, T.L. (1993). Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg*. 48 (348-57). doi: 10.4269/ajtmh.1993.48.348
- Junqueira, C., Caetano, B., Bartholomeu, D.C., Melo, M.B., Ropert, C., Rodrigues, M.M., Gazzinelli, R.T. (2010). The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*. 15;12:e29. doi: 10.1017/S1462399410001560.
- Kelly, M., Lihua, S., Zhe, Z., Li, S., Yoselin, P., Michelle, P., Kathleen, E.S. (2018). Transposable element dysregulation in systemic lupus erythematosus and regulation by histone conformation and Hsp90. *Clin Immunol*. 197:6-18. doi: 10.1016/j.clim.2018.08.011.
- Kelly, E. A., Bulman, C.A., Gunderson, E.L., Irisgh, A.M., Townsed, R. L., Sakani, J.A., et al. (2021). Comparative Performance of Latest-Generation and FDA-Cleared Serology Tests for the Diagnosis of Chagas Disease. *J Clin Microbiol*. 19;59(6):e00158-21. doi: 10.1128/JCM.00158-21.
- Kierszenbaum, F. (1999). Chagas' Disease and the Autoimmunity Hypothesis. *Clin Microbiol Rev*. 12(2): 210–223.
- Kines, K. J., Sokolowski, M., Deharo, D. L., Christian, C. M., Belancio, V. P. (2014). Potential for genomic instability associated with retrotranspositionally-incompetent L1 loci. *Nucleic Acids Research*, 42 (16).
- Kropf, S.P., Sá, M.G. (2009). The Discovery of *Trypanosoma Cruzi* and Chagas Disease (1908-1909): *Tropical Medicine in Brazil. Hist Cienc Saude Manguinhos*. 1:13-34. doi: 10.1590/s0104-59702009000500002.

- Kumar, S., Tarleton, R.L. (1998). The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 20:207–16.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., *et al.* (2001). Sequenciamento e análise inicial do genoma humano. *Nature*. 409 : 860–921.
- Laucella, S.A., Postan, M., Martin, D., Hubby Fralish, B., Albareda, M.C., Alvarez, M.G., *et al.* (2004). Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis*. 189(5): 909-18.
- Lauria-pires, L., Braga, M. S., Vexenat, A. C., Nitz, N., Simões-barbosa, A., Tinoco, D. L., Teixeira, A. R. L. (2000). Progressive chronic Chagas Heart disease ten years after treatment with anti-trypanosoma nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg*. 63 (3-4): 111-118.
- Ledoux, T., Aridgides, D., Salvador, R., Ngwenyama, N., Panagiotidou, S., Alcaide, P., Blanton, R.M., Perrin, M.A. (2018). *Trypanosoma cruzi* Neurotrophic Factor Facilitates Cardiac Repair in a Mouse Model of Chronic Chagas Disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 368(1):11-20. doi: 10.1124/jpet.118.251900.
- Lewis, M. D., Francisco, A.F., Taylor, M.C., Burrell-Saward, H., McLatchie, A.P., Miles, M.A., Kelly, J.M.(2014). Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cellular Microbiology*. v. 16, n. 9, p. 1285–1300.
- Lewis, M.D., Kelly, J.M. (2016). Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. *Trends Parasitol*. 32(11): 899–911. doi: 10.1016/j.pt.2016.08.009
- Li, H., Ice, J.A., Lessard, C.J., Sivils, K.L. (2013). Interferons in Sjögren's Syndrome: Genes, Mechanisms and Effects. *Frente. Immunol*. 4 : 290. doi: 10.3389 / fimmu.2013.00290.
- Lian, X., Zhang, J., Azarin, S.M., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Bao, X., *et al.* (2013). Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. 8(1):162-75. doi: 10.1038/nprot.2012.150
- Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J., *et al.* (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health*. 7: 166. doi: 10.3389/fpubh.2019.00166
- Lidani, K.C.F., Bavia, L., Ambrosio, A.R., Messias-Reason, I.J. (2017). The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol*. 8: 607. doi: 10.3389/fmicb.2017.00607
- Lima, V.D.S., Xavier, S., das Cristina, C., Maldonado, I., Fabiola, R., Rodrigues, R.A.L., Vicente, A., Carolina, P., Maria, J.A. (2014). Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI

genotypes in the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 9:e116137. doi: 10.1371/journal.pone.0116137

Lizardo, K., Ayyappan, J.P., Oswal, N., Weiss, L.M., Scherer, P.E., Nagajyothi, J.F. (2021). Fat tissue regulates the pathogenesis and severity of cardiomyopathy in murine chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 7;15(4):e0008964. doi: 10.1371/journal.pntd.0008964.

