

Cássia Rubia Bernardo

**Associação entre os Sistemas Histo-
sanguíneos ABO, Secretor e Lewis e as
Formas Clínicas da Doença de Chagas**

São José do Rio Preto

2014

Cássia Rubia Bernardo

**Associação entre os Sistemas Histo-
sanguíneos ABO, Secretor e Lewis e as
Formas Clínicas da Doença de Chagas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

São José do Rio Preto
2014

Bernardo, Cássia Rubia

Associação entre os Sistemas Histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis e as Formas Clínicas da Doença de Chagas.

São José do Rio Preto, 2014

76 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

1. Sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis; 2. Doença de Chagas; 3. *Trypanosoma cruzi*.

CÁSSIA RUBIA BERNARDO

**Associação entre os Sistemas Histo-
sanguíneos ABO, Secretor e Lewis e as
Formas Clínicas da Doença de Chagas**

BANCA EXAMINADORA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE**

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

**2º Examinador: Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de
Azeredo Oliveira**

3º Examinador: Profa. Dra. Lilian Castiglioni

Suplentes: Prof. Dr. Fabiano Gazzi Tadei

Prof. Dr. Octávio Ricci Junior

São José do Rio Preto, 27/02/2014.

Sumário

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Quadros e Tabelas	x
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xi
Resumo	xiv
Abstract.....	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas	1
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.3 Manifestações clínicas	5
1.4 Diagnóstico laboratorial.....	7
1.5 Aspectos imunológicos	8
1.6 Sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis e a doença de Chagas.....	9
1.7 Objetivo geral	16
1.7.1 Objetivos específicos	16
2. CASUÍSTICA E MÉTODOS	19
2.1 Aspectos éticos do estudo	19
2.2 Casuística	19
2.2.1 Diagnóstico clínico da doença de Chagas	20
2.2.2 Coleta de sangue.....	21
2.3 Métodos	21

2.3.1 Identificação dos fenótipos eritrocitários do sistema ABO	21
2.3.2 Identificação dos fenótipos eritrocitários do sistema Lewis	22
2.3.3 Identificação dos fenótipos Secretor/não-Secretor inferidos da fenotipagem Lewis	24
2.3.4 Identificação de anticorpos da classe IgG anti- <i>T. cruzi</i>	24
2.3.5 Extração de DNA genômico humano	24
2.3.6 Avaliação da concentração e pureza do DNA genômico	25
2.3.7 Identificação dos genótipos da substituição <i>G428A</i> do gene <i>FUT2</i> ..	26
2.3.8 Identificação da substituição <i>T202C</i> do gene <i>FUT3</i> dos pacientes e doadores portadores do fenótipo Le(a-b-)	30
2.3.9 Identificação da substituição <i>C314T</i> do gene <i>FUT3</i> dos pacientes e doadores portadores do fenótipo Le(a-b-)	34
2.3.10 Análise estatística	38
3. RESULTADOS	40
4. DISCUSSÃO	46
5. CONCLUSÃO	54
6. REFERÊNCIAS	56
7. ANEXOS	75
7.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	75
7.2 Ficha de Dados Epidemiológicos	76

Dedicatória

Ao meu único mestre Jesus Cristo,

Aos meus amados pais José e Laura,

Aos indivíduos com a doença de Chagas.

Agradecimentos

Ao Deus da minha vida, que com o seu maravilhoso e inexplicável amor, cuidado e misericórdia, iluminou meus passos para que chegasse até aqui.
“Porque o Teu amor é melhor que a vida, os meus lábios sempre te louvarão.”
(Salmos 63:3)

À Diretoria Geral da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e seus coordenadores: Prof. Dr. José Victor Maniglia, Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira e Profa. Eny Maria Goloni Bertollo.

Aos funcionários da Pós-Graduação, por todos os esclarecimentos.

À FAMERP, pela oportunidade e suporte financeiro, especialmente ao Departamento de Biologia Molecular.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pela bolsa de mestrado (processo 2012/05580-2) e apoio financeiro (processo 2011/08075-4) concedido ao projeto.

Ao Ministério da Educação, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pela bolsa de mestrado concedida inicialmente.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos, pela orientação, oportunidade, confiança e os valiosos ensinamentos transmitidos ao longo destes anos. Obrigada por acreditar e ajudar-me na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Cinara de Cássia Brandão de Mattos, pela oportunidade, confiança, ajuda, paciência e ensinamentos, minha sincera gratidão.

À Profa. Dra. Lilian Castiglioni, por um dia ter acreditado e incentivado a ingressar-me na pesquisa. Você é uma das principais responsáveis por tudo isto. Obrigada por ser canal de benção na minha vida.

A todos os pacientes e doadores de sangue, pelo respeito e prontidão em participar da pesquisa e contribuírem para o avanço científico da nossa comunidade.

Aos médicos colaboradores e participantes da pesquisa: Prof. Dr. Aldenis Albanese Borin, Dr. Luiz Sérgio Ronchi, Prof. Dr. João Gomes Netinho, Prof. Dr. Otávio Ricci Junior, Prof. Dr. Reinaldo Bulgarelli Bestetti, Ph.D. Professor Stephen Henry e Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini.

Aos Ambulatórios de Cardiologia e Cirurgia Geral do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto-FUNFARME. Aos médicos residentes que nos auxiliaram na seleção dos

pacientes e todos os funcionários, pela ajuda e paciência em conduzi-los ao projeto.

Aos funcionários do Hemocentro de São José do Rio Preto, pela prontidão e colaboração na seleção dos doadores de sangue.

Aos docentes que compuseram a banca de qualificação e defesa do mestrado: Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini, Prof. Dr. Irineu Maia, Profa. Dra. Lilian Castiglioni e Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pelas valiosas considerações que enriqueceram este trabalho.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Biologia Molecular da FAMERP, pelo apoio e incentivo.

Às funcionárias do Laboratório de Imunogenética Molecular do Hemocentro de São José do Rio Preto, pela colaboração e amizade.

À Profa. Dra. Ana Lara da Costa Ferreira, pela confiança, ensinamentos, ajuda, paciência e amizade. Você é exemplo de pessoa e profissional para mim. Muito obrigada por tudo, sempre.

À Profa. Msc. Fabiana Nakashima, pelos ensinamentos, ajuda, carinho, amizade e pelo presente chamado Ana Lara, muito obrigada.

À Profa. Msc. Amanda Priscila de Oliveira e a mestranda Ana Vitória Silveira Camargo, companheiras de projeto e coletas, pela colaboração, dedicação, respeito, paciência, carinho e amizade. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram por mim. Este trabalho é mérito de vocês também.

Ao Márcio Rodrigues, vulgo fronha, pela ajuda, colaboração, carinho e amizade. Sua alegria foi essencial para tornarem os dias mais leves e bonitos.

Aos demais amigos do Laboratório de Imunogenética da FAMERP: Cidinha, Cristiane, Karina Younan, Daniela, Karina, Camila, Mariana(s), Stefani, Igor, Milton, Ulysses, Vinicius, Fernando, Osiris, Marcos e a todos os alunos que passaram pelo laboratório ao longo destes anos. Muito obrigada pela colaboração, incentivo, ajuda, amizade, lágrimas, sorrisos e momentos que levarei para sempre em meu coração. Trabalhar em companhia de todos vocês foi e sempre será um grande privilégio.

Aos amigos Bizutti e Julinho do Laboratório de Preparação Multidisciplinar em Bioquímica, pelo apoio, amizade e cafés.

Aos meus pais José e Laura, pelo amor, cuidado, apoio incondicional, princípios e valores que fazem o que hoje sou. São vocês minha maior riqueza, a inspiração e o motivo de me tornar um ser humano melhor a cada dia. Amo-os daqui até a eternidade com Cristo.

Aos meus irmãos Márcio, Priscila e Ana Paula, por todo amor, incentivo, ajuda e companhia. Amo-os com todo meu coração e sou muito grata por compartilhar da vida ao lado de vocês.

Aos meus cunhados Alexandre, Deyvit e Viviane, pelo carinho e incentivo sempre disponível a mim.

Aos meus avós (*in memoriam*), tios (as), primos (as) e familiares que fazem parte da minha história e traz muitas alegrias.

As minhas amigas-irmãs Andressa, Maraísa, Larissa, Débora e Dalila, pela amizade, incentivo e paciência. A vida é mais alegre e bonita na companhia de vocês.

Aos amigos Leonardo e Karol, pela amizade, paciência e ajuda com seus conhecimentos em informática.

A todos meus amigos de perto e longe, os presentes e ausentes. É um privilégio tê-los em minha vida.

A Cibele e Sirlei, pelo apoio e oportunidade, muito obrigada.

A D. Fátima, Sr. Moacir e suas filhas Vanessa e Gislaine por me “adotarem” como filha nesta bonita e abençoada família. Gratidão é palavra pequena ao

tentar definir o que sinto por vocês e agradecê-los por tudo que fizeram a mim quando mais precisei. Que Deus os retribua conforme merecem. Amo vocês.

À XVII turma de Ciências Biológicas do Centro Universitário de São José do Rio Preto-UNIRP, pela amizade, incentivo e todas as loucuras vividas na graduação.

Aos professores e mestres que tive ao decorrer de minha vida escolar, pelos valiosos conhecimentos que muito contribuíram para esta conquista. Em especial os professores: Régia, Yolanda, Zenilda, Luciana, Júlio, Cleusa, Rosângela, Evaldo, Valéria, Lilian, Patrícia, Fabiano e Zélia.

Enfim, eu não seria nada sem a graça de Deus e o apoio de todos vocês.
Gratidão!

“[...] a ciência é uma coisa entre outras, que empregamos na aventura de viver, que é a única coisa que importa. É por isto, além da ciência, é preciso a “sapiência”, ciência saborosa, que tem a ver com a arte de viver. Porque toda a ciência seria inútil se, por detrás de tudo aquilo que faz os homens conhecer, eles não se tornassem mais sábios, mais tolerantes, mais mansos, mais felizes, mais bonitos.”

- Rubem Alves

Lista de Figuras

Figura 1.	Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	3
Figura 2.	Biosíntese dos antígenos ABH, Secretor e Lewis.....	12
Figura 3.	Fenotipagem eritrocitária do Sistema ABO.....	23
Figura 4.	Fenotipagem eritrocitária Lewis.....	23
Figura 5.	Fragmento de 1033 pb do gene <i>FUT2</i>	28
Figura 6.	Fragmento de 1033 pb clivado com a enzima <i>Ava II</i>	29
Figura 7.	Fragmento de 332 pb do gene <i>FUT3</i>	32
Figura 8.	Fragmento de 332 pb clivado com a enzima <i>Rsa I</i>	33
Figura 9.	Fragmento de 204 pb do gene <i>FUT3</i>	36
Figura 10.	Fragmento de 204 pb clivado com a enzima <i>Nla III</i>	37

Lista de Quadros e Tabelas

- Quadro 1.** Genes, Alelos, Enzimas, Oligossacarídeos e Antígenos dos Sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis..... 10
- Tabela 1.** Valores de média de idade em anos e desvio-padrão (DP) e sexo de acordo com as formas crônicas da Doença de Chagas em pacientes e doadores de sangue..... 40
- Tabela 2.** Frequências dos fenótipos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis dos pacientes chagásicos e doadores de sangue..... 41
- Tabela 3.** Frequências dos fenótipos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis de acordo com as formas crônicas da doença de Chagas..... 42
- Tabela 4.** Frequências combinadas dos fenótipos ABO e genótipos *FUT2* (Secretor/Não-secretor) dos pacientes chagásicos de acordo com as formas crônicas da doença de Chagas..... 43
- Tabela 5.** Frequências de perfis antigênicos de pacientes chagásicos e doadores de sangue..... 44

Lista de Abreviaturas e Símbolos

μl	Microlitro
μm	Micrômetro
ACK	<i>Ammonium –Chloride Lysing Buffer</i>
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
<i>FUT1</i>	Gene H
<i>FUT2</i>	Gene Secretor
<i>FUT3</i>	Gene Lewis
FUT1	Enzima α -2-L-fucosiltransferase
FUTII	Enzima α -2-L-Fucosiltransferase
FUTIII	Enzima α -3/4-L-Fucosiltransferase

GTA	Enzima α -1,3-N-Acetilgalactosaminiltransferase
GTB	Enzima α -1,3-N-Galactosiltransferase
Gal	Galactose
HAI	Hemaglutinação Indireta
HB	Hospital de Base
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- γ	Interferon-gama
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina de classe G
kDNA	DNA cinetoplastideal
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimol
NaCl	Cloreto de Sódio
nM	Nanômetro
OR	Odds Ratio
pb	Pares de Bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição

pH	Potencial de Hidrogênio
pM	Picomolar
QBC	Quantitative Buffy Coat
rpm	Rotação por minuto
RX	Raio-X
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
Tris-HCl	Tris Hidrocloro
Z	Zimodema

Associação entre os Sistemas Histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis e as Formas Clínicas da Doença de Chagas

Introdução: A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, o qual é transmitido ao homem, comumente, pelas fezes de um hemíptero conhecido popularmente como barbeiro. A infecção natural ocorre principalmente na infância e após um período aproximado de duas décadas, parte dos indivíduos infectados desenvolvem manifestações clínicas como a Cardiopatia Chagásica Crônica e a doença do trato gastrointestinal (Megaeosôfago e/ou Megacólon). A expressão dos antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis, controlada pelos genes *ABO* (9q34.1), *FUT2* (19q13.3) e *FUT3* (19p13.3), difere entre os órgãos acometidos por esta doença e pode influenciar suas manifestações clínicas. **Objetivo:** Avaliar se os antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis estão associados às diferentes formas clínicas da Doença de Chagas. **Materiais e Métodos:** Após a entrevista e obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido, amostras de sangue periférico e soro de 827 indivíduos foram analisadas. Os pacientes com a forma crônica da Doença de Chagas foram divididos em três subgrupos de acordo com a forma clínica, (megacólon=66, megaeosôfago=119 e cardiomiopatia=154). O grupo controle constitui-se de 488 doadores de sangue devidamente aptos à doação. As fenotipagens ABO e Lewis foram realizadas por métodos de hemaglutinação em tubos e colunas de gel,

respectivamente. A pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-*T. cruzi* foi realizada pelo teste de ELISA. Os genótipos *FUT2* e *FUT3* foram identificados por PCR-RFLP. **Resultados:** A média de idade dos pacientes chagásicos foi de $64,8 \pm 11,2$ e dos doadores de sangue $34,3 \pm 11,0$ ($p < 0.0001$). As diferenças entre as porcentagens do sexo dos pacientes e doadores foram estatisticamente significantes ($p < 0.0001$). As frequências dos fenótipos ABO, Secretor e Lewis distribuídos nas três formas da doença comparados entre si e com os doadores, não revelaram diferenças estatisticamente significantes. A comparação entre os fenótipos ABO e Secretor combinados, de acordo com as três formas da Doença de Chagas, mostrou diferenças estatisticamente significantes para a forma megaeosôfago ($p = 0,015$). A comparação entre as frequências dos perfis antigênicos de pacientes e doadores, revelaram diferença estatisticamente significativa para o perfil de antígenos BLe^b ($p = 0,032$). **Conclusões:** Os resultados sugerem que a expressão do antígeno carboidrato B, o qual caracteriza os grupos sanguíneos B e AB, cuja síntese está sob o controle dos genes funcionais *FUT2* (Secretor), atua como um fator de risco para a forma megaeosôfago da Doença de Chagas.