Llaguno, M., Silva, M.V., Batista, L.R., Silva, D.A.A., Sousa, R.C., Resende, L.A.P.R., *et al.* (2019). T-Cell Immunophenotyping and Cytokine Production Analysis in Patients with Chagas Disease 4 Years after Benznidazole Treatment. *Infect Immun*. 23;87(8):e00103-19. doi: 10.1128/IAI.00103-19. Print 2019 Aug.

Machado, F. S., Jelicks, L. A., Kirchhoff, L. V., Shirani, J., Nagajyothi, F., Mukherjee, S., *et al.* (2012). Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments. *Cardiol Rev*. 20(2), 53–65.

Mahlangu, T., Dlodla, P.V., Nyambuya, T.M., Mxinwa, V., Mazibuko-Mbeje, S.E., Cirilli, I., *et al.* (2020). A systematic review on the functional role of Th1/Th2 cytokines in type 2 diabetes and related metabolic complications. *Cytokine*. 126:154892. doi: 10.1016/j.cyto.2019.154892.

Malik, L.H., Singh, G.D., Amsterdam, E.A. (2015). The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease. *Clin Cardiol*. 38(9):565-9. doi: 10.1002/clc.22421.

Marin-Neto, J.A., Cunha-Neto, E., Maciel, B.C., Simoes, M.V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 115(9):1109–23. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296 .

Martinez, F., Perna, E., Perrone, S.V., Liprandi, A.S. (2019). Chagas Disease and Heart Failure: An Expanding Issue Worldwide. *Eur Cardiol*. 14(2): 82–88. doi: 10.15420/ecr.2018.30.2

Matsuda, N.M., Miller, S.M., Evora, P.R.B. (2009). The Chronic Gastrointestinal Manifestations of Chagas Disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 64(12):1219-24. doi: 10.1590/S1807-59322009001200013.

Melo, M.F., Moreira, O.C., Tenório, P., Lorena, V., Lorena-Rezende, I., Júnior, W.O., *et al.* (2015). Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasit Vectors*. 8:154. doi:10.1186/s13071-015-0770-0

Messenger, L.A., Ramirez, J.D., Llewellyn, M.S., Guhl, F., Miles, M.A. (2016). Importation of hybrid human-associated *Trypanosoma cruzi* strains of southern south American origin. *Colombia Emerg Infect Dis*. 22:1452–1455. doi: 10.3201/eid2208.150786. *BMC Genomics*. 2018 Nov 13;19(1):816. doi: 10.1186/s12864-018-5198-4.

Mocelin, A.O., Issa, V.S., Bacal, F., Guimaraes, G.V., Cunha, E., Bocchi, E.A. (2005). The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas'

heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 7(5):869–73.

Molina, I., Prat, J. G., Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Serre, N., *et al.* (2014). Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. *N Engl J Med*, 370:1899-1908.

Monge-Maillo, B., López-Vélez, R. (2017). Challenges in the Management of Chagas Disease in Latin-American Migrants in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 23(5):290-295. doi: 10.1016/j.cmi.2017.04.013.

Monteón-Padilla, V., Hernández-Becerril, N., Ballinas-Verdugo, M. A., Aranda-Fraustro, A., and Reyes, P. A. (2001). Persistence of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic cardiopathy patients. *Arch. Med. Res.* 32, 39–43. doi: 10.1016/S0188-4409(00)00261-7

Montgomery, S.P., Parise, M.E., Dotson, E.M., Bialek, S.R. (2016). What Do We Know About Chagas Disease in the United States? *Am J Trop Med Hyg.* 7;95(6):1225-1227. doi: 10.4269/ajtmh.16-0213. Epub 2016 Jul 11.

Moreira, O.C., Ramírez, J.D., Velázquez, E., Melo, M.F.A.D., Lima-Ferreira, C., Guhl, F., *et al.* (2013). 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.* 125: 23–31. doi:10.1016/j.actatropica.2012.08.020

Morillo, C.A., Marin-neto, J.A., Avezum, A., Sosa-estani, S., Rassi, A. JR., Rosas, F., *et al.* (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine.* *N. Engl. J. Med.* 1295–1306.

Muñoz, C., Apt, W., Zulantay, I. (2017). Real-Time PCR strategy for the identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units directly in chronically infected human blood. *Infect Genet Evol.* 49: 300–308. doi: 10.1016/j.meegid.2017.02.006

Muñoz-saravia, S. G., Haberland, A., Wallukat, G., Schimke, I. (2011). Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail Rev.* (1):45-64.

Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo J.L., *et al.* (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 204, 3037–3047. 10.1084/jem.20070885

Ndao, M., Kelly, N., Normandin, D., Maclean, J.D., Whiteman, A., Kokoskin, E., *et al.* *Trypanosoma cruzi*, Infection of Squirrel Monkeys: Comparison of Blood Smear Examination, Commercial Enzyme-linked Immunosorbent Assay, and Polymerase Chain Reaction Analysis as Screening Tests for Evaluation of Monkey-Related Injuries. *Comparative Medicine.* v. 50, n. 6, p. 658–665, 2000.

Nitz, N., Gomes, C., Rosa, A. C., D'Souza-Ault, M. R., Moreno, F., Lauria-Pires, L., *et al.* (2004). Heritable Integration of kDNA Minicircle Sequences from

Trypanosoma cruzi into the Avian Genome: Insights into Human Chagas Disease. *Cell*. 118.

Nordmark, G., Eloranta, M.L., Ronnblom, L. (2012). Primary Sjögren's syndrome and the type I interferon system. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 : 2054–2062. doi: 10.2174 / 138920112802273290.

Norman, F.F., López-Vélez, R. (2019). Chagas disease: comments on the 2018 PAHO Guidelines for diagnosis and management. *J Travel Med.* 14;26(7):060. doi: 10.1093/jtm/taz060

Nunes, M.C.P., Dones, W., Morillo, C.A., Encina, J.J., Ribeiro, A.L. (2013). Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol.* 27;62(9): 767-76. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.046

Nunes-Silva, V., Frantz, S., Ramos, G. C. (2017). Lymphocytes at the heart of wound healing. *Adv Exp Med Biol.* 1003: 225-250. doi: 10.1007 / 978-3-319-57613-8\_11.

Oliveira, C.M.B., Sakata, R.K., Issy, A.M., Gerola, L.R., Salomão, R. (2011). Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol.* 61: 2: 255-265 260

Oliveira, L.C.B., Lafaille, M.A.C., Lima, G.M.C.A., Abrahamsohn, I.A. (1996). Antigen-specific IL-4- and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase in vivo susceptibility to Trypanosoma cruzi infection. *Cell Immunol.* 25;170(1):41-53. doi: 10.1006/cimm.1996.0132.

Oliveira, M.T., Sulleiro, E., Gimenez, A.S., Lana, M., Zingales, B., Silva, J.S., Marin-Neto, J.A., Molina, I. (2020). 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.* 4;14(6):e0008311. doi: 10.1371/journal.pntd.0008311.

Pacheco, L. V., Santana, L.S., Barreto, B.C., Santos, E.S., Meira, C.S. (2021). Transmissão oral da doença de Chagas: Uma revisão de literatura. *Research, Society and Development.* v. 10, n. 2, e31910212636.

Paço, A., Adegas, F., Chaves, R. (2015). LINE-1 retrotransposons: from 'parasite' sequences to functional elements. *J Appl Genet.* 56(1):133-145.