Palavras-chave: Sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis, Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*.

Association between Histo-blood systems ABO, Secretor and Lewis and Clinical Forms of Chagas Disease

Introduction: Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted to humans commonly in the feces of a hemipterous popularly known as barber. The natural infection occurs mainly in childhood. After a period of approximately two decades infected individuals develop clinical manifestations such as Chagas heart disease and Chagas gastrointestinal disease (Megaesophagus and/or Megacolon). The expression of the antigens belonging to histo-blood systems ABO, Secretor and Lewis, controlled by the genes *ABO* (9q34.1), *FUT2* (19q13.3) and *FUT3* (19p13.3) differs between the organs affected by Chagas disease. It is possible that the differential tissue expression of ABO, Secretor and Lewis histo-blood groups influences the clinical manifestations of Chagas disease. **Aim:** The aim of this study was to verify if the antigens of the histo-blood systems ABO, Secretor and Lewis are associated with different clinical forms of Chagas disease. **Materials and methods:** After obtaining the informed consent peripheral blood and serum samples from 827 individuals were collected. Patients were divided into three subgroups according to their clinical state (megacolon [n=66], megaesophagus [n=119] and cardiomyopathy [n=154]). The control group consisted of 488 blood donors properly fit for the donation. The Lewis and ABO phenotyping were performed by hemagglutination test tube and gel columns agglutination,

respectively. The IgG anti-*T. cruzi* antibodies were identified by ELISA. *FUT2* and *FUT3* genotyping were carried out by PCR-RFLP. **Results:** The mean age of patients with Chagas disease was 64.8 ± 11.2 and blood donors 34.3 ± 11.0 ($p < 0.0001$). The differences between the percentages of the sex of the patients and donors were statistically significant ($p < 0.0001$). The frequencies of ABO, Secretor and Lewis distributed in the three forms of the disease compared with each other and with donors, did not give differences statistically significant. The comparison between the ABO and Secretor combined, according to the three forms of Chagas disease, showed statistically significant differences for megaesophagus form ($p = 0.015$). The frequencies of ABO, Secretor and Lewis antigen profiles between patients and donors showed differences statistically significant in favor of BLe^b antigen ($p = 0.032$). **Conclusion:** The results suggest that the high expression of antigen B, which characterizes the B and AB blood groups under the control of functional *FUT2* (Secretor) gene acts as a risk factor for megaesophagus form of the Chagas disease.

Keywords: Histo-blood systems ABO, Secretor and Lewis, Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

Descoberta pelo médico e pesquisador Carlos Justiniano Ribeiro Chagas e considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas, a Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*.^(1,2) Em áreas endêmicas da América Latina, a prevalência é de, aproximadamente, 1,4%, levando a óbito cerca de 14.000 pessoas a cada ano.⁽³⁾ A estimativa de indivíduos infectados é em torno de 12 a 14 milhões, com 75 a 90 milhões em risco de adquirir a doença.⁽⁴⁾

Encontrada em múmias no norte do Chile e sul do Peru datando cerca de 9.000 anos, a presença do *T. cruzi* persiste por milhares de anos na natureza.⁽⁵⁾ Com o início da domesticação de animais, desmatamento de florestas, atividades agrícolas e construção de vias de comunicação, o parasito foi gradualmente introduzido ao ciclo doméstico, tornando-se assim uma zoonose.⁽⁶⁾

A doença de Chagas está relacionada, principalmente, às áreas rurais e pobres da América Central e Sul, onde ocorre a transmissão natural pelo inseto triatomíneo,⁽⁷⁾ sendo vinte e dois países considerados endêmicos.⁽⁸⁾ Anteriormente, a existência da doença estava confinada apenas às áreas endêmicas, mas nas últimas décadas, em consequência ao intenso fluxo migratório de indivíduos latino-americanos para países como os Estados Unidos, Austrália, Japão, Itália, Suíça, Espanha, Reino Unido e Alemanha, a

internacionalização da doença de Chagas se transformou em um problema de saúde global.⁽⁹⁾

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae.⁽¹⁰⁾ É capaz de infectar vários tipos de células, tais como macrófagos, fibroblastos, células do miocárdio, glias e reticuloendoteliais⁽¹¹⁾ e destaca-se por possuir uma organela bastante singular, o cinetoplasto, que é constituído de abundante DNA de tipo especial, o kDNA. Possui também um único núcleo e um flagelo que se origina do corpúsculo basal, juntamente ao cinetoplasto. Pode apresentar variações estruturais, fisiológicas, ecológicas, patogênicas e de infectividade.^(12,13)

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, envolvendo diferentes estágios de desenvolvimento nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares são encontrados no hospedeiro vertebrado, à medida que, tripomastigotas metacíclicos infectantes e epimastigotas são encontrados no vetor.⁽¹⁴⁾ A figura 1, ilustra o ciclo de vida deste protozoário.

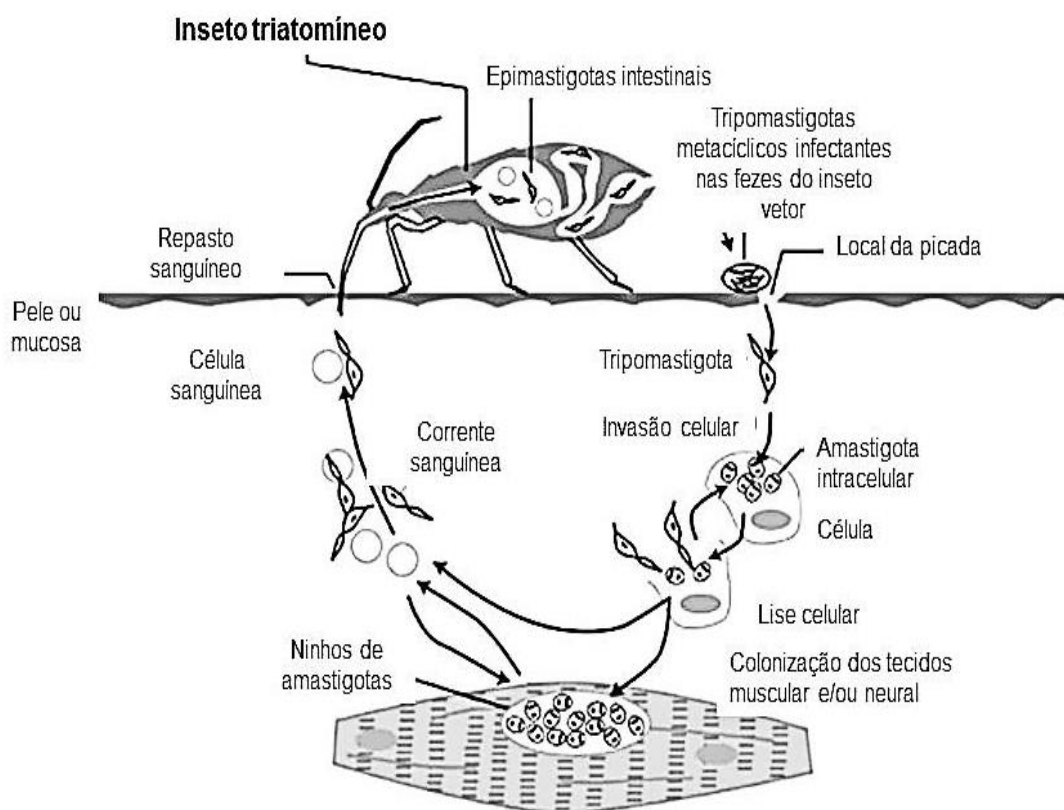


Figura 1. Ciclo de vida do *T. cruzi* em seus diferentes estágios de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado (triatomíneo) e no hospedeiro vertebrado (mamíferos). Adaptado de Macedo et al.⁽¹⁵⁾

Os primeiros estudos bioquímicos analisando as diferentes cepas do *T. cruzi* permitiram classificá-las em três tipos de zimodemas, sendo dois tipos (Z1 e Z3) associados com o ciclo de transmissão selvagem e Z2 com o ciclo de transmissão doméstica.⁽¹³⁾ O ciclo silvestre resulta da interação dos vetores e reservatórios silvestres com o parasito em distintos ecótopos naturais. O ciclo doméstico sucede da relação humana com o vetor, envolvendo a colonização de ecótopos modificados pela ação humana.⁽¹⁶⁾ Devido a isto, ao decorrer dos

anos, muitas espécies que eram vetores secundários, tais como *Triatoma sordida* e *Rhodnius neglectus*, passaram a ter um importante papel na dispersão do parasito.⁽¹⁷⁾

Mais de cem espécies de mamíferos são consideradas reservatórios naturais do *T. cruzi*. A transmissão ocorre por insetos hematófagos da ordem Hemiptera, pertencente à família Reduviidae e subfamília Triatominae.⁽⁵⁾ Esta subfamília, atualmente, é composta por mais de 145 espécies, sendo que *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* são as principais espécies vetores na transmissão ao homem.^(14,17)

A forma clássica e natural de transmissão do *T. cruzi* em humanos e outros mamíferos, ocorre pelas fezes contaminadas depositadas no local da lesão da pele, durante o repasto sanguíneo do triatomíneo.⁽¹⁸⁾ A infecção também pode ser transmitida por meio de transfusão sanguínea, considerada a segunda via de importância epidemiológica⁽¹⁹⁾ e congênita ou vertical, que atualmente afeta entre 1 a 10% dos bebês nascidos vivos de mães chagásicas.⁽²⁰⁾

Existem ainda outros mecanismos de transmissões menos incidentes, tais como transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais e pela via oral, por meio da ingestão de alimentos ou líquidos contendo as fezes contaminadas do inseto.^(21,22) Estudos recentes demonstraram que surtos de contaminação oral no Brasil e Venezuela vêm ocorrendo pela ingestão de açaí e caldo de cana-de-açúcar.⁽²³⁾ Esta via de transmissão assume um importante papel, em

relação com a interrupção vetorial obtida em alguns países da América do Sul como Brasil e o Chile.⁽²⁴⁾

1.3 Manifestações clínicas

De acordo com suas manifestações clínicas, a doença de Chagas pode ser dividida em três fases distintas: aguda, crônica indeterminada e determinada.⁽²⁵⁾

A fase aguda é caracterizada por intensa parasitemia na corrente sanguínea e excessiva ativação do sistema imune,^(26,27) podendo ser sintomática ou assintomática. Quando sintomática, as manifestações surgem após a infecção pelo parasito, apresentando mal-estar, febre, linfadenopatia, esplenomegalia leve e o envolvimento cardíaco que está relacionado, principalmente, a primeira infância. O edema unilateral bi-palpebral ou sinal de Romaña e o chagoma de inoculação, ocorre conforme a entrada do parasito no organismo hospedeiro.⁽²⁵⁾ No entanto, a maioria dos indivíduos infectados não apresentam sintomas nesta fase, devido à ausência e escassez das manifestações clínicas.⁽²⁸⁾

Após 4-10 semanas, inicia-se a fase crônica indeterminada caracterizada pela positividade sorológica para a doença de Chagas, ausência de manifestações clínicas e estudos radiológicos ou eletrocardiográficos aparentemente normais.⁽²⁹⁾ Cerca de 60-70% dos indivíduos infectados permanecem nesta fase ao longo da vida,⁽¹⁴⁾ sendo de particular interesse

médico-social e trabalhista, devido ao fato de indivíduos chagásicos assintomáticos e, em plena faixa etária produtiva da vida, serem excluídos do mercado de trabalho.^(30,31)

A fase crônica determinada da doença de Chagas está presente em torno de 30-40% dos indivíduos infectados. Ela ocorre normalmente cerca de 10-30 anos após a infecção e está associada a alterações digestivas (megacólon e megaesôfago), cardíacas (cardiopatia chagásica crônica) e cardiodigestivas.⁽¹⁴⁾

As manifestações clínicas da Cardiopatia Chagásica Crônica são arritmias,⁽³²⁾ insuficiência cardíaca crônica,⁽³³⁾ morte súbita cardíaca⁽³⁴⁾ e fenômenos tromboembólicos.⁽³⁵⁾ Do ponto de vista eletrocardiográfico, o bloqueio de ramo direito é a alteração mais comum.^(36,37)

A forma digestiva tem como principais características a dilatação intestinal e hipertrofia muscular com formação de megavísceras, sendo o megacólon e o megaesôfago as mais observadas. O megacólon se manifesta comumente como constipação intestinal e o megaesôfago como disfagia digestiva.^(38,4)

A forma clínica nervosa da doença é observada com menos frequência e se caracteriza por alterações no sistema nervoso, como de coordenação, motricidade e psiquismo.⁽²⁵⁾

A reativação da doença em indivíduos chagásicos pode ocorrer em qualquer época da vida e se manifesta como uma condição febril, acompanhado de miocardites e meningoencefalites, e está principalmente

relacionada a estado de imunodeficiência que pode ser ocasionado por transplantes de órgãos, malignidades hematológicas e corticoterapia.⁽³⁹⁾

Atualmente, vem sendo observada a reativação da doença em pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) que desenvolvem a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).⁽⁴⁰⁻⁴²⁾

1.4 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial, durante a fase aguda da doença de Chagas, é baseado na detecção do *T. cruzi* por meio de métodos parasitológicos diretos. As técnicas parasitológicas mais empregadas no diagnóstico nesta fase da doença são o exame de sangue a fresco, a gota espessa, o esfregaço sanguíneo e o teste de Strout ou QBC (*Quantitative Buffy Coat*).^(43,44)

A forma crônica da doença de Chagas é caracterizada pela baixa parasitemia no sangue periférico e pelo aparecimento dos anticorpos da classe IgG.⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ Devido a isto, o diagnóstico laboratorial deve ser realizado, preferencialmente, por métodos imunológicos, os quais detectam anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG que se ligam especificamente aos antígenos do parasito.⁽⁴²⁾ As técnicas de hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) ou ensaio imunoenzimático (ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay*), constituem os testes convencionais no diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica.^(48,49)

O diagnóstico molecular vem sendo padronizado, atualmente, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Este teste se dá pela amplificação de sequências dos nucleotídeos específicos do DNA do *T. cruzi*⁽⁴²⁾ e tem apresentado resultados promissores, permitindo-o que seja utilizado como teste confirmatório em casos inconclusivos do diagnóstico sorológico da doença.⁽⁵⁰⁾

1.5 Aspectos imunológicos

A evolução clínica da doença de Chagas é decorrente de uma complexa interação parasito-hospedeiro, que pode ser sustentada por meio de duas principais hipóteses. Uma postula que a principal causa da doença seja a persistência parasitária no organismo hospedeiro e a outra defende a resposta autoimune severa como responsável pelo dano tecidual encontrado nos órgãos afetados dos indivíduos chagásicos.^(51,52)

O envolvimento da imunidade mediada por células é de suma importância em todas as formas clínicas da doença.⁽⁵³⁾ As manifestações que ocorrem nas formas cardíacas e digestivas estão associadas à reação inflamatória nos órgãos acometidos.⁽⁵⁴⁾ Acredita-se que elevados níveis de TNF- α e IFN- γ podem ocasionar a evolução da doença e à gravidade da cardiopatia.⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾ A forma indeterminada da doença de Chagas pode ser caracterizada por uma condição de equilíbrio entre o parasito e o hospedeiro,

onde a resposta imune é de caráter particularmente anti-inflamatório nos indivíduos que desenvolvem esta forma.⁽⁵⁸⁾

Até o momento, não está esclarecido se a destruição das células do hospedeiro pela autoimunidade é iniciada por antígenos do parasito, do organismo hospedeiro ou de ambas as partes. O *T. cruzi* é capaz de produzir moléculas que mimetizam às das células hospedeiras, inibindo assim, o reconhecimento do sistema imunológico e fortalecendo a teoria da autoimunidade.⁽⁵⁹⁾

Há um consenso de que, o sistema imune do hospedeiro desempenha um papel determinante no desenvolvimento da doença, independentemente dos antígenos que desencadeiam a resposta imune e embora as teorias que buscam esclarecer os mecanismos da infecção chagásica sejam controversas, ambas precisam ser consideradas quando se propõe compreender o estabelecimento e acometimento da doença.⁽⁵⁸⁾

1.6 Sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis e a Doença de Chagas

Os glicoconjugados ABH-Lewis são constituídos de oligossacarídeos ligados a proteínas e lipídeos expressos abundantemente em diferentes tecidos humanos. A expressão dos antígenos destes sistemas depende das interações epistáticas que ocorrem sob a ação das enzimas glicosiltransferases FUTI, FUTII, FUTIII, GTA e GTB codificadas pelos genes *FUT1*, *FUT2*, *FUT3* e *ABO* respectivamente, e resulta na inserção de monossacarídeos a oligossacarídeos

precursores (Gal β 1 \rightarrow 3/4NAcGlu β 1 \rightarrow 3-R).⁽⁶⁰⁾ Deste modo, as enzimas codificadas por estes genes diversificam a estrutura original dos oligossacarídios precursores, gerando perfis teciduais de antígenos carboidratos, os quais variam de acordo com os alelos funcionais dos genes herdados.⁽⁶¹⁾

Quadro 1. Genes, Alelos, Enzimas, Oligossacarídeos e Antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis.