Pereira, N.S., Queiroga, T.B.D., Nunes, D.F., Andrade, C.M., Nascimento, M.S.L., et al. (2018). Innate immune receptors over expression correlate with chronic chagasic cardiomyopathy and digestive damage in patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 12(7): e0006589. doi: 10.1371/journal.pntd.0006589

Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergés, M., et al. (2007). Development of a real-time PCR assay for Trypanosoma cruzi detection in blood samples. *Acta Trop.* 103(3):195–200. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.05.019

Qvarnstrom, Y., Schijman, A.G., Veron, V., Aznar, C., Steurer, F. (2012). Sensitive and Specific Detection of Trypanosoma cruzi DNA in Clinical

Specimens using a Multi-Target Real-Time PCR Approach. *PLoS Negl Trop Dis* .6: 1–8.

Ramos, G. C., Dalbó, S., Leite, D. P., Goldfeder, E., Carvalho, C. R., Vaz, N. M., *et al.* (2012). The autoimmune nature of post-infarct myocardial healing: oral tolerance to cardiac antigens as a novel strategy to improve cardiac healing. *Autoimmunity*. 45, 233–244. 10.3109/08916934.2011.647134

Rassi Jr, A., Rassi, A., Marin-Neto, J.A. (2009). Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104: 152-158

Rassi, A. J., Rassi, A., Marin-neto, J.A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375, 1388–1402.

Reis-Cunha, J.L., Baptista, R.P., Rodrigues-Luiz, G.F., Coqueiro-Dos-Santos, A., Valdivia, H.O., Almeida, L.V., *et al.* (2018). Whole Genome Sequencing of Trypanosoma Cruzi Field Isolates Reveals Extensive Genomic Variability and Complex Aneuploidy Patterns Within TcII DTU. *BMC Genomics*. 13;19(1):816. doi: 10.1186/s12864-018-5198-4.

Ribeiro, B.M., Crema, E., Rodrigues-Jr, V. (2008). Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. *Hum Immunol*. 69(8):484-9. doi: 10.1016/j.humimm.2008.05.013. Epub 2008 Jun 26.

Rios, L.E., Vázquez-Chagoyán, J.C., Pacheco, A.O., Zago, M.P., Garg, N.J. (2019). Immunity and vaccine development efforts against Trypanosoma cruzi. *Acta Trop*. 200:105168. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105168.

Rodić N, Sharma R, Sharma R *et al.* (2014). Long interspersed element-1 protein expression is a hallmark of many human cancers. *Am J Pathol*. 184 : 1280–6.

Rodrigues-Dos-Santos, I., Melo, M.F., Castro, L., Hasslocher-Moreno, A.M., Brasil, P.E.A.A., Sousa, A.S., Britto, C., Moreira, O. C. (2018). 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*. 12;12(11):e0006939. doi: 10.1371/journal.pntd.0006939.

Rojas, M., Restrepo-Jiménez, P., Monsalve, D.M., Pacheco, Y., Acosta-Ampudia, Y., Ramírez-Santana, C., *et al.* (2018). Molecular mimicry and autoimmunity. *J Autoimmun*. 95:100-123. doi: 10.1016/j.jaut.2018.10.012. Epub 2018 Oct 26.

Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P.M., González-Roldán, J.F. (2018). Enfermedad De Chagas no México. *Gac Med Mex*. 154 (5): 605-612. doi: 10.24875 / GMM.18004515.

Root-Bernstein, R., Fairweather, D.L. (2014). Complexities in the relationship between infection and autoimmunity. *Curr Allergy Asthma Rep*. 14(1):407. doi: 10.1007/s11882-013-0407-3.



Root-Bernstein, R., Fairweather, D.L. (2015). Unresolved issues in theories of autoimmune disease using myocarditis as a framework. *J Theor Biol.* 21;375:101-123. doi: 10.1016/j.jtbi.2014.11.022. .

Rosa, E., Paglini-Oliva, P., Prato, L.B., Benizio, E., Triquell, M.F., Muñoz, S.E., Fernández, E.A. (2018). Early Detection of Chronic Asymptomatic Chagas Infection. *Med Sci Monit.* 2;24:4567-4571. doi: 10.12659/MSM.907735.

Rose, E., Carvalho, J. L., Hecht, M. (2020). Mechanisms of DNA repair in *Trypanosoma cruzi*: What do we know so far?. *DNA REPAIR.* v. 91-92, p. 102873.