Genes	Alelos*	Enzimas	OPs	Antígenos
<i>H (FUT1)</i>	H	FUT1	Tipo 2	H Tipo 2
	h	Inativa	-	-
<i>SE (FUT2)</i>	Se	FUTII	Tipo 1	H Tipo 1
	se	Inativa	-	-
<i>LE (FUT3)</i>	Le	FUTIII	Tipo 1	Le ^a ; Le ^b ; ALe ^b ; BLe ^b
	le	Inativa	-	-
<i>ABO</i>	A	GTA	H Tipo 2	A
	B	GTB	H Tipo 2	B
	O	Inativa	H Tipo 2	H

*Alelos representados na genética clássica; OP: Oligossacarídeo precursor; FUT1: α -2-L-fucosiltransferase; FUTII: α -2-L-fucosiltransferase; FUTIII: α -3/4-L-fucosiltransferase; GTA: α -1,3-N-acetil-galactosaminiltransferase; GTB: α -1,3-N-galactosiltransferase.

Os indivíduos que herdam os alelos funcionais do gene *FUT1*, localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.3), expressam a enzima α -2-L-fucosiltransferase (FUT1) que atua sobre o oligossacarídeo precursor tipo 2 para convertê-lo em antígeno eritrocitário H tipo 2.⁽⁶²⁾ A biossíntese prossegue pela adição de uma molécula de α -N-Acetilgalactosamina para formar o antígeno A tipo 2, ou pela adição de uma molécula de D-Galactose para formar

o antígeno B tipo 2. Estas etapas ocorrem sob ação das glicosiltransferases α -1,3-N-Acetil-galactosaminiltransferase (GTA) ou α -1,3-N-Galactosiltransferase (GTB) que são codificadas pelos alelos A e B, respectivamente, do gene *ABO* (9q34.1).^(63,64)

O gene *FUT2* (19q13.3) codifica a enzima α -2-L-fucosiltransferase (FUTII) que adiciona uma molécula de fucose à galactose terminal do oligossacarídeo precursor tipo 1, produzindo o antígeno H tipo 1. Da mesma forma que ocorre com o antígeno H tipo 2, o H tipo 1 é convertido nos antígenos A ou B, sob controle dos alelos funcionais do gene *ABO*.^(62,65)

As interações epistáticas entre os genes *FUT1* e *ABO* irão determinar os fenótipos eritrocitários ABO, enquanto que as interações do gene *FUT2* com o *ABO*, o estado secretor dos antígenos ABH nos fluidos corporais.⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾

A perda funcional dos alelos do gene *FUT1* leva ao fenótipo Bombain, onde há a ausência de antígenos ABH nos eritrócitos, enquanto que a perda funcional do gene *FUT2* leva à expressão do fenótipo não secretor, caracterizado pela ausência dos antígenos ABH na saliva e em vários tipos de células epiteliais.^(68,69)

A expressão dos antígenos do sistema Lewis depende da interação epistática que ocorre entre as enzimas produzidas pelos genes *FUT2* e *FUT3*. O gene *FUT3* (19p13.3) codifica a enzima α -3/4-L-fucosiltransferase (FUTIII) que fucosila o oligossacarídeo precursor tipo 1, produzindo assim o antígeno Le^a. Quando esta mesma enzima utiliza como substrato o antígeno H tipo 1, produzido a partir da enzima FUTII, há a formação do antígeno Le^b. A enzima FUTIII pode ainda converter os antígenos A e B tipo 1 em ALe^b e BLe^b.^(59, 61) A

biossíntese dos antígenos ABH, Secretor e Lewis estão demonstradas na figura 2.

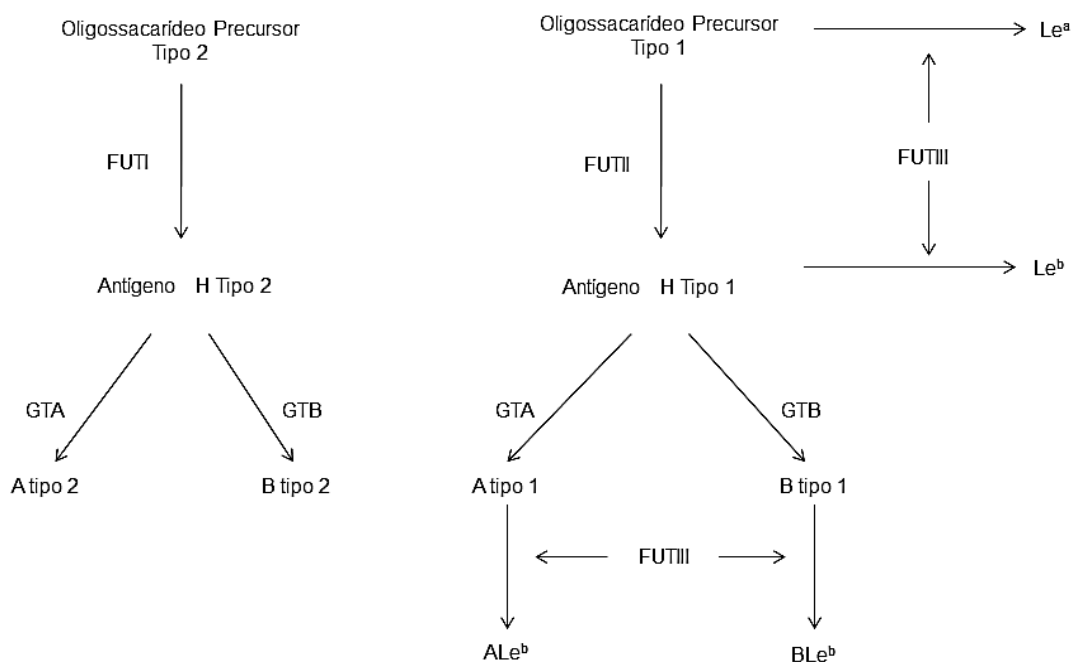


Figura 2. Representação esquemática da biossíntese dos antígenos ABH, Secretor e Lewis. FUTII: α -2-L-fucosiltransferase; FUTIII: α -3/4-L-fucosiltransferase; GTA: α -1,3-N-acetil-galactosaminiltransferase; GTB: α -1,3-N-galactosiltransferase.

Os indivíduos que expressam apenas a enzima FUTIII sintetizam o antígeno Le^a no trato gastrointestinal e são classificados como secretores negativos e fenótipo eritrocitário $Le(a+b-)$. Aqueles que expressam ambas fucosiltransferases (FUTII e FUTIII) sintetizam os antígenos Le^a e Le^b no trato gastrointestinal, sendo classificados como secretores positivos, apresentando o fenótipo eritrocitário $Le(a+b+)$. Por conseguinte, os indivíduos que não possuem

a FUTIII funcional expressam o fenótipo eritrocitário Le(a-b-), os quais poderão ser secretores positivos ou negativos, na dependência da presença ou ausência da FUTII, respectivamente.⁽⁶⁰⁾

A enzima FUTII é mais ativa sob o oligossacarídeo precursor do tipo 1 em relação à FUTIII. Desta maneira, nos indivíduos que possuem a expressão simultânea das duas fucosiltransferases, há maior produção do antígeno H tipo 1 que, posteriormente, é fucosilado pela FUTIII, convertendo-o em antígeno Le^b. Isto significa que, apesar de ocorrer a síntese de ambos os antígenos, a produção do antígeno Le^b é maior do que o Le^a, devido a enzima FUTII ser mais competitiva, levando ao fenótipo eritrocitário Le(a-b+).⁽⁷⁰⁾

Em caucasianos, a mutação mais frequente do gene *FUT2* se dá pela substituição *G428A*. Esta alteração inativa a expressão da enzima FUTII e, assim sendo, seus portadores são incapazes de sintetizar o antígeno H tipo 1. Por conseguinte, não podem expressar o antígeno Le^b mesmo na presença da forma funcional da FUTIII.⁽⁶⁰⁾

As mutações no gene *FUT3* levam à expressão da enzima FUTIII não funcional, o que caracteriza o fenótipo Le(a-b-). Várias mutações em ponto são responsáveis pela expressão deste fenótipo, dentre as mais frequentes em caucasianos, estão às mutações *T202C* e *C314T*.⁽⁷¹⁾

Há estudos relatando que os fenótipos do sistema Lewis, podem ser alterados em casos de doença e outras condições.^(72,73) Isto pode ser devido ao fato de que, estes antígenos são expressos primariamente no fígado, pâncreas, rins e no trato gastrointestinal, sendo transferidos para o plasma e posteriormente, adsorvidos aos eritrócitos.⁽⁷⁴⁾ Em consequência a estes fatores,

há um consenso de que este sistema de grupo sanguíneo seja determinado por métodos sorológicos e moleculares, simultaneamente, uma vez que foram observados resultados discrepantes entre os genótipos e o fenótipo eritrocitário Le(a-b-).⁽⁶⁷⁾

Alguns estudos despertaram a atenção para um possível envolvimento dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis na doença de Chagas. Uma investigação experimental demonstrou que a infecção de células musculoesqueléticas de embrião bovino pelas formas tripomastigotas do *T. cruzi*, pode ser inibida por diferentes monossacarídeos,⁽⁷⁵⁾ os quais estão presentes na estrutura oligossacarídica dos antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis expressos no tecido cardíaco e ao longo do trato gastrointestinal,⁽⁶⁰⁾ locais acometidos pela doença de Chagas.⁽¹⁾

Dois estudos independentes, realizados com casuísticas obtidas no Estado de Minas Gerais, que procuraram por associação entre o sistema histo-sanguíneo ABO e a doença de Chagas, foram publicados no Brasil em 1987 e em 1990. Em um deles, os autores analisaram apenas os fenótipos eritrocitários do sistema ABO em pacientes chagásicos crônicos e pacientes assintomáticos, bem como em controles saudáveis.⁽⁷⁶⁾ O outro estudo avaliou diferentes polimorfismos, dentre eles o do sistema ABO, entre indivíduos infectados pelo *T. cruzi* em relação àqueles com as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas.⁽⁷⁷⁾

Nos dois estudos^(76,77) todos os pacientes com as formas “mega” da doença (cardiomegalia, megaesôfago e megacólon) foram agregados em um único grupo. Tendo em consideração que, os órgãos acometidos por estas

formas “mega” são de origens embrionárias distintas (coração: mesodérmico; esôfago e cólon: endodérmicos) e que o controle genético da expressão dos antígenos do sistema histo-sanguíneo ABO também difere entre estes órgãos,⁽⁶²⁾ estas características devem ser consideradas em estudos que buscam associação destes sistemas com doenças infecto-parasitárias como a doença de Chagas.⁽⁶⁷⁾ A origem embrionária de um tecido determinará em última instância, que gene (*FUT1* ou *FUT2*) irá controlar a expressão dos antígenos do sistema histo-sanguíneo ABO bem como se o gene *FUT3* irá ou não contribuir para a diversificação dos antígenos teciduais.⁽⁶²⁾

À vista disso, a expressão dos antígenos do sistema histo-sanguíneo ABO nos eritrócitos e no tecido cardíaco (ambos de origem mesodérmica) ocorre sob controle de dois genes (*FUT1* e *ABO*) e é diferente daquela que ocorre no esôfago e no cólon (ambos de origem endodérmica), cuja expressão é controlada pela ação de três genes (*FUT2*, *ABO* e *FUT3*).^(60,62)

Ainda nos anos 80 foi relatado que epítomos da laminina murina reconhecidos pelo soro de pacientes chagásicos estão presentes em oligossacarídeos contendo terminações Gal α 1 \rightarrow 3Gal.⁽⁷⁸⁾ Neste mesmo período foi demonstrado que anticorpos naturais anti-Gal reagem de forma cruzada com componentes do antígeno B do sistema histo-sanguíneo ABO.⁽⁷⁹⁾ Os níveis de anticorpos anti-laminina murina presentes no soro de pacientes chagásicos mostraram-se mais elevados naqueles dos grupos A e O em comparação àqueles dos grupos B e AB.⁽⁸⁰⁾ Estes dados reforçam a proposição de Teixeira e colaboradores (1987) de que existem potenciais associações

entre o sistema histo-sanguíneo ABO e a doença de Chagas.⁽⁷⁶⁾ Estas relações foram investigadas no presente estudo.

1.7 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi testar a hipótese de que os antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis estão associados às diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

1.7.1 Objetivos específicos

- Compor dois grupos de indivíduos assim constituídos: Grupo 1 (G1) – pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas (subdivididos em subgrupos de acordo com as formas cardíaca, megaesôfago e megacólon); Grupo 2 (G2) – doadores de sangue com sorologia não reagente para doença de Chagas.
- Verificar a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro dos pacientes e doadores de sangue, como indicadores de infecção;
- Identificar os fenótipos ABO, Secretor (Secretor, não Secretor) e Lewis [Le(a+b-), Le(a-b+), Le(a-b-)] nos dois grupos;
- Determinar os genótipos Secretor (*FUT2*) e Lewis (*FUT3*) de todos os pacientes e doadores fenotipados como Le(a-b-);

- Verificar se um ou mais antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis (inferidos a partir dos fenótipos e genótipos) estavam associados às formas clínicas da doença de Chagas.

Casuística e Métodos

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos do estudo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP (Parecer 009/2011) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP (Parecer 623/2011). Cada participante assinou o termo de consentimento livre e esclarecido após receber explicações sobre os objetivos do estudo e os procedimentos a serem utilizados na pesquisa.

2.2 Casuística

No período de fevereiro de 2011 a setembro de 2013 foram selecionados 339 pacientes adultos, consecutivos, de ambos os sexos, independente de etnia, com o diagnóstico clínico da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Cardiologia e Cirurgia Geral do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina (HB-FUNFARME), São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil, um hospital-escola de atendimento pelo sistema público de saúde. Os critérios de exclusão adotados para os pacientes foram: menores de 18 anos, portadores de outras doenças infecciosas e parasitárias, portadores de qualquer doença concomitante que possa induzir o

aparecimento de cardiopatia crônica e pacientes com qualquer tipo de deficiência mental. Este grupo foi separado em três subgrupos de acordo com sua forma clínica, sendo 66 pacientes com a forma megacólon, 119 pacientes com a forma megaesôfago e 154 pacientes com a forma cardíaca.

Neste mesmo período foram selecionados ainda 488 doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto para a composição do grupo controle. O critério de inclusão estabelecido para os doadores foi o de apresentar resultados não reagentes para doença de Chagas (Hemaglutinação e Imunofluorescência) para os exames sorológicos rotineiros.

2.2.1 Diagnóstico clínico da doença de Chagas

A avaliação clínica dos pacientes foi realizada pelos médicos colaboradores do projeto e responsáveis por cada especialidade, tendo como critério a história clínica dos pacientes, exames diagnósticos, dados epidemiológicos e sorologia reagente para a doença de Chagas.

Os exames diagnósticos utilizados para a forma megacólon foram Manometria Anorretal e RX de Enema Opaco; para a forma megaesôfago Manometria Esofágica e RX de Sierigrafia e para a forma cardíaca Eletrocardiograma, Ecocardiograma e RX de Tórax.

2.2.2 Coleta de sangue

De cada paciente participante da pesquisa foram coletados por punção venosa três tubos com anticoagulante (EDTA) e dois tubos sem anticoagulante, cada qual contendo 5 mL de sangue periférico. Dos doadores de sangue, foi coletado apenas um tubo com anticoagulante (EDTA) e outro sem anticoagulante, contendo 5 mL de sangue periférico.

As amostras com EDTA foram utilizadas para a realização das fenotipagens ABO e Lewis e para a extração do DNA genômico humano. Das amostras sem anticoagulante obtivemos o soro, os quais foram estocados a -20°C até o momento do uso para a pesquisa dos anticorpos da classe IgG anti-*T. cruzi*.

2.3 Métodos

2.3.1 Identificação dos fenótipos eritrocitários do sistema ABO

A identificação dos fenótipos eritrocitários do sistema sanguíneo ABO foi realizada pelo método de hemaglutinação em tubos (direta e reversa), de acordo com o protocolo de Mattos e colaboradores.⁽⁸¹⁾

Para a fenotipagem direta foi adicionada uma gota de suspensão de hemácias a 5% (preparada em solução isotônica) a três tubos devidamente identificados, contendo respectivamente uma gota dos anti-soros anti-A, anti-B e anti-A,B. A fenotipagem reversa ocorreu pela adição de uma gota da solução

de hemácias do tipo A1, B e O em cada tubo identificado, seguido do plasma sanguíneo do paciente. Para as ambas fenotipagens os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por cerca de 1 minuto. Os resultados foram analisados e interpretados em graus de aglutinação (0, 1+, 2+, 3+ e 4+), onde se obteve resultados complementares e concordantes. Assim foram identificados os fenótipos eritrocitários A, B, AB e O (Figura 3).

2.3.2 Identificação dos fenótipos eritrocitários do sistema Lewis

A identificação dos fenótipos eritrocitários do sistema Lewis foi feita pelo método de hemaglutinação em colunas de gel de centrifugação, com o protocolo validado por Cintra e colaboradores.⁽⁸²⁾

Para cada amostra foi preparada uma suspensão de hemácias a 3% em meio isotônico fornecido pelo fabricante e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Um volume de 12 µL de cada suspensão foi adicionado às colunas de gel, as quais continham os anticorpos Le^a e Le^b (DiaMed, Lagoa Santa, MG; Brasil), respectivamente. Em seguida, os cartões foram centrifugados por 10 minutos a 1.000 rpm. Os resultados foram interpretados em graus de aglutinação (0, 1+, 2+, 3+ e 4+), identificando-se assim os fenótipos Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-) (Figura 4).

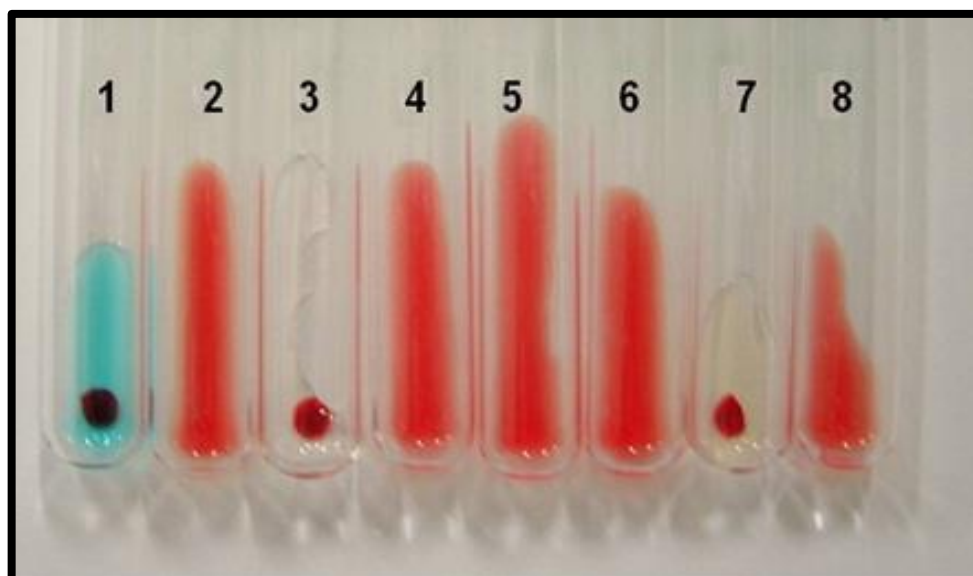


Figura 3. Ilustração da fenotipagem eritrocitária do sistema ABO pelo método de hemaglutinação em tubos. 1, 2 e 3 representam a fenotipagem direta; 4 e 5 fenotipagem Rh e 6, 7 e 8 a fenotipagem reversa. A figura ilustra o fenótipo de um paciente pertencente ao grupo sanguíneo A.

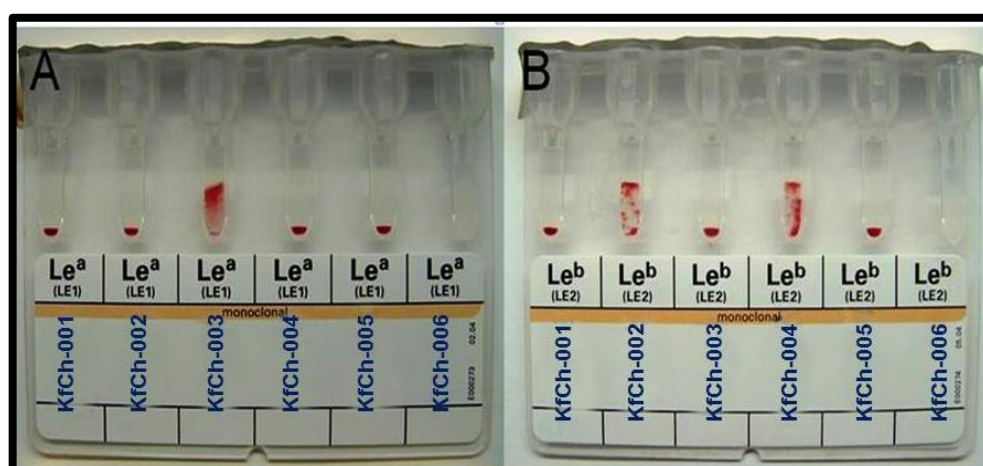


Figura 4. Ilustração da fenotipagem eritrocitária Lewis pelo método em colunas de gel de centrifugação. No cartão A, identificamos os antígenos Le^a e no cartão B, os antígenos Le^b . As amostras KFCh-001, KFCh-002 e KFCh-003 ilustram os fenótipos eritrocitários $Le(a-b-)$, $Le(a-b+)$ e $Le(a+b-)$, respectivamente.

2.3.3 Identificação dos fenótipos Secretor/não-Secretor inferidos da fenotipagem Lewis

A identificação dos fenótipos Secretor e não Secretor foi inicialmente inferida a partir das fenotipagens eritrocitárias Lewis. Os indivíduos Le(a-b+) foram considerados “Secretores” e os Le(a+b-) “não Secretores”. Os indivíduos que possuíam o fenótipo Le(a-b-), a identificação do fenótipo Secretor ou não Secretor foi realizada por meio da identificação da substituição *G428A* do gene *FUT2* por PCR-RFLP. Estes não possuem a enzima FUTIII funcional devido a mutações que inativam o gene *FUT3*, em razão disso não expressam os antígenos Le^a e Le^b.

2.3.4 Identificação de anticorpos da classe IgG anti-*T. cruzi*.

A pesquisa da presença ou ausência de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG foi realizada pelo método ELISA (Elisa *cruzi*, bioMérieux, Brasil S.A) de acordo com as instruções do fabricante, obedecidas rigorosamente.

2.3.5 Extração de DNA genômico humano

A extração do DNA genômico humano foi realizada a partir de amostras contendo 5 mL de sangue venoso colhido com EDTA, de acordo com o protocolo de Mattos e colaboradores.⁽⁸³⁾

As amostras de sangue foram lavadas e centrifugadas com tampão PBS a 4.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante contendo o plasma foi descartado. Em seguida, para lise das hemácias, foi adicionado o tampão ACK (150 mM clorato de amônia, 1 mM bicarbonato de potássio, 0.1 mM EDTA, pH 7.2-7.4), sendo incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação lenta e centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm. O *pellet* do sangue, contendo somente as células nucleadas foi digerido com proteinase K (20 mg/mL), RNase A (20 mg/mL em 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) e agitado por vortex. Para dar continuidade ao procedimento, foi utilizado o kit comercial PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen, Carlsbad, CA), obedecendo rigorosamente as instruções do fabricante.

2.3.6 Avaliação da concentração e pureza do DNA genômico

Foram utilizados 2 μ L de tampão de eluição do kit comercial PureLink Genomic DNA Kits como controle de contaminação (branco) e 2 μ L de DNA genômico de cada amostra.

A leitura da concentração e a pureza do DNA foram determinadas por proporção de Densidade Óptica (D.O.) a 260-280nm em um espectrofotômetro Epoch (BioTek Instruments, VT, USA).

2.3.7 Identificação dos genótipos da substituição *G428A* do gene *FUT2*

A identificação dos alelos *GG*, *GA* e *AA* para investigar a substituição *G428A* do gene *FUT2* foi feita pelo método PCR-RFLP, de acordo com adaptações do protocolo descrito por Svensson e colaboradores.⁽⁸⁴⁾ Esta estratégia foi adotada para se definir corretamente o fenótipo secretor ou não secretor.

Para cada amostra de DNA genômico foi realizada uma reação de amplificação gênica com volume final de 25 µL. Nesta reação foram adicionados 17,0 µL de água MilliQ, 2,5µL de PCR Buffer 10X (-MgCl₂, Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 1,0 µL de dNTPs (0,2 mM; dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Invitrogen), 0,4 µL de primer *FUT2-G428A-9802s* Sense (25 pM; 5' – GCC TTT CTC CTT TCC CAT GGC CCA C – 3'), 0,4 µL de primer *FUT2-G428A-9803as* Anti-sense (25 pM; 5' – TCA AAG GAC GGG CCA GCA TTA GTG C – 3') (Integrated DNA Technologies), 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (5U/µL - Invitrogen) e 2,0 µL de DNA genômico a 100 ng. Como controle interno de contaminação, foi preparado para cada mix, um tubo de reação sem adição de DNA genômico (branco). As condições de amplificação foram de 94°C 2 minutos, 5 ciclos de 94°C 30 segundos, 68°C 30 segundos, 72°C 30 segundos, 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 64°C 30 segundos e 72°C 45 segundos, permanecendo em 4°C infinito. O fragmento amplificado contendo 1033 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio por cerca de 40 minutos a 120 volts (Figura 5).

Uma alíquota de 15,0 µL do produto de PCR foi adicionada a um mix contendo 2,5 µL de água MilliQ, 2,0 µL de tampão da enzima (10x Fast Digest Green Buffer-Fermentas), 0,5 µl da enzima Fast Digest *Ava* II (ECO 47I, Fermentas) e incubada a 37°C por 40 minutos. O produto de digestão foi clivado em quatro fragmentos de 459, 295, 149 e 130 pb para o genótipo *GG*, em cinco fragmentos de 459, 425, 295, 149 e 130 pb para o genótipo *GA* e três fragmentos de 459, 425 e 149 pb para o genótipo *AA*. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose a 1,2%, corado com brometo de etídio, à corrida eletroforética de 180 minutos a 90 volts (Figura 6).

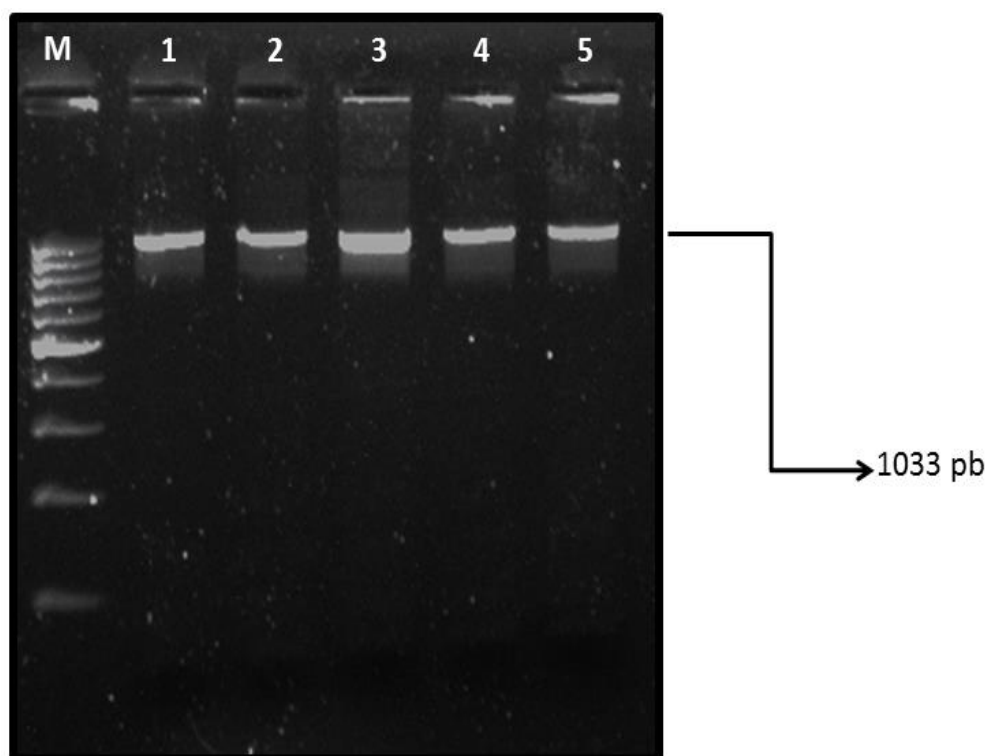


Figura 5. Fragmento de 1033 pb do gene *FUT2*, amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP) e avaliado em eletroforese por gel de agarose à 2%. O M indica o marcador de 100 pb; 1-5 indicam as amostras amplificadas.