Rusman, F., Tomasini, N., Yapur, N., Puebla, A.F., Ragone, P.G., Diosque, P. (2019). Elucidating diversity in the class composition of the minicircle hypervariable region of *Trypanosoma cruzi*: New perspectives on typing and kDNA inheritance. *PLoS Negl Trop Dis.* 27;13(6):e0007536. doi: 10.1371/journal.pntd.0007536.

Sabino, E.C., Lee., TH., Montalvo., L., Nguyen., M.L., Leiby., D.A., Carrick., D. M., et al. (2013). Antibody levels correlate with detection of *Trypanosoma cruzi* DNA by sensitive polymerase chain reaction assays in seropositive blood donors and possible resolution of infection over time. *Transfusion.* 53(6):1257-65. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03902.x

Sánchez-Montalvá, A., Moris, M., Mego, M., Salvador, F., Accarino, A., Ramírez, K., Azpiroz, F., Ruiz-de-Leon, A., Molina, I. (2016). High Resolution Esophageal Manometry in Patients With Chagas Disease: A Cross-Sectional Evaluation. *PLoS Negl Trop Dis.* 5;10(2):e0004416. doi: 10.1371/journal.pntd.0004416.

Sánchez-valdéz, F. J., Pdilla, A., Wang, W., Orr, D., Tarleton, R. (2018). Spontaneous dormancy protects *trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *ELife.* 7, p. 1–20.

Sánchez-Valdéz, F., Padilla, A. (2019). In Situ Detection of Dormant *Trypanosoma cruzi* Amastigotes Using Bioluminescent-Fluorescent Reporters. *Methods Mol Biol.* 1955:179-186. doi: 10.1007/978-1-4939-9148-8\_13.

Sánchez-Valdéz, F.J., Padilla, A., Wang, W., Orr, D., Tarleton, R.L. (2018). Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *eLife.* 7: e34039. doi: 10.7554/eLife.34039

Sangenis, L. H. C., Nielebock, M. A. P., da Silva, S. C., da Silva M. C. C., & Bento, G. M. R. (2016). Transmissão da doença de Chagas por consumo de carne

de caça: Revisão sistemática. *Rev Bras Epidemiol.* 19(4):803–11.

Santi-Rocca, J., Fernandez-Cortes, F., Chillón-Marinas, C., González-Rubio, M.L., Martín, D., Gironès, N., et al. (2017). A multi-parametric analysis of *Trypanosoma cruzi* infection: common pathophysiologic patterns beyond extreme heterogeneity of host responses. *Sci Rep.* 21;7(1):8893. doi: 10.1038/s41598-017-08086-8.

Santi-Rocca, J., Gironès, N., Fresno, M. (2019). Multi-Parametric Evaluation of *Trypanosoma cruzi* Infection Outcome in Animal Models. *Methods Mol Biol.* 1955:187-202. doi: 10.1007/978-1-4939-9148-8\_14.

SANTOS-BUCH, CA; TEIXEIRA, ARL. The immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. *J. Exp. Med.* 140(1): 38-53, 1974

Santos, F.L.N., Souza, W., Barros, M.S., Nakazawa, M., Krieger, M.A., Gomes, Y.M. (2016). Chronic Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests. *Am J Trop Med Hyg.* 4;94(5):1034-9. doi: 10.4269/ajtmh.15-0820.

Scharfstein, J., Gomes, J. d. A. S., Correa-Oliveira, R. (2009). Back to the future in Chagas disease: from animal models to patient cohort studies, progress in immunopathogenesis research. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104, 187–198. doi: 10.1590/S0074-02762009000900025

Shoemaker, J.P., Hoffman, R.V. Jr. (1974). *Trypanosoma cruzi*: possible stimulatory factor(s) in brown adipose tissue of mice. *Exp. Parasitol.* 1974; 35 : 272–274.

Shoemaker, J.P., Hoffman, R.V. Jr., Huffman, D.G. (1970). *Trypanosoma cruzi*: brown adipose tissue preference in mice for the Tulahuen strain. *Exp. Parasitol.* 27 : 403–407.