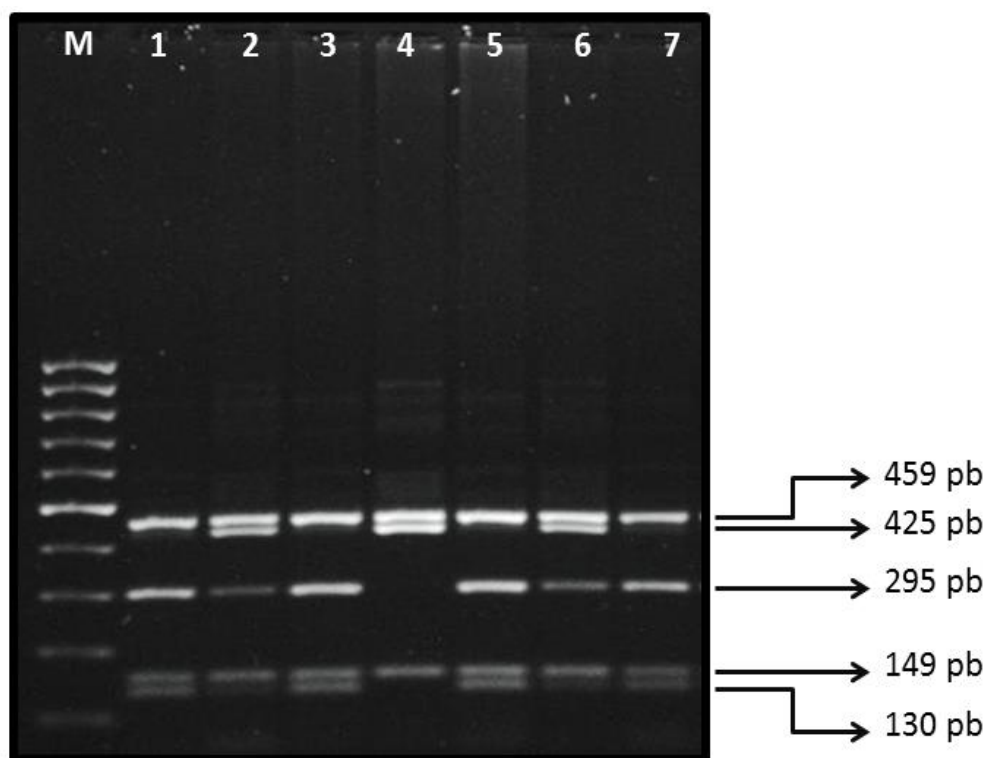


Figura 6. Perfil eletroforético do fragmento de 1033 pb da substituição *G428A* do gene *FUT2*, clivado com a enzima de restrição *Ava* II e avaliado por eletroforese em gel de agarose à 1.2%. M indica o marcador de 100 pb; as amostras 1, 3, 5 e 7 são do genótipo GG, as amostras 2 e 6 são do genótipo GA e a amostra 4 do genótipo AA

2.3.8 Identificação da substituição *T202C* do gene *FUT3* dos pacientes e doadores portadores do fenótipo Le(a-b-)

A identificação dos alelos *TT*, *TC* e *CC* para investigar a substituição *T202C* do gene *FUT3* ocorreu por meio do método de PCR-RFLP, de acordo com alterações no protocolo de Orntoft e colaboradores.⁽⁸⁵⁾ Esta estratégia foi adotada para se definir corretamente o fenótipo Le(a-b-).

Para cada amostra de DNA genômico foi realizada uma reação de amplificação gênica com volume final de 25 µl. Nesta reação foram adicionados 17,0 µL de água MilliQ, 2,5 µL de 10X PCR Buffer 10X (-MgCl₂, Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 1,0 µL de dNTP (0,2 mM; dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Invitrogen), 0,4 µL de primer *FUT3-T202C-VE2mms* Sense (25 pM; 5' - CCC GCC CCA CCC TCC TGA TCC TGG TA - 3'), 0,4 µL de primer *FUT3-T202C-VE3as* Anti-sense (25 pM; 5' - CGT AGG GCC TGA AGA TGT CGG AGT C - 3') (Integrated DNA Technologies), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µl, Invitrogen) e 2,0 µL de DNA genômico a 100 ng. Como controle interno de contaminação, foi realizado para cada mix, um tubo de reação sem adição de DNA genômico (branco). As condições de amplificação foram de 1 ciclo de 94°C 1 minuto, 30 ciclos de 94°C 30 segundos, 63°C 35 segundos e 72°C 30 segundos e 1 ciclo de 72°C 1 minuto, permanecendo em 4°C infinito. O fragmento amplificado contendo 332 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, por cerca de 40 minutos a 120 volts (Figura 7).

Uma alíquota de 15,0 µL do produto de PCR foi adicionada a um mix contendo 2,5 µL de água MilliQ, 2,0 µL de tampão da enzima (10x Fast Digest Green Buffer-Fermentas), 0,5 µl da enzima Fast Digest *Rsa* I (Fermentas) e incubada a 37°C por 40 minutos. O produto de digestão foi clivado em dois fragmentos de 209 e 123 pb para o alelo *TT*, em três fragmentos de 209, 123 e 100 pb para o alelo *TC* e dois fragmentos de 209 e 100 pb para o alelo *CC*. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio à corrida eletroforética de 90 minutos a 90 volts. A figura 8 ilustra o perfil eletroforético do fragmento de 332 pb do gene *FUT3* após digestão com a enzima *Rsa* I.

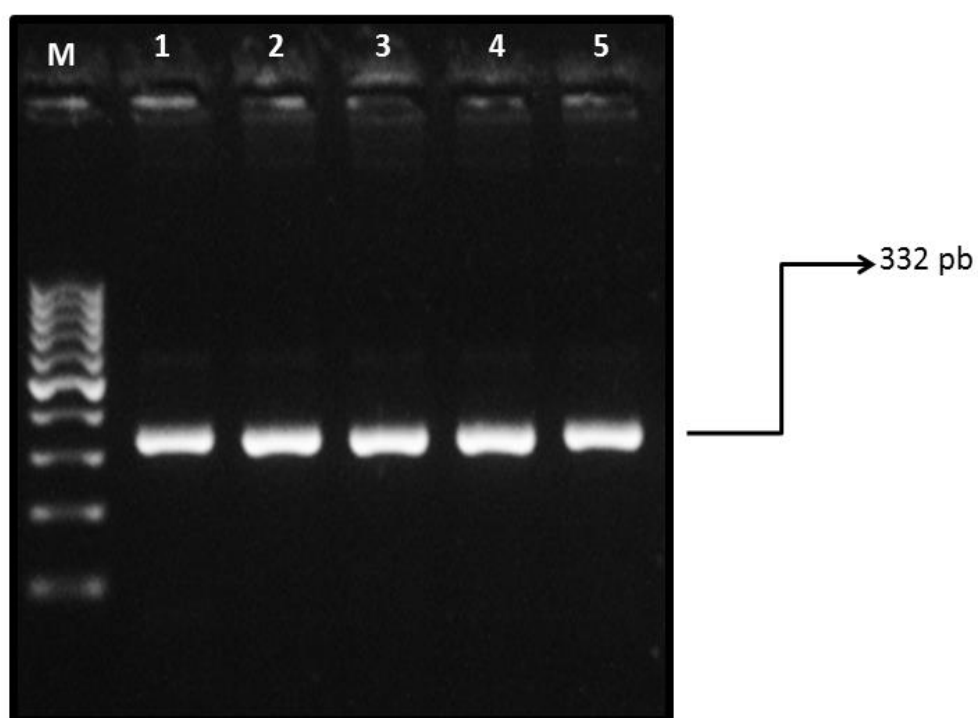


Figura 7. Fragmento de 332 pb do gene *FUT3*, amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP) e avaliado em eletroforese por gel de agarose a 2%. O M indica o marcador de 100 pb; 1-5 indicam as amostras amplificadas.

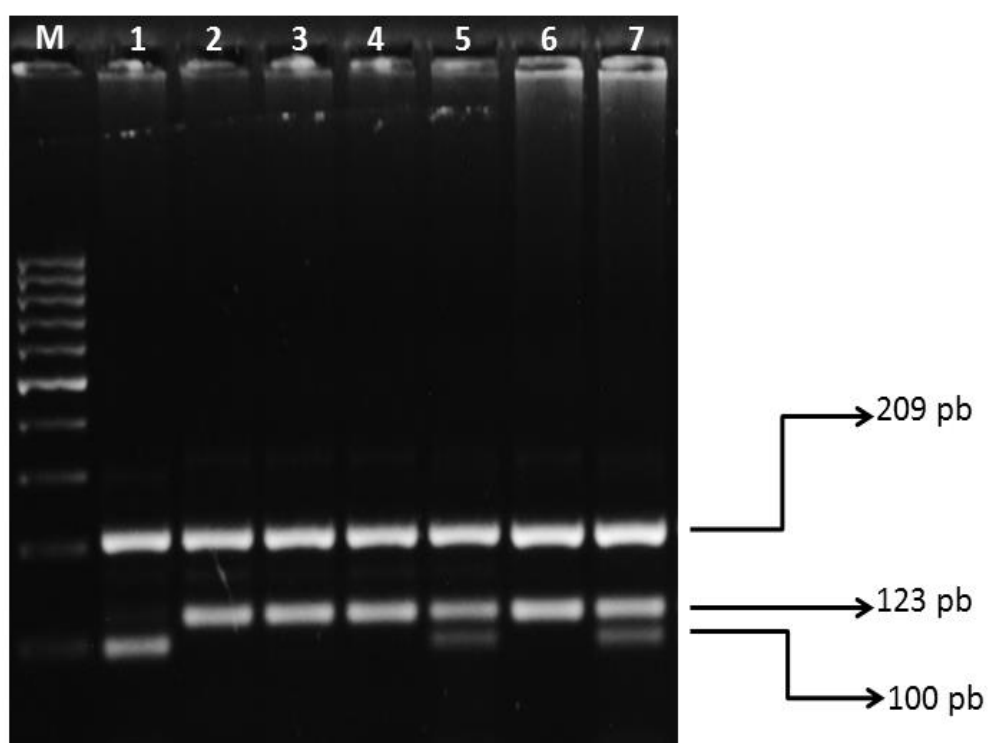


Figura 8. Perfil eletroforético do fragmento de 332 pb da substituição *T202C* do gene *FUT3*, clivado com a enzima de restrição *Rsa* I e avaliado por eletroforese em gel de agarose à 2%. M indica o marcador de 100 pb; a amostra 1 o genótipo CC, as amostras 2, 3, 4 e 6 são do genótipo TT e as amostras 5 e 7 do genótipo TC.

2.3.9 Identificação da substituição *C314T* do gene *FUT3* dos pacientes e doadores portadores do fenótipo Le(a-b-)

A identificação dos alelos *CC*, *CT* e *TT* para investigar a substituição *C314T* do gene *FUT3* ocorreu por meio do método de PCR-RFLP, de acordo com alterações no protocolo de Orntoft e colaboradores.⁽⁸⁵⁾ Esta estratégia foi adotada para se definir corretamente o fenótipo Le(a-b-).

Para cada amostra de DNA genômico foi realizada uma reação de amplificação gênica com volume final de 25 µl. Nesta reação foram adicionados 17,0 µL de água MilliQ, 2,5 µL de PCR Buffer 10X (-MgCl₂, Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 1,0 µL de dNTP (0,2 mM; dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Invitrogen), 0,4 µL de primer *FUT3-C314T-EL3s* Sense (25 pM; 5' – AGT GGG TCC TCC CCG ACA GGA CAC CAC TCC - 3'), 0,4 µL de primer *FUT3-C314T-VE4as* Anti-sense (25 pM; 5' – GTT GGA CAT GAT ATC CCA GTG GTG CAC GAT - 3') (Integrated DNA Technologies), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µl, Invitrogen) e 2,0 µL de DNA genômico a 100 ng. Como controle interno de contaminação, foi realizado para cada mix, um tubo de reação sem adição de DNA genômico (branco). As condições de amplificação foram 1 ciclo de 94°C 1 minuto, 30 ciclos de 94°C 30 segundos, 65°C 30 segundos e 72°C 30 segundos e 1 ciclo de 72°C 1 minuto, permanecendo em 4°C infinito. O fragmento amplificado contendo 204 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, por cerca de 40 minutos a 120 volts (Figura 9).

Uma alíquota de 15,0 μL do produto de PCR foi adicionada a um mix contendo 2,5 μL de água MilliQ, 2,0 μL de tampão da enzima (10x Fast Digest Green Buffer-Fermentas), 0,5 μL da enzima Fast Digest *Nla* III (Fermentas) e incubada a 37°C por 40 minutos. O produto de digestão foi clivado em dois fragmentos de 139 e 65 pb para o alelo *CC*, em três fragmentos de 139, 105 e 65 pb para o alelo *CT* e dois fragmentos de 105 e 65 pb para o alelo *TT*. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio à corrida eletroforética de 90 minutos a 90 volts, conforme figura 10.

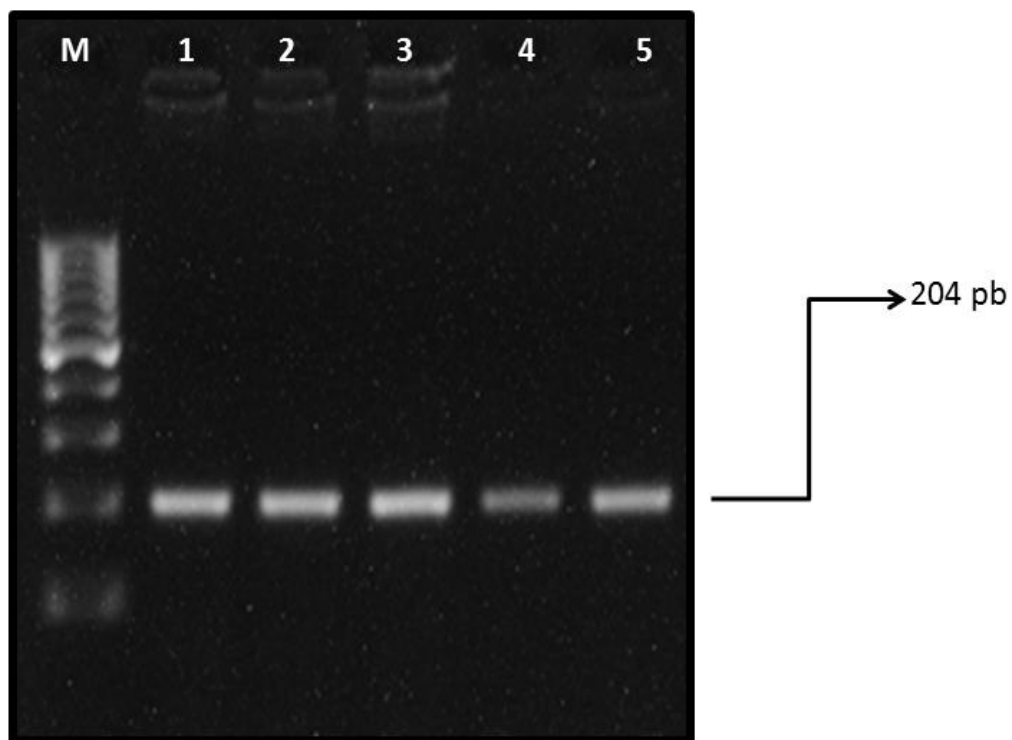


Figura 9. Fragmento de 204 pb do gene *FUT3*, amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP) e avaliado em eletroforese por gel de agarose à 2%. O M indica o marcador de 100 pb; 1-5 indicam as amostras amplificadas.