Silberstein, E., Serna, C., Fragoso, S.P., Nagarkatti, R., Debraband, A. (2018). A novel nanoluciferase-based system to monitor *Trypanosoma cruzi* infection in mice by bioluminescence imaging. *PLOS ONE.* v. 13, n. 4, p. e0195879.

Silva-Dos-Santos, D., Barreto-de-Albuquerque, J., Guerra, B., Moreira, O.C., Berbert, L.R., Ramos, M.T., et al. (2017). Unraveling Chagas Disease Transmission Through the Oral Route: Gateways to *Trypanosoma Cruzi* Infection and Target Tissues. *PLoS Negl Trop Dis.* 5;11(4):e0005507. doi: 10.1371/journal.pntd.0005507.

Simões-Barbosa, A., Argãoaraz, E. R., Barros, A. M., Rosa, A. C., Alves, N. P., Louvandini, P., et al. (2006). *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 101 (8).

Skapenko, A., Niedobitek, G.U., Kalden, J.R., Lipsky, P.E., Schulze-Koops, H. (2004). Generation and Regulation of Human Th1-Biased Immune Responses In Vivo: A Critical Role for IL-4 and IL-10. *The Journal of Immunology.* 172: 6427–6434.

Sobrinho, J.L.S., Fontes, D.A.F., De Lyra, M.A.M. (2009). Chagas disease: 100 years since its discovery. *Rev. Bras. Fazenda de Ciências.* 283–289.

Sousa, G.R., Gomes, J.A.S., Fares, R.C.G., Damásio, M.P.S., Chaves, A.T., Ferreira, K.S. (2014). Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *Plos One.* 6. 9(3): e87082. doi: 10.1371 / journal.pone.0087082

Souza, A.W.S., Júnior, D.M., Araújo, J.A.P., Catelan, T.T.T., Cruvinel, W.M., Andrade, L.E.C., *et al.* (2010). Immune system - part III. The delicate balance of the immune system between the poles of tolerance and autoimmunity. *Rev. Bras. Reumatol.* vol.50 no.6

Souza, P.E., Rocha, M.O., Rocha-Vieira, E., Menezes, C.A., Chaves, A.C., *et al.* (2004). Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun* 72: 5283–5291

Souza, W. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 (Suppl. I): 89-100.

Steverding, D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasit Vectors.* 7: 317. doi: 10.1186/1756-3305-7-317

Sunami, E., Vu, A-T., Nguyen, S.L., Giuliano, A.E., Hoona, D.S.B. (2008). Quantification of LINE1 in Circulating DNA as a Molecular Biomarker of Breast Cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1137: 171–174. doi: 10.1196/annals.1448.011

Taylor, M.C., Ward, A., Olmo, F., Jayawardhana, S., Francisco, A.F., Lewis, M.D., Kelly, J.M. (2020). Intracellular DNA replication and differentiation of *Trypanosoma cruzi* is asynchronous within individual host cells in vivo at all stages of infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 20;14(3):e0008007. doi: 10.1371/journal.pntd.0008007.

Teixeira, A. R. L., Arganaraz, E. R., Freitas JR, L. H.; Lacava, Z. G. M., Santana, J. M., Luna, H. (1994). Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. *Mutation Research.* 305.

Teixeira, A. R., Figueiredo, F., Rezende Filho, J., Macêdo, V. (1983). Chagas' disease: A clinical, parasitological, immunological and pathological study in rabbits *American Journal Tropical Medicine Hygiene.* 32 (2): 258-72.

Teixeira, A.R.L., Nitz, N., Guimaro, M.C., Gomes, C., Santos-Buch, C.A. (2006). Chagas Disease. *Postgrad Med J.* 82(974):788-98. doi: 10.1136/pgmj.2006.047357.

Teixeira, AR.L., Hecht, M.M., Guimaro, M.C., Sousa, AO., Nitz, N. (2011). Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Clin Microbiol Rev.* 24(3): 592–630. doi: 10.1128/CMR.00063-10

Teixeira, D.E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., Souza, W. (2012). Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *Plos Neglected Tropical Disease.* 6 (8), 1749.