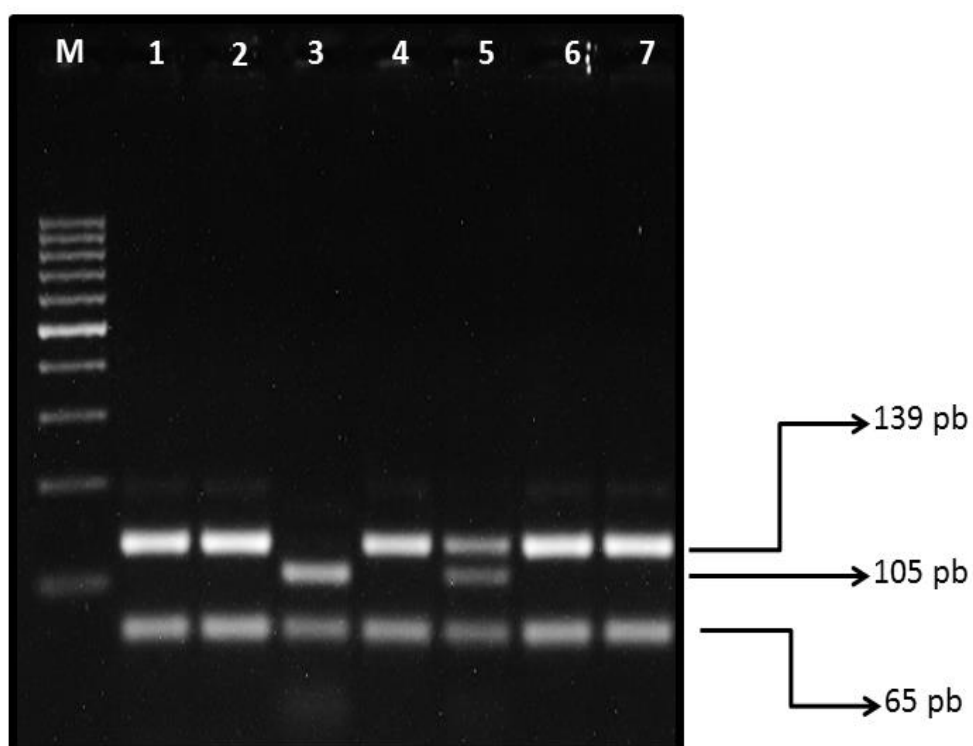


Figura 10. Perfil eletroforético do fragmento de 204 pb da substituição *C314T* do gene *FUT3*, clivado com a enzima de restrição *Nla* III e avaliado por eletroforese em gel de agarose à 2%. M indica o marcador de 100 pb; as amostras 1, 2, 4, 6 e 7 são do genótipo CC; a amostra 3 é do genótipo TT e a amostra 05 do genótipo CT.

2.3.10 Análise estatística

Os resultados foram analisados com o uso do software Grahpad, versão 3.1. O teste exato de Fisher, o valor de Odds Ratio (OR) e o Qui-quadrado foram calculados e utilizados para comparar a independência entre as proporções. Os valores médios de idade foram comparados com o uso do teste t. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando o valor $p \leq 0,05$ e intervalo de confiança a 95%.

Resultados

3. RESULTADOS

Neste estudo foram analisados 827 indivíduos. O grupo de estudo foi composto por 339 pacientes portadores da forma crônica da doença de Chagas e este separado em três subgrupos de acordo com sua forma clínica (66 pacientes com a forma megacólon, 119 pacientes com a forma megaesôfago e 154 pacientes com a forma cardíaca). O grupo controle foi composto por 488 doadores de sangue com sorologia não reagente para a doença de Chagas.

A média de idade do total de pacientes com a forma crônica da doença de Chagas foi de $64,8 \pm 11,2$ e dos doadores de sangue foi de $34,3 \pm 11,0$ ($p < 0,0001$). As diferenças entre as porcentagens do sexo dos pacientes chagásicos e doadores de sangue foram estatisticamente significantes ($p < 0,0001$). A frequência do sexo feminino foi de 56,6% e do sexo masculino de 43,4% nos pacientes chagásicos e nos doadores de sangue a frequência do sexo feminino foi de 29,1% e o masculino de 70,9%, conforme tabela 1.

Tabela 1. Valores de média de idade em anos e desvio-padrão (DP) e sexo de acordo com as formas crônicas da doença de Chagas em pacientes e doadores de sangue.

	Doadores		Pacientes		MGC		MGE		CAR	
Média ± DP	34.3 (±11.0) ^a		64.8 (±11.2) ^b		67.2 (±10.1)		65.1 (±12.3)		63.6 (±10.6)	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Feminino	142 ^c	29,1	192 ^d	56,6	42	63,6	64	53,8	86	55,8
Masculino	346 ^c	70,9	147 ^d	43,4	24	36,4	55	46,2	68	44,2
Total	488		339		66		119		154	

MGC: megacólon; MGE: megaesôfago; CAR: cardiomiopatia; DP: Desvio Padrão; a x b ($p < 0,0001$); c x d ($p < 0,0001$).

Ao analisarmos as frequências dos fenótipos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis comparando o grupo de pacientes chagásicos com os de doadores de sangue, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, uma vez que, os fenótipos ABO apresentaram os valores de X^2 : 2.635 e $p= 0,451$, os fenótipos Secretor X^2 : 0.056 e $p= 0,8123$ e os fenótipos Lewis X^2 : 2.092 e $p= 0,351$, conforme tabela 2.

Tabela 2. Frequências dos fenótipos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis dos pacientes chagásicos e doadores de sangue.

Fenótipos	Pacientes		Doadores		OR	IC 95%	p*
	N	%	N	%			
ABO**							
A	133	39,2	177	36,3	1.134	0.852-1.510	0,421
B	44	13,0	54	11,1	1.199	0.783-1.833	0,444
AB	11	3,2	23	4,7	0.678	0.325-1.410	0,373
O	151	44,5	234	47,9	0.871	0.660-1.152	0,357
Secretor***							
Secretor	272	80,2	396	81,0	0.943	0.664-1.339	0,787
Não secretor	67	19,8	92	19,0			
Lewis****							
Le(a+b-)	65	19,2	87	17,8	1.093	0.7657-1.561	0,6486
Le(a-b+)	264	77,9	377	77,3	1.036	0.7432-1.445	0,8657
Le(a-b-)	10	2,9	24	4,9	0.587	0.2772-1.246	0,2122
Total	339	100	488	100			

*Valores calculados com o teste exato de Fisher.

ABO: X^2 : 2.635, $p= 0,451$; *Secretor: X^2 : 0.056, $p= 0,8123$; ****Lewis: X^2 : 2.092, $p= 0,351$.

Em relação às frequências dos fenótipos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis distribuídos nas três formas da doença, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. Os fenótipos ABO obteve os valores de X^2 : 4.718 e $p= 0,580$, os fenótipos Secretor X^2 : 1.652 e $p= 0,437$ e os fenótipos Lewis X^2 : 8.432 e $p= 0,077$, conforme a tabela 3.

Tabela 3. Frequências dos fenótipos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis de acordo com as formas crônicas da doença de Chagas.

Fenótipos	Forma MGC		Forma MGE		Forma CAR		X^2	GL	*p
	N	%	N	%	N	%			
ABO									
A	25	37,9	44	37,0	64	41,6	4.718	6	0,580
B	13	19,7	15	12,6	16	10,4			
AB	1	1,5	5	4,2	5	3,2			
O	27	40,9	55	46,2	69	44,8			
Secretor									
Secretor	54	81,8	91	76,5	127	82,5	1.652	2	0,437
Não secretor	12	18,2	28	23,5	27	17,5			
Lewis									
Le(a+b-)	12	18,2	28	23,5	25	16,2	8.432	4	0,077
Le(a-b+)	49	74,2	89	74,8	126	81,8			
Le(a-b-)	5	7,6	2	1,7	3	1,9			
Total	66		119		154				

MGC: megacólon; MGE: megaesôfago; CAR: cardiomiopatia; *Valores calculados com o teste de Qui-quadrado.

A comparação entre os fenótipos combinados do sistema sanguíneo ABO (B+AB versus A+O) e Secretor (GG+GA versus AA) de acordo com as três formas da doença de Chagas (tabela 4) mostrou os seguintes valores:

- megacólon: X^2 : 0.001; GL: 1; $p= 0,971$; OR= 1.429 (IC 95%: 0.274-7.428); teste exato de Fisher $p= 1000$;

- megaesôfago: X^2 : 5.909; GL: 1; $p= 0,015$; OR= 16.343 (IC 95%: 0.955-279.58) e o teste exato de Fisher $p= 0,003$;

- cardiomiopatia: X^2 : 1.815; GL: 1; $p= 0,177$; OR= 4.860 (IC 95%: 0.623-37.905); teste exato de Fisher $p= 0,126$.

Tabela 4. Frequências combinadas dos fenótipos ABO e genótipos *FUT2* (Secretor/Não-secretor) dos pacientes chagásicos de acordo com as formas crônicas da doença de Chagas.

	Pacientes chagásicos											
	MGC*				MGE**				CAR***			
	B + AB		A + O		B + AB		A + O		B + AB		A + O	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
GG/GA	12	85,7	42	80,8	20	100,0	71	71,7	20	95,2	107	80,5
AA	2	14,3	10	19,2	0	0	28	28,3	1	4,8	26	19,5
Total	14	100	52	100	20	100	99	100	21	100	133	100

MGC: megacólon; MGE: megaesôfago; CAR: cardiomiopatia

* X^2 : 0.001; GL: 1; $p= 0,971$; OR= 1.429 (IC 95%: 0.274-7.428); teste exato de Fisher $p= 1000$;

** X^2 : 5.909; GL: 1; $p= 0,015$; OR= 16.343 (IC 95%: 0.955-279.58); teste exato de Fisher $p=$

0,003; *** X^2 : 1.815; GL: 1; $p= 0,177$; OR= 4.860 (IC 95%: 0.623-37.905); teste exato de Fisher $p= 0,126$.

Ao compararmos as frequências dos perfis antigênicos entre os pacientes chagásicos e os doadores de sangue, obtivemos diferença estatisticamente significativa para o perfil de antígenos BLe^b com o X^2 : 4.569 e $p= 0,032$, conforme a tabela 5.

Tabela 5. Frequências de perfis antigênicos de pacientes chagásicos e doadores de sangue.

ABO	Secretor	Lewis	Antígeno	Pacientes		Doadores		X^2	GL	p*
				N	%	N	%			
A	Positivo	Positivo	ALe ^b	96	97,0	143	96,6	0.052	1	0,818
		Negativo	A	3	3,0	5	3,4	0.040	1	0,840
B	Positivo	Positivo	BLe ^b	39	95,1	34	91,9	4.569	1	0,032*
		Negativo	B	2	4,9	3	8,1	0.002	1	0,963
AB	Positivo	Positivo	ABLe ^b	11	100,0	19	95,0	0.090	1	0,763
		Negativo	AB	0	0	1	5,0	0.695	1	0,404
O	Positivo	Positivo	Le ^b	118	97,5	182	95,3	0.433	1	0,510
		Negativo	H	3	2,5	9	4,7	0.703	1	0,401
ABO	Negativo	Positivo	Le ^a	65	97,0	86	93,5	0.226	1	0,633
		Negativo	Le ^c (OP)	2	3,0	6	6,5	0.316	1	0,573
Total				339		488				

*OR= 1.736 (IC 95%: 1.071-2.813); teste exato de Fisher $p= 0,0253$.

Discussão

4. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que os antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis estão associados às diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Observamos diferenças estatisticamente significantes em relação à idade dos pacientes chagásicos comparados aos doadores de sangue, sendo a média de idade dos pacientes maior do que a dos doadores.

Alguns dos principais requisitos para a doação sanguínea é que o indivíduo seja saudável e tenha entre 18 a 67 anos,⁽⁸⁶⁾ o que pode levar a um perfil mais jovem desta parcela altruísta da população.

A doença de Chagas por ser de natureza crônica, desenvolve sinais clínicos habitualmente após 10-30 anos à infecção,⁽¹⁴⁾ levando a população de indivíduos infectados à média de idade mais avançada.⁽⁸⁷⁾ Acredita-se que a implantação do Programa Nacional de Controle Vetorial da doença de Chagas na década de 50, que adotou medidas para interrupção vetorial e controle da infecção, tenha tido impacto na prevalência da doença de Chagas nas diferentes faixas etárias.^(88,89) Os dados deste estudo confirmam esta condição.

A maior frequência do sexo feminino observada nos pacientes chagásicos discorda da maioria dos estudos encontrados na literatura que evidencia o sexo masculino com maior acometimento da doença de Chagas.^(17,90-92) Contudo, nossos resultados concordam com os dados do estudo realizado na cidade de Montes Claros, estado de Minas Gerais, o qual observou maior frequência de infecção em mulheres.⁽⁹³⁾ Do mesmo modo,

outro trabalho feito na Europa com imigrantes infectados pelo *T. cruzi*, oriundos de áreas endêmicas, revelou prevalência do sexo feminino.⁽⁹⁴⁾

Em um estudo realizado por Gomes e colaboradores, foi observado que a procura por homens dos serviços de atenção básica à saúde é menor do que por mulheres. Isto pode implicar questões culturais que seguem padrões de diferença entre os gêneros, tais como a ideia de virilidade e invulnerabilidade masculina. Há ainda a escassez de programas e unidades de saúde específicas voltadas para o cuidado do homem, o que dificulta o acesso dos mesmos.⁽⁹⁵⁾ Desta forma, considerando as características aqui relatadas, podemos sugerir que devido à seleção da casuística analisada ter sido condicionada a um ambulatório de atendimento público de saúde, há prevalência subestimada de indivíduos pertencentes ao sexo masculino.

Estudos realizados ao longo dos anos permitiram determinar as frequências de vários grupos sanguíneos, dentre eles o ABO, Secretor e Lewis. No Brasil, os grupos sanguíneos O e A são os mais comuns, abrangendo mais de 80% da população. O grupo B corresponde cerca de 10% e o AB a 3%. O gene Secretor varia entre 50-60% em caucasianos, 50-85%, em negroides e 48-58% nas populações asiáticas. Os fenótipos Lewis tem suas frequências estimadas, em caucasianos, de 22% para o fenótipo Le(a+b-), 72% para Le(a-b+) e 6% para Le(a-b-). Em negroides a frequência do fenótipo Le(a-b-) está entre 20-25%, sendo que nos japoneses este fenótipo não atinge a 2%.⁽⁹⁶⁾

Os glicoconjugados ABH-Lewis, que caracterizam os fenótipos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis, têm sido associados a doenças⁽⁶¹⁾, tais como o câncer gástrico em indivíduos do grupo sanguíneo A e

o desenvolvimento da úlcera gástrica em indivíduos do grupo sanguíneo O.⁽⁹⁶⁾ Outros estudos também observaram a associação da malária grave com os antígenos ABO, e os antígenos Lewis (Le^b), como receptor para a bactéria *H. pylori*.^(97,98)

A fase intracelular do ciclo de vida de diversos protozoários requer a habilidade do parasito em reconhecer os componentes receptores das células hospedeiras.⁽⁹⁹⁾ As glicoproteínas presentes na superfície destas células envolvem variedades de receptores que reconhecem fenômenos entre as ligações que ocorrem nestas superfícies e as interações célula-célula. Tais interações podem ser inibidas por monossacarídeos e lectinas que determinam o importante papel de alguns carboidratos com funções receptoras nas superfícies glicoproteicas.^(67,75)

Em 1982, em um estudo experimental, Crane & Dvorak demonstrou que a infecção pelas formas tripomastigotas do *T. cruzi* em células musculoesqueléticas de embrião bovino, pode ser inibida por diferentes monossacarídeos como a glicose, galactose, fucose e N-Acetilgalactosamina, mas não pela N-Acetilglicosamina. Estes autores sugeriram que o processo de invasão celular pelo *T. cruzi* envolve a expressão de adesinas na superfície deste parasito, as quais reconhecem e se ligam a receptores contendo N-Acetilglicosamina, presentes nas membranas das células de vertebrados.⁽⁶⁷⁾ Esses mesmos monossacarídeos, estão presentes na estrutura oligossacarídica dos antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis expressos no tecido cardíaco e ao longo do trato gastrintestinal,⁽⁵⁹⁾ locais onde ocorre a manifestação da doença de Chagas.⁽¹⁾

Ainda na década de 80, foi relatado que soro de pacientes chagásicos reconheciam epítomos da laminina murina presentes em oligossacarídeos contendo terminações Gal α 1 \rightarrow 3Gal.⁽⁷⁸⁾ Neste mesmo período foi constatado que anticorpos naturais anti-Gal reagem de forma cruzada com componentes do antígeno B do sistema histo-sanguíneo ABO.⁽⁷⁹⁾ Os níveis de anticorpos anti-laminina murina presentes no soro de pacientes chagásicos mostraram-se mais elevados naqueles dos grupos A e O em comparação àqueles dos grupos B e AB.⁽⁸⁰⁾

No presente estudo, ao analisarmos as frequências dos fenótipos ABO, Secretor e Lewis distribuídos nas três formas da doença comparados entre si e com o grupo controle (doadores de sangue), não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes. Porém, quando comparado os fenótipos combinados do sistema sanguíneo ABO (B+AB versus A+O) e Secretor (GG+GA versus AA) de acordo com as três formas da doença de Chagas, observamos a predominância dos fenótipos B+AB na forma megaesôfago, o que sugere em princípio que a expressão do antígeno carboidrato B tipo 1, pode contribuir para o desenvolvimento desta forma da doença. Em relação aos perfis antigênicos, detectamos a maior frequência do fenótipo BLe^b no grupo dos pacientes em relação aos doadores.

Dois estudos independentes realizados no estado de Minas Gerais investigaram a associação entre o sistema histo-sanguíneo ABO e a doença de Chagas. Em 1987, Teixeira et al. analisaram os fenótipos eritrocitários do sistema ABO em pacientes chagásicos crônicos e assintomáticos, assim como em controles saudáveis. Os resultados revelaram diferenças estatisticamente

significantes na frequência do grupo O entre os pacientes crônicos comparados aos assintomáticos. Os autores concluíram que este grupo sanguíneo supostamente confere relativa proteção contra as formas sintomáticas da doença de Chagas, principalmente ao que se refere à formação de “megas” e parece constituir um marcador de menor morbidade à infecção pelo *T. cruzi*. E ainda, observaram diferenças estatisticamente significantes com maior frequência do grupo B entre os indivíduos que evoluíram para óbito devido às formas crônicas da doença.⁽⁷⁶⁾

O outro estudo, realizado por Engracia et al. em 1990, avaliaram diversos polimorfismos em relação à doença de Chagas, dentre eles o do sistema ABO, porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre estes polimorfismos em indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, em relação àqueles com as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas.⁽⁷⁷⁾

Tais estudos apresentaram-se inconclusivos ao encontrados no presente trabalho. No primeiro estudo⁽⁷⁶⁾, apesar de demonstrar que o antígeno B estaria relacionado às formas mais graves da doença, os pacientes não foram separados pelas suas diferentes formas clínicas (cardiomiopatia, megaesôfago e megacólon) sendo agregados em um único grupo. Já no outro,⁽⁷⁷⁾ foram avaliados vários polimorfismos simultaneamente, não considerando também as distintas formas da doença.

Mais recentemente, um trabalho realizado com casuística Argentina, observou resultados sugerindo que os indivíduos pertencentes ao grupo O são predispostos a desenvolver a forma cardíaca da doença, enquanto que o grupo

A, teria menor probabilidade de manifestações clínicas.⁽¹⁰⁰⁾ Os resultados do nosso estudo são discordantes daqueles apresentados por Spada e colaboradores.

Os alelos funcionais do gene *FUT1*, expressam a enzima FUT1 que atua sob o oligossacarídeo precursor tipo 2 para convertê-lo em antígeno eritrocitário H tipo 2.⁽⁶²⁾ A biossíntese prossegue pela adição de uma molécula de α -N-Acetilgalactosamina para formar o antígeno A tipo 2, ou pela adição de uma molécula de D-Galactose para formar o antígeno B tipo 2, que ocorre sob a ação das glicosiltransferases GTA ou GTB codificadas pelos alelos A e B, respectivamente, do gene *ABO*.^(64,65) O gene *FUT2* codifica a enzima FUT2 que fucosila o oligossacarídeo precursor tipo 1, produzindo o antígeno H tipo 1, sendo posteriormente convertido nos antígenos A ou B, sob controle dos alelos funcionais do gene *ABO*.^(62,65)

As interações epistáticas entre os genes *FUT1* e *ABO* irão determinar os fenótipos eritrocitários ABO, enquanto que as interações do gene *FUT2* com o *ABO*, determinarão o estado secretor dos antígenos ABH nos fluidos corporais.⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾ A perda funcional dos alelos do gene *FUT1* e *FUT2*, leva a ausência de antígenos ABH nos eritrócitos e dos antígenos ABH na saliva e em vários tipos de células epiteliais, respectivamente.^(68,69)

A expressão dos antígenos do sistema Lewis depende da interação epistática que ocorre entre as enzimas produzidas pelos genes *FUT2* e *FUT3*. O gene *FUT3* codifica a enzima FUT3 que age sob o oligossacarídeo precursor tipo 1, produzindo o antígeno Le^a. Quando esta utiliza o antígeno H tipo 1 como substrato, produzido a partir da enzima FUT2, há a formação do

antígeno Le^b. A enzima FUTIII pode ainda converter os antígenos A e B tipo 1 em ALe^b e BLe^b.^(60,62) Sendo assim, a expressão dos antígenos do sistema histo-sanguíneo ABO nos eritrócitos e no tecido cardíaco (origem embrionária mesodérmica) ocorre sob controle dos genes *FUT1* e *ABO*, enquanto nos tecidos do esôfago e cólon (origem embrionária endodérmica), a expressão é controlada pela ação dos genes *FUT2*, *ABO* e *FUT3*.^(60,62)

O papel dos sistemas histo-sanguíneo ABO, Secretor e Lewis em associação a doença de Chagas ainda não está claramente elucidado. Porém, diante às diferentes interações e síntese dos antígenos expressos nos tecidos cardíaco e gastrointestinal sugerimos que, a expressão do antígeno carboidrato B, o qual caracteriza os grupos sanguíneos B e AB e cuja síntese está sob o controle dos genes funcionais *FUT2* (Secretor), poderia atuar como um fator de risco para a doença de Chagas, especialmente entre os pacientes que desenvolveram a forma megaesôfago.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

- ❖ Os sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis quando analisados isoladamente, não estão associados às diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

- ❖ A elevada expressão do antígeno carboidrato B tipo 1, sob o controle dos genes *ABO* e *FUT2*, contribui com a forma megaesôfago.

- ❖ O perfil antigênico contendo alta expressão do antígeno BLe^b, predomina nos pacientes chagásicos em relação aos doadores de sangue.

Referências

6. REFERÊNCIAS

1. Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its control. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(Suppl. 1):31-40.
2. Tanowitz HB, Weiss LM, Montgomery SP. Chagas disease has now gone global. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5:e1136.
3. Ribeiro I, Sevcsik AM, Alves F, Diap G, Don R, Harhay MO, et al. New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3:e484.
4. Bellini MF, Silistino-Souza R, Varella-Garcia M, de Azeredo-Oliveira MTV, Silva AE. Biologic and genetics aspects of Chagas disease at endemic areas. J Trop Med. 2012:357948.
5. Coura JR, Vinãs PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 2010;465:S6-S7.
6. Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas disease. N Engl J Med. 2011;364:2527-34.

7. Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusion transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:577-91.
8. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010;11:14-21.
9. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2010;115:22-7.
10. Fretes RE, Kemmerling U. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* placenta invasion and infection: The use of human chorionic villi explants. *J Trop Med.* 2012; 2012:614820.
11. Lieke T, Steeg C, Graefe SE, Fleischer B, Jacobs T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 2006;145:357-64.
12. Rey L. Tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi*: doença de Chagas. In: Rey, L. Bases da parasitologia médica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 27-41.

13. Araujo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease – a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(Suppl 1):9-16.
14. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010;375:1388-402.
15. Macedo MA, Oliveira RP, Pena SDJ. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. Expert Rev Mol Med. 2002;4:1-16.
16. Wanderley DM, Correa FM. Epidemiology of Chagas' heart disease. Sao Paulo Med J. 1995;113:742-9.
17. Silistino-Souza R¹, Alevi KC, Castro NF, Freitas MN, Papa MD, Scandar SA, Bestetti RR, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MT. Entoepidemiology of Chagas disease in northwest São Paulo and cytogenetic analysis of its main vector, *Triatoma sordida* (Hemiptera: Triatominae). Genet Mol Res. 2013;12:5810-9.
18. Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. Parasite Immunol. 2009;31:673-85.

19. Carod-Artal FJ, Gáscon J. Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol.* 2010;9:533-42.
20. Yadon ZE, Schmunis GA. Congenital Chagas disease: estimating the potential risk in the United States. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:927-33.
21. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Chagas disease as a foodborne illness. *J Food Prot* 2009;72:441-6.
22. Kowalska A, Kowalski P, Torres MAT. Chagas disease – american trypanosomiasis. *Pol Ann Med.* 2011;18:156-67.
23. Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:653-55.
24. WHO 2010, World Health Organization [homepage na Internet]. 2013 [acesso em 2013 Nov 18]. Neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases; [aproximadamente 1 tela]. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/
25. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2001;1:92-100.

26. Oliveira EC, Fujisawa MM, Hallal Longo DE, Farias AS, Contin Moraes J, Guariento ME, et al. Neuropathy of gastrointestinal Chagas' disease: immune response to myelin antigens. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16:54-62.
27. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e29.
28. Lana M, Tafuri WL. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: Neves DP. *Parasitologia humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 73-100.
29. Ribeiro AL, Rocha MO. Indeterminate form of Chagas' disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31:301-14.
30. Macedo VO. Forma indeterminada da doença de Chagas. In: Dias JCP, Coura JR. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1997. p. 135-151.
31. Gomes LMX, Santos AC, Lima FR, Barbosa TLA, Teles JT. O impacto da doença de Chagas no cotidiano do portador. *Motricidade*. 2012;8(Suppl. 2):204-11.

32. Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas cardiomyopathy-where do we stand after a hundred years? *Prog Cardiovasc Dis* 2010;52:300-16.
33. Bestetti RB, Theodoropoulos TAD, Cardinalli-Neto A, Cury PM. Treatment of chronic systolic heart failure secondary to Chagas heart disease in the current era of heart failure therapy. *Am Heart J* 2008;156:422-30.
34. Bestetti RB, Cardinalli-Neto A. Sudden cardiac death in Chagas' disease in the contemporary era. *Int J Cardiol* 2008;131:9-17.
35. Carod-Artal FJ, Vargas AP, Horan TA, Nunes LG. Chagasic cardiomyopathy is independently associated with ischemic stroke in Chagas' disease. *Stroke* 2005;36:965-70.
36. Andrade ZA. Patologia e Patogenia. In: Malta J. *Doença de Chagas*. São Paulo: Sarvier. 1996. p. 27-38.
37. Talvani A, Rocha MO, Ribeiro AL, Correa-Oliveira R, Teixeira MM. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. *J Infect Dis*. 2004;189:214-20.

38. Andreollo NA, Malafaia O. Os 100 anos da doença de Chagas no Brasil. *Arq Bras Cir Dig.* 2009;22:189-91.
39. Ferreira MS, Nishioka SA, Silvestre MT, Borges AS, Nunes-Araújo FR, Rocha A. Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 1997;25:1397-400.
40. Galhardo MCG, Martins IA, Hasslocher- Moreno A, Xavier SS, Coelho JMC, Vasconcelos ACV, et al. Reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32:291-4.
41. Madalosso G, Pellini AC, Vasconcelos MJ, Ribeiro AF, Weissmann L, Oliveira Filho GS, et al. Chagasic meningoencephalitis: case report of a recently included AIDS-defining illness in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46:199-202.
42. Martins-Melo FR, Ramos NA Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality related to Chagas disease and HIV/AIDS coinfection in Brazil. *J Trop Med.* 2012; 2012:534649.

43. Gomes YM. Diagnóstico Etiológico. In: Malta J. Doença de Chagas. São Paulo: Sarvier, 1996. p.119-32.
44. Mendes RP, Hoshino-Shimizu S, Moura da Silva AM, Mota I, Heredia RA, Luquetti AO, et al. Serological diagnosis of Chagas disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. J Clin Microbiol. 1997;35:1829-34.
45. Gomes YM. PCR and sero-diagnosis in chronic Chagas' disease biotechnological advances. Appl Biochem Biotechnol. 1997;66:107-19.
46. Gomes YM, Lorena VM, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(Suppl 1):115-21.
47. Menezes C, Costa GC, Gollob KJ, Dutra WO. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. Drug Dev Res. 2011;72:471-9.
48. Dias JC. Chagas' disease. Epidemiology and prevention. Arq Bras Cardiol 1994;63:451-5.