Tomasini, N. (2018). Introgression of the Kinetoplast DNA: An Unusual Evolutionary Journey in *Trypanosoma cruzi*. *Curr Genomics.* 19(2): 133–139. doi: 10.2174/1389202918666170815124832

Vago, A.R., Macedo, S.O.U., Adad, S.J., Reis, D.D, Correa-Oliveira, R., *et al.* (1996). PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet.* 348 (pg. 891-2)

- Vakaloglou, K.M., Mavragani, C.P. (2011). Activation of the type I interferon pathway in primary Sjögren's syndrome: an update. *Curr. Opin. Rheumatol.* 23 : 459–464. doi: 10.1097 / BOR.0b013e328349fd30.
- Van Overtvelt, L., Vanderheyde, N., Verhasselt, V., Ismaili, J., De Vos, L., Goldman, M., *et al.* (1999). *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun.* 67:4033–40.
- Virgilio, F.S., Pontes, C., Dominguez, M.R., Ersching, J., Rodrigues, M.M., Vasconcelos, J.R. (2014). CD8(+) T cell-mediated immunity during *Trypanosoma cruzi* infection: a path for vaccine development? *Mediators Inflamm.* 2014:243786. doi: 10.1155/2014/243786.
- Vizzoni, A.G., Varela, M.C., Sangenis, L.H.C., Hasslocher-Moreno, A.M., Brasil, P.E.A.A., Saraiva, R.M. (2018). Ageing With Chagas Disease: An Overview of an Urban Brazilian Cohort in Rio De Janeiro. *Parasit Vectors.* 19;11(1):354. doi: 10.1186/s13071-018-2929-y.
- Ward, L.S., Guariento, M.E., Fernandes, G.A., Maciel, R.M. (1999). Serum cytokines in chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 32(3): 285-9.
- Wen, J.J., Vyatkina, G., Garg, N. (2004). Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Radic Biol Med.* 37:1821–1833.
- Wesley, M., Moraes, A., Rosa, A.C., Carvalho, J.L., Shiroma, T., Vital, T., *et al.* (2019). Correlation of Parasite Burden, kDNA Integration, Autoreactive Antibodies, and Cytokine Pattern in the Pathophysiology of Chagas Disease. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389 / fmicb.2019.01856.
- Westenberger, S.J., Cerqueira, G.C., El-sayed, N.M., Zingales, B., Campbell, D.A., Sturm, N.R. (2006). *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. *BMC Genomics.* 7(60).
- Woodward, E.A., Prêle, C.M., Nicholson, S.E., Kolesnik, T.B., Hart, P.H. (2010). The anti-inflammatory effects of interleukin-4 are not mediated by suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS1). *Immunology.* 131(1): 118–127. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03281.x
- Woodward, E.A., Prêle, C.M., Nicholson, S.E., Kolesnik, T.B., Hart, P.H. (2010). The anti-inflammatory effects of interleukin-4 are not mediated by suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS1). *Immunology.* 131(1): 118–127. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03281.x
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2021). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Available at: [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 June 14, 2021).

Yusoff, F.M., Wong, K.K., Redzwan, N.M. (2020). Th1, Th2, and Th17 cytokines in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 53(1):8-20. doi: 10.1080/08916934.2019.1693545. Epub 2019 Nov 27.

Zauza, P.L., Borges-Pereira, J. (2001). Sera levels of Ig G anti-*Trypanosoma cruzi* on evolution of the chronic chagasic cardiopathy in interval of 10 years. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34 (5). doi: <https://doi.org/10.1590/S0037-8682200100050000>

Zhang, J., Tao, R., Campbell, K.F., Carvalho, J.L., Ruiz, E.D., Kim, G.C., et al. (2019). Functional cardiac fibroblasts derived from human pluripotent stem cells via second heart field progenitors. *Nat Commun.* 20;10(1):2238. doi: 10.1038/s41467-019-09831-5.

Zhang, X., Zhang, R., Yu, J. (2020). New Understanding of the Relevant Role of LINE-1 Retrotransposition in Human Disease and Immune Modulation. *Front Cell Dev Biol.* 8: 657.

Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M.G., et al. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 12:240–253. doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.009.