49. Luquetti AO, Espinoza B, Martínez I, Hernández-Becerril N, Ponce C, Ponce E, et al. Performance levels of four Latin American laboratories for the serodiagnosis of Chagas disease in Mexican sera samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:797-800.
50. Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2005. Ministerio da Saúde. Secretaria de Vigilancia em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(Suppl 3):2-30.
51. Kierszenbaum F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol*. 2005;21:513-6.
52. Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21:287-92.
53. Reis DD, Jones EM, Tostes Junior S, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- α cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48:637-44.
54. Fuenmayor C, Higuchi ML, Carrasco H, Parada H, Gutierrez P, Aiello V, et al. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of

- T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. *Acta Cardiol.* 2005;60:33-7.
55. Pérez-Fuentes R, Guégan JF, Barnabé C, López-Colombo A, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, et al. Severity of chronic Chagas' disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol.* 2003 Mar;33:293-9.
56. Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis.* 2004;38:943-50.
57. Ribeiro BM, Crema E, Rodrigues V Jr. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. *Hum Immunol.* 2008;69:484-9.
58. Dutra WO, Menezes CA, Villani FN, da Costa GC, da Silveira AB, Reis Dd, et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(Suppl 1):208-18.
59. Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 2002;18:272-8.

60. Schenkel-Brunner H. Human blood groups: chemical and biochemical basis of antigen specificity. Wien: Springer, 2000.
61. Mattos LC. ABH-Lewis antigens in studies investigating associations with diseases. *Rev bras hematol hemoter.* 2003; 25:193-9.
62. Oriol, R. ABO, Hh, Lewis and Secretion: serology, genetics and tissue distribution. In: Cartron, JP, Rouger, P. *Blood Cell Biochemistry: molecular basis of human blood group antigens.* New York: Plenum, 1995. p37-73.
63. Watkins WM. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems. *Adv Hum Genet.* 1980;10:1-136.
64. Hakomori S. Antigen and structure and genetic bases of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1473:247-66.
65. Daniels G. *Human blood groups.* Oxford: Blackwell Science, 2002. p8-120.
66. Socha WW, Blancher A, Moor-Jankowski J. Red cell polymorphisms in nonhuman primates: a review. *J Med Primatol.* 1995;24:282-305.

67. Henry SM. Molecular diversity in the biosynthesis of GI tract glycoconjugates. A blood group related chart microorganism receptors. *Transf Clin Biol*, 2001;8:226-30.
68. Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. *Transfus Med*. 2001;11:243-65.
69. Soejima M, Munkhtulga I, Iwamoto S, Koda Y. Genetic variation of *FUT3* in Ghanaians, Caucasians and Mongolians. *Transfusion*. 2009;49:959-66.
70. Mollicone R, Reguigne I, Kelly RJ, Fletcher A, Watt J, Chatfield S, et al. Molecular basis of Lewis $\alpha(1,3/1,4)$ -fucosyltransferase gene deficiency (*FUT3*) found in Lewis-negative Indonesian Pedigrees. *J Biol Chem*. 1994;269:20987-94.
71. Soejima M, Koda Y. Molecular mechanisms of Lewis antigen expression. *Leg Med*. 2005;7:266-9.
72. Henry SM. Review: phenotyping for Lewis and secretor histo-blood group antigens. *Immunohematology*. 1996;12:51-61.

73. Grahn A, Elmgren A, Aberg L, Svensson L, Jansson PA, Lönnroth P, et al. Determination of Lewis *FUT3* gene mutations by PCR using sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples. *Hum Mutat.* 2001;18:358-9.
74. Henry S, Oriol R, Samuelsson B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang.* 1995;69:166-82.
75. Crane MS, Dvorak JA. Influence of monosaccharides on the infection of vertebrate cells by *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 1982;5:333-41.
76. Teixeira VPA, Martins E, Morais CA, Almeida HO, Soares S, Souza, HM. Sistema ABO e formas anatomoclínicas da doença de chagas crônica. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987; 20:163-7.
77. Engracia V, Mestriner M, Krieger H. Genetic systems and biological traits in normal and chagasic individuals from a Brazilian Sample. *Rev Bras Genet* 1990;13:835-9.
78. Towbin H, Rosenfelder G, Wieslander J, Âvila JL, Rojas M, Szarfman A, et al. Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize

- terminal galactosyl(al-3)-galactose epitopes. *J Exp Med* 1987;166:419-32.
79. Galili V, Buehler J, Shoted SB, Macher BA. The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J Exp Med* 1987;165:693-704.
80. Gazzinelli TR, Galvão LMC, Cardoso JE, Cançado JR, Krettli AU, Brener Z, et al. Anti-Trypanosoma cruzi and Anti-Laminin Antibodies in Chagasic Patients after Specific Treatment. *J Clin Microbiol* 1988;26:1795-1800.
81. Mattos LC, Sanchez FE, Cintra JR, Salles ABCF, Bonini-Domingos CR, Moreira HW. Genotipagem do locus *ABO* (9q34.1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. *Rev bras hematol hemoter* 2001;23:15-22.
82. Cintra JR, Godoy MF, Mattos LC. Falta de associação entre o sistema Lewis e obstrução coronariana. *Rev bras hematol hemoter* 2008;30:124-31.
83. Mattos CC, Meira CS, Ferreira AI, Frederico FB, Hiramoto RM, Jr GC, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected

ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70:362-6.

84. Svensson L, Petersson A, Henry SM. Secretor genotyping for *A385T*, *G428A*, *C571T*, *C628T*, *685delTGG*, *G849A*, and other mutations from single PCR. *Transfusion*, 2000;40:856-60.
85. Orntoft TF, Vestergaard EM, Holmes E, Jakobsen JS, Grunnet N, Mortensen M, et al. Influence of Lewis a_{1-3/4}-L-Fucosyltransferase (*FUT3*) gene mutations on enzyme activity, erythrocyte phenotyping, and circulating tumor marker sialyl-Lewis a levels. *J Biol Chem* 1996; 271: 32260-8.
86. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária [homepage na Internet]. 2013 [acesso em 2013 Out 21]. Portaria nº 1.353, de 13 de junho de 2011; [aproximadamente 1 tela]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Pos+-+Comercializacao+-+Pos+-+Uso/Hemovigilancia/Assunto+de+Interesse/Legislacao>
87. Nunes MC, Carmo AAL, Rocha MOC, Ribeiro AL. Mortality prediction in Chagas heart disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2012;10:1173-84.

88. Dias JCP. Controle da doença de Chagas. In: Dias JCP, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 197. p. 453-467.
89. Silva EO, Rodrigues VL, Silva RA, Wanderley DM. Programa de Controle da Doença de Chagas no Estado de São Paulo, Brasil: o controle e a vigilância da transmissão vetorial. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44(Suppl. 2):74-84.
90. Espinosa R, Carrasco HA, Belandria F, Fuenmayor AM, Molina C, González R, et al. Life expectancy analysis in patients with Chagas' disease: prognosis after one decade (1973-1983). Int J Cardiol. 1985;8:45-56.
91. Barreto AC, Arteaga E, Mady C, Ianni BM, Bellotti G, Pileggi F. [Male sex prognostic factor in Chagas' disease]. Arq Bras Cardiol. 1993;60:225-7.
92. Rassi A Jr, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. N Engl J Med. 2006;355:799-808.

93. Oliveira FAS, Bicalho GVC, Souza-Filho LD, da Silva MJ, Gomes-Filho ZC. Características epidemiológicas dos pacientes com doença de Chagas. *Rev Bras Med Fam e Com.* 2006;2:107-13.
94. Perez-Molina JÁ, Perez-Ayla A, Parola P, Jackson Y, Odolini S, Lopez-Velez R. EuroTravNet: imported Chagas disease in nine European countries, 2008 to 2009. *Surveill.* 2011;16. pii:19966.
95. Gomes R, Nascimento EF, Araújo FC. Por que os homens buscam menos os serviços de saúde do que as mulheres? As explicações de homens com baixa escolaridade e homens com ensino superior. *Cad Saude Publica.* 2007;23:565-74.
96. Beiguelman B. Os sistemas sanguíneos eritrocitários. 3º ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003.
97. Anstee DJ. The relationship between blood groups and disease. *Blood.* 2010;115(23)4635-43.
98. Liunbruno GM, Franchini M. Beyond immunohaematology: the role of the ABO blood group in human diseases. *Blood Transfus.* 2013:1-9.
99. Dvorak JA, Crane MS. Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. *Science.* 1981;214:1034-6.

100. Spada RI, Streiger ML, del Barco ML, Fabbro DL, Bizai ML, Mendicino DA, et al. Relación entre enfermedad de Chagas y sistema de grupos sanguíneos ABO: Estudio preliminar. Rev FABICIB. 2010;14:174-9.

Anexos

7. ANEXOS

7.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



“Marcadores imunogenéticos relacionados à doença de Chagas”

FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Conselho Nacional de Saúde - Resolução CNS 196/96)

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa denominada “Marcadores imunogenéticos relacionados à doença de Chagas”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (Parecer 009/2011) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP Parecer 623/2011). *Trypanosoma cruzi* é o parasita que causa a doença de Chagas e essa doença pode ser transmitida aos seres humanos pela picada do inseto conhecido como “bicho barbeiro”, acarretando problemas cardíacos, esofágicos e intestinais.

Essa pesquisa tem como objetivos identificar os aspectos marcadores imunogenéticos (características genéticas e biológicas para determinar se essas características genéticas favorecem ou não a infecção por *T. cruzi*. Os resultados desta pesquisa poderão ajudar na compreensão dos fatores biológicos que influenciam a infecção pelo *T. cruzi* e poderão beneficiar você e muitas outras pessoas.

Se os resultados desta pesquisa demonstrarem que os fatores genéticos se relacionam com a suscetibilidade à doença de Chagas, eles poderão ajudar a compreender a importância das variações genéticas que existem nas populações para a orientação de programas de esclarecimento, educação, prevenção e mesmo tratamento de doenças como a de Chagas. Se o resultado de seu exame for positivo (reagente) para a doença de Chagas, não haverá necessidade de aconselhamento genético, pois esta doença é causada por um microrganismo chamado *Trypanosoma cruzi* e não é transmitida de pais para filhos.

A sua participação nessa pesquisa é voluntária e de extrema importância e você não perderá os benefícios do atendimento médico aos quais tem direito, caso decida não participar ou mesmo se você se retirar dessa pesquisa a qualquer tempo. Você poderá ter acesso a todos os seus dados coletados para esta pesquisa bem como aos resultados de todos os exames realizados nas amostras de seu sangue e terá também o direito de retirar a amostra ou quaisquer de seus dados de nosso banco de armazenamento de dados no momento em que você desejar. Em hipótese alguma seus dados serão divulgados de forma individual.

Para participar como voluntária nessa pesquisa será necessário:

1. Você responder um questionário sobre você e seus hábitos de vida. Todas as informações a seu respeito serão mantidas em absoluto sigilo.
2. Você nos autorizar a colher uma amostra de seu sangue para exames da doença de Chagas e para a identificação dos seus tipos sanguíneos ABO, Secretor e Lewis. A coleta de sangue é realizada com a introdução de uma agulha estéril na veia e de acordo com a sua sensibilidade, você poderá sentir uma leve ardência no local. O risco da coleta de sangue poderá incluir vermelhidão e raramente deixa o local de introdução da agulha inchado e com manchas roxas. O seu sangue será utilizado apenas para análises científicas e será estocado em um banco de amostras do Laboratório de Imunogenética, podendo ser utilizado para novas pesquisas, dentro de no máximo cinco anos. Quaisquer análises adicionais a serem realizadas em sua amostra de sangue deverão obrigatoriamente estar vinculadas ao presente projeto. Você deve saber que não haverá riscos de qualquer tipo de contaminação durante a coleta de seu sangue, pois o material utilizado será individual e não contaminado. Esse material é totalmente estéril (seringa, agulha, algodão com álcool) e único para cada pessoa. Após a coleta de seu sangue, as agulhas, seringas e algodão utilizados serão colocados em saco de lixo e descartados em local seguro. Esses procedimentos serão realizados por profissionais com experiência.

Se for seu desejo, você será informada (o) de todos os resultados dos exames que serão realizados em seu sangue e eles serão mantidos em absoluto sigilo. Se essa pesquisa for encerrada antes do período previsto, você também será informada.

Caso ocorra danos de quaisquer natureza durante a coleta de sua amostra de sangue, você receberá toda assistência médica gratuitamente.

Se você tiver qualquer dúvida sobre essa pesquisa ou mesmo sobre lesões relacionadas à coleta de sangue, entre em contato com o Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos pelo telefone ou pelo endereço abaixo indicados. Caso você tenha qualquer dúvida sobre seus direitos como sujeito de pesquisa, você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo telefone (17) 3201-5813.

Você receberá uma cópia deste formulário de consentimento livre e esclarecido assinado e datado.

Declaração do sujeito da pesquisa

Eu voluntariamente aceito participar da pesquisa “Marcadores imunogenéticos relacionados à doença de Chagas”. Autorizo a estocagem da amostra de meu sangue no banco de amostras do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e sua utilização para novas pesquisas, desde que seja mantido o sigilo absoluto das informações por mim prestadas. Li e compreendi essa declaração de consentimento livre e esclarecido e os riscos descritos. Entendo que posso retirar meu consentimento ou retirar-me dessa pesquisa a qualquer momento, sem perder nenhum benefício aos quais tenho direito.

Desejo saber os resultados de meus exames Não desejo saber os resultados de meus exames

..... de de

Responsável pela discussão do consentimento livre e esclarecido

Assinatura do sujeito da pesquisa ou seu representante legal

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos
Responsável pelo Laboratório de Imunogenética
Dept. de Pesquisa e Pós-graduação - FAMERP

Laboratório de Imunogenética - Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 - São José do Rio Preto - 15090-000
Fones: (17) 3201-5854 (Laboratório)

7.2 Ficha de Dados Epidemiológicos



"Marcadores imunogenéticos relacionados à doença de Chagas"
FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO



FICHA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

No. Prontuário:	Data da coleta:	Código do projeto:
-----------------	-----------------	--------------------

Dados da paciente:

Nome:	DN:	
Local de nascimento:	Idade:	
Endereço atual:	Nº:	
Cidade:	Estado:	Telefone:

Você contraiu algumas dessas doenças infecto-parasitárias?

	Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não
Citomegalovírus			Mononucleose			Leishmaniose		
Rubéola			Malária			Toxoplasmose		
Catapora			Herpes			Chagas		
Dados clínicos:				Sim	Não			
Você já recebeu transfusão de sangue?						Tempo?		
Você já teve ou tem animal doméstico em casa?						Qual?		
Você tem o hábito de andar descalça no solo?								
Você tem o hábito de tomar leite cru?						Qual?		
Você come carne crua ou mal cozida de qualquer animal?						Qual?		
Você lava os legumes e verduras?								
Você teve gravidez anterior?						Quantas?		
Você teve filho prematuro?						Quando?		
Você teve algum aborto?						Quantos?		
Você sabe seu tipo sanguíneo e seu fator Rh?						Qual?		
Dados ambientais:								
Você mora em zona: urbana () rural () morou zona rural () <small>onde?</small>								
Qual o tipo de moradia? alvenaria () madeira () Barro ou pau-a-pique () própria () alugada () cedida () outro () <small>especificar</small>								
Tem rede de esgoto? Sim () não () Se não qual o tipo? fossa () outro () <small>especificar</small>								
Você bebe água: filtrada () fervida () torneira ()								
Qual o destino do lixo? coleta pública () outro () <small>especificar</small>								
Onde você mora tem: ratos () baratas () moscas ()								
Qual seu nível escolaridade?								
Qual a renda familiar em salários mínimos? 1 () 2 () 3 () 4 () acima de 4 ()								

Etnia: Pac.: _____ Pai: _____ Mãe: _____

OBS: