

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
FISIOPATOLOGIA

DEBORAH ELZITA DO CARMO CORRÊA

Associação entre os antígenos plaquetários humanos e a cardiomiopatia
chagásica crônica

Maringá
2016

DEBORAH ELZITA DO CARMO CORRÊA

Associação entre os antígenos plaquetários humanos e a cardiomiopatia
chagásica crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia.

Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia.

Orientador: Prof^a Dr^a Ana Maria Sell

Co-Orientador: Prof^a Dr^a Jeane Eliete Laguila Visentainer

Maringá
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

C824a Corrêa, Deborah Elzita do Carmo
 Associação entre os antígenos plaquetários
 humanos e a cardiomiopatia chagásica crônica /
 Deborah Elzita do Carmo Corrêa. -- Maringá, 2016.
 58 f. : il. color., figs., tabs.

 Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Sell.
 Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Jeane Eliete Laguila
 Visentainer.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
 Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento
 Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-
 Graduação em Biociências e Fisiopatologia, 2016.

 1. Antígenos plaquetários humanos. 2.
 Polimorfismo genético. 3. Doença de Chagas. 4.
 Cardiomiopatia chagásica. I. Sell, Ana Maria,
 orient. II. Visentainer, Jeane Eliete Laguila,
 coorient. III. Universidade Estadual de Maringá.
 Centro de Ciências da Saúde. Departamento Análises
 Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em
 Biociências e Fisiopatologia. IV. Título.

CDD 21.ed. 616.15

AMMA-003393

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEBORAH ELZITA DO CARMO CORRÊA

Associação entre os antígenos plaquetários humanos e a cardiomiopatia
chagásica crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Profª Drª Ana Maria Sell

Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Profª Drª Cinara de Cássia Brandão de Mattos

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Profª Drª Silvana Marques Araújo

Universidade Estadual de Maringá

Profª Drª Eliana LitzukoTomimatsu Shimauti

Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em:

Local de defesa: Sala 112 B, Bloco T20 *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu
Pai, meu maior incentivador!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus e Maria que me deram vida, saúde, inteligência e todos os dons necessários para que eu conseguisse realizar mais esta etapa da minha vida e, além de tudo, por Eles quererem que isto se realizar-se em minha vida;

Ao meu Pai, que sempre me incentivou e apoiou a estudar, pelos conselhos, amor, carinho, compreensão, paciência, enfim por ter sido o melhor pai do mundo;

A minha Mãe, aos meus irmãos, ao meu marido pelo apoio, compreensão, conselhos, companhia, amor, por ser minha base necessária para conseguir concluir mais esta etapa na minha vida;

A todos do laboratório de imunogenética da UEM – LIG: aos professores, aos técnicos e aos alunos, em especial a Lu, Eli, Paty, Marília, Pâmela, Amarílis, Laise e Julimary. Sem dúvidas foram pessoas especiais, que estavam sempre a disposição em me ajudar no que fosse preciso;

Aos professores Luiz Carlos de Mattos e a Cinara de Cássia Brandão de Mattos e a aluna Christiane Maria Ayo da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pela parceria e disponibilidade em contribuir para realização deste trabalho;

A minha orientadora Ana Maria Sell pela orientação, conselhos e conhecimentos a mim transmitidos, por me ajudar a concluir esse trabalho e por contribuir com minha formação acadêmica.

Agradeço de coração a todos os envolvidos em toda e qualquer forma de ajuda, pois sem vocês não conseguiria realizar e concluir esse trabalho. Meu muito obrigada!

EPÍGRAFE

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

Associação entre os antígenos plaquetários humanos e a cardiomiopatia chagásica crônica

RESUMO

As plaquetas têm um papel fundamental na hemostasia, sendo responsável pela ativação, aglutinação e agregação plaquetária. Esta função é realizada por receptores de glicoproteínas de membrana, que expressam os antígenos plaquetários humanos (HPA), moléculas polimórficas. Este polimorfismo origina-se da substituição de um par de nucleotídeos no gene, gerando uma troca do aminoácido na proteína, resultando numa alteração conformacional nas glicoproteínas de membrana podendo alterar as suas funções. Na cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) uma das características importantes encontrada em corações chagásicos é a presença de trombos e fibrose. Neste contexto, o objetivo do estudo foi investigar a possível associação do polimorfismo dos HPAs na gravidade da cardiomiopatia chagásica crônica. Este estudo foi realizado com 221 pacientes com CCC, divididos em três grupos de acordo com a gravidade da disfunção sistólica ventricular esquerda (DSVE): sem DSVE, DSVE leve/moderada (L/M) e DSVE grave. Os genótipos HPA-1, 2, 3, 5 e 15 foram determinados pelo método PCR-SSP. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software OpenEpi e SNPStats. O teste do qui quadrado com correção de Yates, odds ratios (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) foram realizados para avaliar a associação. O modelo de regressão logística incluiu as covariáveis idade e gênero. A distribuição dos genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O alelo HPA-1b e o genótipo HPA-1a/1b foram menos frequentes no grupo de pacientes com DSVE L/M. Na análise de regressão logística multivariada, o genótipo HPA-1a/1b foi mais frequente no gênero masculino com DSVE grave quando comparado entre os indivíduos com DSVE L/M (OR = 3,46) e os genótipos HPA-2a/2b e HPA-3a/3b também foram mais frequentes no gênero masculino com DSVE grave, quando comparados entre os indivíduos sem DSVE (OR = 3,74, OR = 2,90, respectivamente). Desta forma conclui-se que os genótipos a/b do HPA-1, HPA-2 e HPA-3 foram associados à gravidade da disfunção sistólica ventricular esquerda em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica.

Palavras-chave: Antígenos plaquetários humanos. Polimorfismo genético. Doença de Chagas. Cardiomiopatia chagásica.

Association between human platelet antigen and chronic Chagas diseases cardiomyopathy

ABSTRACT

Platelets have a key role in hemostasis being responsible for the platelet activation, agglutination and aggregation of platelets. This function is performed by membrane glycoproteins receptors, which carry the human platelet antigens (HPA), polymorphic molecules. The polymorphism is originate from substitution of one nucleotide pair generating an exchange of amino acid and the protein, and resulting in a change in conformocional membrane glycoproteins. The alterate protein may change their roles. In chronic Chagas cardiomyopathy (CCC), hearts thrombi and fibrosis are important characteristics. In this contex, the objective of the study was to investigate the possible association of the polymorphism of HPAs in the severity of chronic Chagas cardiomyopathy. This study was conducted in 221 patients with CCC, separate in three groups according to the severity of left ventricular systolic dysfunction (LVSD), such as without LVSD, mild/moderate LVSD (M/M) and severe LVSD. HPA-1, 2, 3, 5 and 15 genotypes were determined by PCR-SSP method. Statistical analyses were conducted using the Openepi and SNPStats software to calculate Chi square with Yates correction test, odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (IC). Logistic regression models included the age and gender. The genotypes dtribution was in Hardy-Weinberg equilibrium. Lower frequency of HPA-1b allele and HPA-1a/1b genotype were in M/M LVSD patients group. After multivariate logistic regression analyses, HPA-1a/1b genotype was more frequent in males with severe LVSD compared M/M LVSD (OR = 3.46), and HPA-2 a/b and HPA-3 a/b genotypes were more frequent in males with severe LVSD compared to without LVSD (OR = 3.74; OR = 2.90, respectively). In conclusion, genotype a/b in the HPA-1, HPA-2 and HPA-3 were associated to severity of left ventricular systolic dysfunction in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy.

Keywords: *Human platelet antigen. Genetic polymorphism. Chagas disease. Chagas cardiomyopathy.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Representação dos HPAs nas GPs de membrana plaquetária. Fonte: Adaptada de Peterson et al. (18).....	15
Figura 2 Berenice, primeira paciente de Carlos Chagas. Fonte: Chagas (60).....	21
Figura 3 Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fonte: Adaptado de Rassi et al. (67).....	22
Figura 4 Distribuição global dos casos da doença de Chagas, segundo estimativas oficiais, 2006-2010. Fonte: Adaptado Organização Mundial da Saúde (85).....	24
Figura 5 Duas fases do <i>T. cruzi</i> encontrada no hospedeiro mamífero.....	27
Figura 6 Imagem anatômica e corte histológico de um coração chagásico.....	29
Tabela 1 Bases moleculares dos principais sistemas dos HPAs.....	17
Tabela 2 Doença de Chagas aguda - casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação em 2014 – Brasil. Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sinan Net (88)	25

LISTA DE ABREVIATURAS

Capítulo I

TLR – Receptor *Toll-like*

IL-1 β – Interleucina -1 beta

TGF- β – Fator de transformação do crescimento-beta

GP – Glicoproteína de membrana plaquetária

HPA – Antígenos plaquetários humanos

FvW – Fator de von Willebrand

HCV – Vírus da hepatite C

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

DNDi – *Drugs Neglected Disease initiative*

IgM – Imunoglobulina M

IFI - Imunofluorescência indireta

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimático

HAI – Hemaglutinação indireta

IgG – Imunoglobulina G

PCR – Reação em cadeia de polimerase

CCC – Cardiomiopatia chagásica crônica

DSVE – Disfunção sistólica ventricular esquerda

LISTA DE ABREVIATURAS

Capítulo II

HPA – Human platelet antigen

CCC – Chronic Chagas disease cardiomyopathy

LVSD – Left ventricular systolic dysfunction

M/M – Mild/moderate LVSD

GP – Glycoprotein

SNP – single nucleotide polymorphism

vWF – von Willebrand factor

HIV – Human immunodeficiency virus

HCV – Hepatitis C virus

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

LVEF – Left ventricular ejection fraction

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

PCR-SSP – Polymerase chain reaction-sequence specific primer

HGH – Human growth hormone

OR – Odds ratio

CI – Confidence intervals

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: *Plos neglected tropical diseases*. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosntds/s/submission-guidelines>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1. ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS HUMANOS	13
1.1. Plaquetas	13
1.2. Glicoproteínas de membrana plaquetária	14
1.3. Antígenos plaquetários humanos	14
1.4. HPAs e seus complexos GPs	15
1.5. Polimorfismo dos HPAs e implicações clínicas	17
2. DOENÇA DE CHAGAS OU TRIPANOSSOMÍASE AMERICANA.....	19
2.1. Histórico	19
2.2. Agente etiológico.....	21
2.2.1. Origem	21
2.2.2. Ciclo Biológico	22
2.3. Vetor	22
2.4. Epidemiologia.....	23
2.5. Modo de transmissão	25
2.6. Manifestações Clínicas	26
2.6.1. Fase aguda.....	26
2.6.2. Fase Crônica.....	27
3. JUSTIFICATIVA	31
4. OBJETIVO GERAL	31
4.1. Objetivos específicos	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO II.....	43
CAPÍTULO III.....	58
CONCLUSÕES	58
PERSPECTIVAS FUTURAS	58

CAPÍTULO I

1. PLAQUETAS

1.1. Generalidades

As plaquetas são células pequenas (~1-2 μm de diâmetro) anucleadas originadas de fragmentos do citoplasma dos megacariócitos na medula óssea. Elas são o segundo tipo celular mais frequente, depois das hemácias, na corrente sanguínea com a concentração normal de 150.000 – 450.000/ μl . Um adulto saudável produz diariamente cerca de 1×10^{11} plaquetas e a vida média dessas estruturas na circulação é em torno de 7 dias, antes de serem eliminadas pelo sistema fagocítico mononuclear. A regulação da produção das plaquetas é feita, principalmente, pela trombopoetina, a qual induz o aumento do número e o ritmo de maturação dos megacariócitos (1,2).

A função melhor definida das plaquetas é a hemostasia. Em resposta à injúria endotelial e para formar um coágulo de fibrina na tentativa de estancar o sangramento, as plaquetas são ativadas, aderem e agregam aos vasos sanguíneos por meio de ligações cruzadas com o fibrinogênio. Recentemente, tem havido uma busca em entender as outras funções das plaquetas, além do controle da hemostasia. As plaquetas expressam muitas moléculas imunomoduladoras (por exemplo, P-selectina, TLR, CD40L) e citocinas (por ex., IL-1 β e TGF- β) e tem a capacidade de interagir com várias células do sistema imunológico. Estas propriedades conferem às plaquetas a capacidade de influenciar tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. As plaquetas também têm sido relacionadas ao crescimento de tumores, metástases e angiogênese (3–5).

Deficiência na produção ou na função plaquetária se associa a distúrbios hemorrágicos, enquanto que o aumento em número ou na função das plaquetas está associado à trombose. O trombo formado pode levar à obstrução vascular arterial e a fenômenos embólicos quando em contato com uma superfície vascular patológica. Angina instável e infarto do miocárdio normalmente resultam de adesão/agregação das plaquetas nas lesões ateroscleróticas rompidas nas artérias coronárias (6–8). Além disso, alguns estudos tentam encontrar uma relação direta entre as imunomoléculas presentes nas membranas plaquetárias e oclusões vasculares. Dentre estes, foi demonstrado os polimorfismos dos aloantígenos plaquetários como fatores de risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares como o infarto do miocárdio, trombose coronariana e acidente vascular cerebral (9–11).

1.2. Glicoproteínas de membrana plaquetária

O processo de hemostasia mediado por plaquetas é complexo e envolve várias interações entre ligantes e receptores. A maioria dos receptores plaquetários é formada por glicoproteínas (GP) com duas ou mais subunidades polipeptídicas, consideradas os principais componentes de suas membranas presentes na superfície celular. Estes receptores são responsáveis pela adesão, ativação e a agregação das plaquetas, os quais possuem domínios extracelular, citoplasmáticos e transmembranares que possibilitam as interações entre o subendotélio vascular e outras plaquetas (12,13).

De forma geral, o processo da coagulação se inicia pela exposição do subendotélio vascular que estimula a imediata união do complexo GP Ib/V/IX ao fator de Von Willebrand e a adesão da GP Ia/IIa ao colágeno subendotelial. Estas ligações ativam a GP IIb/IIIa que se liga ao fibrinogênio, e que por fim promove a agregação das plaquetas (13,14). Diferenças interindividuais na resposta exercida pelas plaquetas são normalmente encontradas, e, portanto, é razoável sugerir que variações herdadas nas GP podem contribuir para sua heterogeneidade funcional (15,16).

1.3. Antígenos plaquetários humanos (HPAs)

As GPs de membrana plaquetária carregam antígenos plaquetários humanos (HPAs), cujos genes que os codificam são polimórficos. Este polimorfismo é originado da substituição de único par de nucleotídeos, resultando na troca do aminoácido na proteína, induzindo uma alteração na estrutura das GPs (12). As funções das plaquetas são mediadas por estes receptores de GPs, portanto o polimorfismo nos HPAs pode alterar as funções das mesmas.

Existem dois tipos diferentes de antígenos nas membranas plaquetárias que possuem relevância clínica: os antígenos partilhados com outras células do sangue e tecidos, ditos como antígenos do Tipo I. Dentre estes estão os glicoconjugados do sistema de grupo sanguíneo ABH e as moléculas altamente polimórficas dos antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I. Os antígenos do Tipo II são específicos das plaquetas, e são convencionalmente denominados antígenos plaquetários específicos (17).

Atualmente, são expressos 35 HPAs em seis diferentes GPs (GPIIb, GPIIIa, GPIIb α , GPIIb β , GPIa e CD109). Eles são agrupados em seis sistemas bialélicos (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5 e HPA-15) (Figura 1) e são numerados pela ordem da descoberta. O antígeno ou alelo de maior frequência é denominado de “a” e o de menor frequência é denominado de “b” e, quando o par antitético não foi identificado é adicionado a letra “w” (18–20).

O complexo GPIb/V/IX faz parte da família de proteínas com repetições ricas em leucina e atua como receptor para o fator de von Willebrand (FvW). A GPIb consiste de uma cadeia beta (GPIb-beta, CD42c) ligada a uma cadeia alfa (GPIb-alfa, CD42b) que se ligam de forma não covalente para formar o complexo com GP IX (CD42a) e GP V. O gene *GP1BA* codifica a GPIb α localizado no cromossomo 17, GPIb β é codificada pelo gene *GP1BB* presente no cromossomo 22, e a GP IX pelo gene *GP9* no cromossomo 3. A função da GPIb/V/IX é intervir na ativação da integrina α IIb β 3 e mediar as interações plaqueta-endotélio através do FvW, isto é, promover a adesão plaquetária ao endotélio lesado (12,16). Além disso, este complexo também desempenha um papel importante na agregação das plaquetas, pois funciona como receptor para a trombina, fatores IX, XII e P-selectina (31).

Neste complexo, na GPIb α está expresso o HPA-2 (rs6065), cujo polimorfismo é originado da substituição de uma citosina por timina na posição 482, resultando na troca de uma treonina por uma metionina na posição 145 da proteína. O HPA-2 situa-se perto do FvW e dos locais de alta afinidade de ligação a trombina e pode, portanto, influenciar a função do receptor destas moléculas (32).

O principal receptor de colágeno nas plaquetas é o complexo GPIa/IIa (integrina α 2 β 1). A GPIa é codificada pelo gene *ITGA2* no cromossomo 5 e GPIIa pelo *ITGB1* no cromossomo 9. Além disso, a GPIa carrega o HPA-5 (rs10471371), seu polimorfismo é gerado pela substituição de uma guanina por uma adenina na posição 1600 resultando na troca de um glutamato por uma lisina na posição 505 da proteína. O alelo do HPA-5b está associado ao aumento do número de GPIa na superfície plaquetária (33).

O CD109 é uma proteína ligada ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) codificada pelo *CD109* no cromossomo 6, membro da superfamília alfa2-macroglobulina. A proteína CD109 liga-se e regula negativamente a sinalização do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β). Existem apenas cerca de 1000 moléculas por plaquetas, embora números maiores sejam expressos em linfócitos T ativados, células CD34⁺ hematopoiéticas e células endoteliais. Os HPA-15 (rs10455097) residem neste complexo, seu polimorfismo é resultado da substituição de uma citosina por uma adenina na posição 2108 do gene, com a troca de uma serina por uma tirosina na posição 682 da proteína (34).

A tabela 1 resume as principais características moleculares dos cinco mais frequentes sistemas dos HPAs.

Tabela 1 Bases moleculares dos principais sistemas dos HPAs

Sistema	Glicoproteína	Gene	Cromossomo	Substituição do nucleotídeo	Troca da proteína
HPA-1	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	T176C	Leu33Pro
HPA-2	GPIb α	<i>GP1BA</i>	17	C482T	Thr145Met
HPA-3	GPIIb	<i>ITGA2B</i>	17	T2621G	Ile843Ser
HPA-5	GPIa	<i>ITGA2</i>	5	G1600A	Glu505Lys
HPA-15	CD109	<i>CD109</i>	6	C2108A	Ser682Tyr

Fonte: Immuno Polymorphism Database (20)

1.5. Polimorfismo dos HPAs e implicações clínicas

O histórico familiar e as variações genéticas decorrentes dos polimorfismos que ocorrem, por exemplo, nos genes da GPIIIa, permitiram identificar o potencial de ativação das plaquetas e o aumento da eficiência da ligação desta GPs ao fibrinogênio e, assim contribuir com o desenvolvimento de trombozes (35). Mutações nos genes que codificam as glicoproteínas são responsáveis por doenças hereditárias que afetam a hemostasia primária, como a síndrome de Bernard-Soulier e a trombostenia de Glanzmann (36,37).

O impacto de alguns polimorfismos nas glicoproteínas de HPA tem sido estudado como um eventual fator de risco para doenças trombóticas e hemorrágicas. O primeiro estudo realizado neste sentido foi o do Weiss et al. (9), o qual avaliou o polimorfismo do HPA-1 em 71 pacientes que apresentaram infarto do miocárdio ou angina instável e compararam com 68 controles (indivíduos sem doença cardíaca). Eles observaram maior prevalência do HPA-1b nos pacientes e, ainda, que a associação foi mais proeminente nos pacientes com menos de 60 anos. Estes resultados foram corroborados por outros, em diferentes contextos tais como em estudo prospectivo, como fator de risco familiar, etnias distintas, associação haplotípica com HPA-2 (38–40). Além do HPA-1, outros HPAs também foram considerados como fatores de risco às doenças trombóticas arterial, como o polimorfismo do HPA-2 (11,41,42), o HPA-3 (10,43) e HPA-5 (44).

Entretanto houveram muitos outros estudos, cuja a associação do polimorfismo dos HPAs com doenças cardíacas não foi identificada (45–50). Dentre estes, um grande estudo prospectivo acompanhou quase 15.000 homens por 8,6 anos: durante este período, 374 homens tiveram o primeiro infarto do miocárdio, 209 acidente vascular cerebral e 121 trombose venosa. Estes pacientes foram pareados com um grupo controle e não foi encontrada associação entre o polimorfismo do HPA-1 e estas patologias (48). Aleksic et al. (49) avaliaram o polimorfismo do HPA-1 e a ativação plaquetária, medindo no plasma os níveis β -tromboglobulina, a qual não foi alterada nos indivíduos que apresentaram o alelo HPA-1b. O polimorfismo do HPA-1 e a associação com a doença arterial coronariana foi avaliado em

uma meta-análise: Verdoia et al. (50) analisaram sete artigos totalizando 6700 pacientes e concluíram que o polimorfismo do HPA-1 não influenciou na prevalência e na extensão da doença arterial coronariana, embora aparentemente desempenhe um papel importante entre os pacientes mais jovens.

Alguns estudos têm avaliado a função dos receptores em relação ao polimorfismo dos HPAs. Feng et al. (51) avaliaram em um estudo prospectivo o genótipo HPA-1 e a agregação plaquetária em 1422 indivíduos. Como resultado foi observado que indivíduos que expressavam pelo menos um alelo mutado (HPA-1a/1b ou HPA-1b/1b) apresentavam um aumento na agregação plaquetária quando comparados com HPA-1a/1a, o que foi compatível com estudos que observaram aumento do risco de doenças cardiovasculares em indivíduos com este polimorfismo. Entretanto este mesmo grupo identificou, em um outro estudo, que os níveis de fibrinogênio no plasma aumentaram concomitantemente com a agregação plaquetária, porém esta relação só foi vista nas plaquetas com o genótipo HPA-1a/1a e não nos genótipos HPA-1a/1b e nem no HPA-1b/1b. Contudo, no geral, o genótipo para o alelo mutado possui uma maior agregação plaquetária comparado com o genótipo homocigoto HPA-1a/1a, embora as plaquetas com o alelo HPA-1b se liguem em quantidade menor ou similar de fibrinogênio exógeno ao receptor GP IIb/IIIa do que as plaquetas com o genótipo HPA-1a/1a (52).

Da mesma forma que o polimorfismo dos HPAs tem sido relacionado com a hiperativação das plaquetas, resultando em uma atividade trombótica aumentada, é coerente pensar que este polimorfismo possa ser um fator de resistência nos casos de doenças hemorrágicas. Nesta direção, Iniesta et al. (53) observaram que o alelo HPA-1b teve uma ação protetora na hemorragia subaractnóide, especialmente em aneurisma de menor dimensão, atenuando a gravidade da hemorragia.

Como o desenvolvimento de doenças trombóticas é distinta entre os gêneros, alguns estudos foram conduzidos na tentativa da elucidação desta diferença. Faraday et al. (54) quantificaram e mediram a atividade do receptor GPIIb/IIIa, glicoproteína que possui papel central na agregação plaquetária e, conseqüentemente, na trombose. A avaliação foi conduzida em um grupo de 19 homens e 21 mulheres, com média de idade de 30 anos, e os parâmetros analisados foram a quantificação do receptor na membrana plaquetária e a afinidade do fibrinogênio de se ligar neste receptor. Diferenças nestes parâmetros não foram observadas entre os gêneros. Entretanto, nas mulheres estes receptores são mais ativos, principalmente, se estas estiverem na fase pré-menstrual, do ciclo menstrual, indicando que os

hormônios relacionados ao sexo, como progesterona e estrógeno, podem de alguma forma influenciar na função destes receptores.

Neste mesmo contexto Boudoulas et al. (55) investigaram o efeito do estrógeno na agregação plaquetária em relação a ausência ou presença do polimorfismo do HPA-1 em 20 homens (10 HPA-1a/1a e 10 HPA-1a/1b) e 10 mulheres (5 HPA-1a/1a e 5 HPA-1a/1b). Eles observaram que o estrógeno só apresentou um efeito inibidor na agregação plaquetária nos indivíduos que apresentaram o genótipo heterozigoto, em concentrações fisiológicas do estrógeno. Para que se obtivesse este mesmo nível de inibição de agregação plaquetária no genótipo homozigoto, HPA-1a/1a, foi necessário um concentração 1.000 vezes maior de estrógeno.

Atualmente, a associação entre o polimorfismo HPA tem sido avaliada em outras condições crônicas, com no diabetes *mellitus* tipo 2 (56–58) e em doenças infecciosas, como em pacientes mono infectados com o vírus da hepatite C (HCV), em coinfeção com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Silva et al. (59) avaliaram o polimorfismo HPA-1, -3 e -5 na progressão da fibrose no fígado em pacientes infectados cronicamente com HCV. Eles demonstraram que o genótipo HPA-1a/1b foi associado ao desenvolvimento da forma mais grave da fibrose em pacientes infectados com HCV.

Considerando as funções biológicas dos antígenos plaquetários humanos correlacionados à formação de trombos, fibrinólise, reparo, fibrose e, ainda, as funções plaquetárias correlacionados com o processo inflamatório nas respostas imunes inatas e específica, formulou-se a hipótese de uma associação entre o polimorfismos dos HPAs e a gravidade da cardiomiopatia na doença de Chagas.

2. DOENÇA DE CHAGAS OU TRIPANOSSOMÍASE AMERICANA

2.1. Histórico

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é causada pela infecção do protozoário hemoflagelado *Trypanossoma cruzi*, geralmente transmitida quando as fezes infectada do vetor Triatominae são inoculadas através do local da picada ou pelas mucosas intactas do hospedeiro mamífero. Foi descoberta pelo médico e cientista, brasileiro, Carlos Ribeiro Justiniano Chagas.

Em 1907, Dr. Carlos Chagas era pesquisador assistente do Instituto de pesquisa de Manguinhos e seu diretor, Oswaldo Cruz, o designou a trabalhar no controle da malária, uma vez que esta doença estava impedindo avanços na construção da Estrada de Ferro Central do

Brasil, na região norte do estado de Minas Gerais. Após um determinado período em que Chagas estava na cidade de Lassance, ele recebeu a informação que havia um hematófago, conhecido como barbeiro pelos moradores, que picava a face dos habitantes durante a noite e que durante o dia escondia entre as frestas das paredes e nas coberturas das casas. Ao examinar o intestino deste inseto, na época chamado de *Conorrimus megistus* (*Panstrongylus megistus*), Chagas encontrou “critídias” (epimastigota). Ele então deduziu que este hematófago que continha parasitas poderia transmiti-los aos humanos quando este sugava o sangue. O passo seguinte foi verificar se colocando o hematófago em contato com sagui do gênero *Callithrix* não infectado, o infectaria, entretanto esta etapa foi realizada por Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro. Cerca de 20 a 30 dias após o contato do hematófago com o sagui, Cruz identificou a presença do parasita em uma amostra de sangue do sagui. Em seguida, Chagas retornou ao Rio de Janeiro para proceder com estudos em outros mamíferos e foi confirmado a infecção. Este parasita flagelado parecido com as espécies do gênero *Trypanosoma* ele denominou *Schizotrypanum cruzi* (*Trypanosoma cruzi*) (60). Ao retornar para Lassance Chagas estava certo que havia descoberto uma nova patologia e então começou examinar o sangue de vários habitantes da região e dos animais domésticos. Primeiro ele encontrou um gato infectado e posteriormente identificou o parasita no sangue de uma criança de dois anos, febril, com hepatoesplenomegalia e com edema subpalpebral, que tudo indica ser o sinal de Romaña (característica típica da Doenças de Chagas aguda), chamada Berenice (Figura 2).



Figura 2 Berenice, primeira paciente de Carlos Chagas. Fonte: Chagas (61)

Em 1912, Carlos Chagas descobriu em um tatu da espécie *Dasypus novemcinctus* infectado por *T. cruzi* estar na mesma toca como *Triatoma geniculata*. Assim ele concluiu a descoberta do ciclo domiciliar e silvestre da doença. Em 1916, Chagas ampliou seus estudos sobre a fase aguda da doença (61) e, em 1922, Chagas e Villela descreveram a forma crônica cardíaca, completando assim os seus estudos clínicos sobre a doença (62). Com isso ele caracterizou a fase aguda da doença e posteriormente a fase crônica, sendo portanto considerado o primeiro pesquisador, até o momento, que descreveu uma patologia por completo: agente etiológico, vetor, hospedeiros, ciclo epidemiológico e as manifestações clínicas em humanos.

2.2. Agente etiológico

2.2.1. Origem

O *Trypanosoma* primitivo era parasita monogênico de insetos não hematófagos. Quando estes insetos adquiriram o hábito de sugar sangue, o *Trypanosoma* foi submetido a alterações funcionais e morfológicas, tais como o desenvolvimento de membrana ondulante e flagelo, a fim de circularem no sangue dos vertebrados (63). A presença do *T. cruzi* é bastante antiga, há relatos da presença do DNA deste parasita em múmias peruanas cerca de 9.000 anos atrás e em múmias brasileiras cerca de 7.000 anos (64). Além disso, cerâmicas peruanas que datam do séculos XIII e XVI revelam possíveis representações da doença de Chagas, incluindo uma cabeça com edema ocular unilateral, idêntico ao sinal Romaña que muitas

vezes caracteriza o contexto da infecção aguda (65). Charles Darwin em sua viagem à América do Sul, em 1835, registrou a presença de triatomíneos, porém não associou a nenhuma patologia. Há fortes suspeitas que Darwin teria contraído a Doença de Chagas e sido ela a responsável pela sua morte, visto que ele apresentou sintomas gastrointestinais e problemas cardíacos (66).

2.2.2. Ciclo Biológico

O *Trypanosoma cruzi* possui formas morfológicas bastante variáveis durante os diversos estágios do seu ciclo de vida, representando uma adaptação ao meio extra e intracelular encontrados nos hospedeiros. Nos hospedeiros mamíferos são encontradas as formas: tripomastigota, não proliferativa intracelular e extracelular, e a amastigota, proliferativa somente intracelular. Nos vetores triatomíneos são encontradas as formas: epimastigota, proliferativa no intestino e tripomastigota metacíclico, infectante no intestino posterior e reto (Figura 3). No hospedeiro mamífero, onde a doença pode realmente se estabelecer, uma série de alterações fisiológicas são evidenciadas enquanto no inseto vetor nenhum tipo de dano foi ainda observado (67,68).

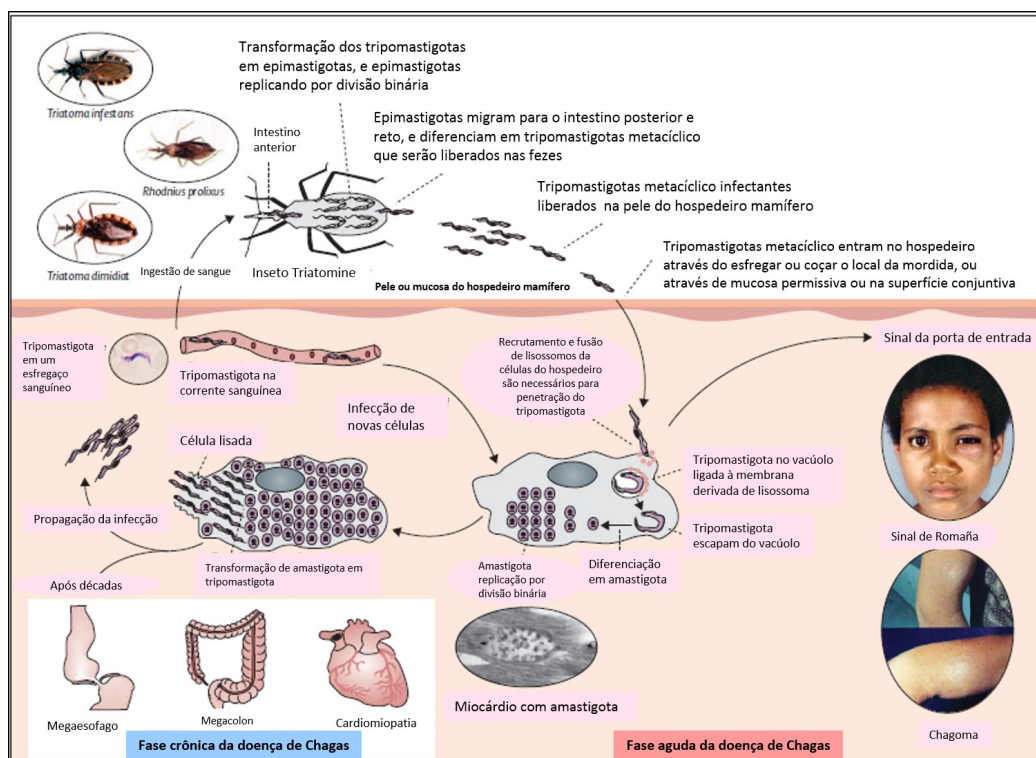


Figura 3 Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Adaptado de Rassi et al. (68)

2.3. Vetor

Os vetores são pertencentes a ordem Hemiptera, da família Reduviidae e da subfamília Triatominae. Atualmente são conhecidas mais de 140 espécies as quais pertencem a cinco

tribos e dezesseis gêneros. Contudo apenas algumas espécies de três gêneros, *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, são vetores importantes de *T. cruzi* entre animais domésticos e seres humanos em áreas endêmicas. Triatomíneos tem cinco fases de ninfa e adultos de ambos os sexos, todos os quais podem abrigar e transmitir *T. cruzi* (69).

Historicamente, *T. infestans* foi, de longe, o mais importante vetor, principalmente no sul da América do Sul. Sua origem foi na Bolívia onde é encontrado em áreas domiciliar, peri domiciliar e silvestre e foi transportado para a Argentina, Chile, Paraguai, Uruguai e Brasil, onde tornou-se exclusivamente doméstico (70,71). Entretanto, em 1991, foi criada a Iniciativa dos países do Cone do Sul da América para o controle da Doença de Chagas resultando na eliminação do *T. infestans* no Uruguai, em 1997, no Chile, em 1999, e no Brasil em 2006, os quais foram certificados pela Organização Pan-Americana da Saúde (72,73). Atualmente o *P. mengitius* é o que tem maior relevância como um potencial vetor no Brasil, dada a sua ampla distribuição geográfica em todo o país, a sua susceptibilidade a *T. cruzi* e sua versatilidade como um vetor selvagem com adaptação fácil nos domicílios. Esta espécie está distribuída a partir das Guianas a Argentina, Paraguai e Bolívia. O *R. prolixus* é considerado nativo da Venezuela e Colômbia, originalmente era encontrado em palmeiras das árvores e depois se adaptou aos domicílios. Além disso, ele é antropofílico, possui ciclo de desenvolvimento rápido, grande densidade, intensa dispersão passiva e alta susceptibilidade à infecção e transmissão do *T. cruzi*, o que o torna um importante vetor nestes países (70,71).

A origem dos vetores é selvagem, o ciclo de vida do *T. cruzi* acontecia de forma natural utilizando pequenos mamíferos silvestres, desta forma era considerada uma doença enzoótica. Entretanto a invasão do homem ao habitat natural dos triatomíneos, inicialmente, devido a agricultura e intensificado pela agropecuária, resultou no desmatamento e retirada da sua fonte de alimento. Para sobreviver, os triatomíneos progressivamente tiveram que se adaptar as áreas peri domiciliares e domiciliares. Com isso houve uma evolução da doença de Chagas de enzoótica entre os animais selvagens para uma antropozoonose quando a humanidade invadiu ecótopos silvestres e foram infectados (74,75).

2.4. Epidemiologia

A Doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina, afeta cerca de 6 a 8 milhões de pessoas e é responsável por 10 mil mortes por ano e por 28 mil novos casos. Além disso, 65 milhões de pessoas estão em área de risco (76). A mortalidade precoce e a incapacidade substancial causadas por esta doença, que muitas vezes ocorre na população mais produtiva, os jovens adultos, resulta em uma perda econômica significativa (77).

Segundo dados da organização Drugs For Neglected Diseases *initiative* (DNDi), a doença de Chagas representa um custo global de US\$ 7,2 bilhões por ano. O Brasil está no topo do ranking em perdas de produtividade com um custo de US\$ 1,3 bilhões (78).

Esta doença é uma das 17 doenças tropicais negligenciadas classificada pela Organização Mundial da Saúde, ou seja, esta patologia acomete principalmente a população de baixa renda que vive em áreas rurais em países em desenvolvimento (79). Entre outros fatores, ela é resultante de um descaso das políticas de saúde pública e do baixo investimento em pesquisa por parte das indústrias farmacêuticas. Contudo nos países endêmicos a prevalência da doença de Chagas vem reduzindo nas últimas décadas em virtude da eliminação do principal vetor do *T. cruzi* e do estabelecimento do exame sorológico na pesquisa pelo *T. cruzi* em todos os doadores de sangue, embora ainda seja um problema de saúde pública com uma alta morbimortalidade (80,81).

Os países não endêmicos estão apresentando aumento no número de pessoas infectadas por *T. cruzi*. Nos Estados Unidos são mais de 300.000, cerca de 80.000 na Europa e mais de 10.000 em outros países, especialmente a Austrália, Canadá e Japão (82,83) (Figura 4). Este aumento está relacionado ao crescimento das imigrações de latinos americanos. Acredita-se que estes valores possam estar subestimados, devido à falta de um sistema de triagem universal, médicos mal treinados para diagnosticar esta patologia e a maioria dos casos serem em imigrantes de áreas endêmicas, os quais quase não tem acesso aos cuidados a saúde (84).



Figura 4 Distribuição global dos casos da doença de Chagas, segundo estimativas oficiais, 2006-2010. Fonte: Adaptado Organização Mundial da Saúde (85)

2.5. Modo de transmissão

Os mecanismos possíveis de contrair a doença de Chagas são classificados em primários e secundários. Os primários compreendem a transmissão vetorial (a mais importante), a via oral, a transfusão de sangue e a via congênita. Os secundários compreendem o acidente laboratorial, a manipulação de animal infectado, transplante de órgãos, contato com feridas, via sexual com espermatozoides e fluido menstrual contaminados, e infecção induzida criminalmente (74).

Em função das ações de controle de vetores a partir da década de 1970, culminando na eliminação do principal vetor no Brasil em 2006, esta forma de transmissão tem diminuído drasticamente. Entretanto a transmissão por via oral, a qual ocorre de maneira esporádica e circunstancial por meio de alimentos contaminados com o parasita, principalmente a partir de triatomíneos ou de suas dejeções, tem sido a principal fonte de infecção no Brasil (Tabela 2). De acordo com o Ministério da Saúde houveram 112 surtos em todo território entre 2005 e 2013, sendo a maioria dos casos relatada na Amazônia em surtos de contextos familiares ou multifamiliares. A fonte provável de infecção foi a ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*, entre eles: açaí, bacaba, jaci (coquinho), caldo de cana e palmito de babaçu. O primeiro surto oficialmente investigado da doença de Chagas aguda no Brasil por transmissão oral, ocorreu em Santa Catarina em 2005, provavelmente vinculado à ingestão de caldo de cana contaminado com *T. cruzi* (86).

Tabela 2 Doença de Chagas aguda - casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação em 2014 – Brasil. Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sinan Net (87)

Região de notificação	Transfusional	Vetorial	Congênita	Oral	Outros	Total N (%)
Norte	1	23	-	131	1	156 (96,89)
Nordeste	-	2	-	-	-	2 (1,24)
Sudeste	-	-	1	-	-	1 (0,62)
Sul	-	-	-	-	1	1 (0,62)
Centro-Oeste	-	-	1	-	-	1 (0,62)
Total N (%)	1 (0,62)	25 (15,53)	2 (1,24)	131(81,37)	2 (1,24)	161

A infecção pelo *T. cruzi* por transfusão de sangue, antes da Iniciativa dos países Cone do Sul, também era uma fonte importante de disseminação da doença de Chagas nos países endêmicos. Contudo com implantação de uma rigorosa triagem em seus doadores de sangue, esta forma também apresentou uma significativa redução. No entanto, muitos países endêmicos e não endêmicos não introduziram controles em relação aos seus doadores de

sangue e ainda, mais preocupante, é o fato destes países não endêmicos estarem recebendo milhares de migrantes de áreas endêmicas que carregam a doença de Chagas (71).

A transmissão congênita ou vertical ocorre via transplacentária e a determinação do risco de transmissão está relacionado a fatores tanto da mãe, como fase da gestação e estado imunológico, quanto do parasita. Todos os casos de infecção por *T. cruzi* congênita devem ser tratados, com benznidazol ou nifurtimox, logo que o diagnóstico for confirmado. O tratamento, geralmente, é bem sucedido e sem as reações adversas observadas em adultos, se administrada durante o primeiro ano de vida. Todas as crianças devem ser acompanhadas após o tratamento para garantir que elas eliminaram o parasita (88). Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que em 1 milhão de mulheres entre 15 e 44 anos estejam infectadas por *T. cruzi* e cerca de 5% das crianças de mães infectadas possam adquirir esta patologia. No Brasil a prevalência é de 0,02% para esta forma de transmissão (86).

Outras formas de transmissão são bem menos frequentes, como transmissão acidental com pesquisadores e técnicos de laboratório que trabalham com o parasita, através do sangue de pessoas infectadas e animais, meios de cultura, ou vetor.

2.6. Manifestações Clínicas

Alguns fatores são determinantes para desenvolvimento da doença de Chagas, alguns relacionados ao parasita como: quantidade de parasitas no inoculo inicial, a linhagem inoculada e a qualidade da cepa e clones; e alguns ao hospedeiro como: a qualidade da resposta imunológica (inicial ou tardia; eficaz ou ineficaz); imunossuprimidos e reinfeção (67,89).

2.6.1. Fase aguda

A fase aguda ou inicial é caracterizada pela maior parasitemia podendo ser microscopicamente evidenciada a forma tripomastigota de *T. cruzi* em amostra de sangue periférico do paciente, com duração de cerca de 2 meses (Figura 5a). A maioria dos casos é oligo ou assintomática. No Brasil menos de 1% dos infectados apresentam sintomatologia da fase aguda, por isso não são diagnosticados (90,91). No entanto, quando presentes, os principais sinais estão relacionados à porta de entrada do parasita, como uma lesão de pele (chagoma) ou inchaço das pálpebras, púrpura de um olho (Sinal de Romana), gânglios linfáticos aumentados localmente e febre com duração de várias semanas. Outros sintomas podem incluir dor de cabeça, palidez, dor muscular, dispneia, edema das pernas ou rosto, dor abdominal, tosse, hepatomegalia, erupção cutânea, nódulos dolorosos, esplenomegalia, inchaço generalizado, diarreia, adenopatias múltiplas, e nos casos mais graves miocardite e

meningoencefalite. A doença pode ser mais grave em crianças com menos de 5 anos de idade, idosos, indivíduos imunossuprimidos ou infectados com um elevado número de parasitas, tal como ocorre em surtos de origem alimentar (transmissão oral) (76,92).

Nesta fase ocorre uma lesão caracterizada por uma reação inflamatória local, com predomínio de células mononucleares no local da ruptura dos pseudocistos, geralmente com formação de granuloma localizado no tecido muscular e cardíaco (Figura 5b) (93).

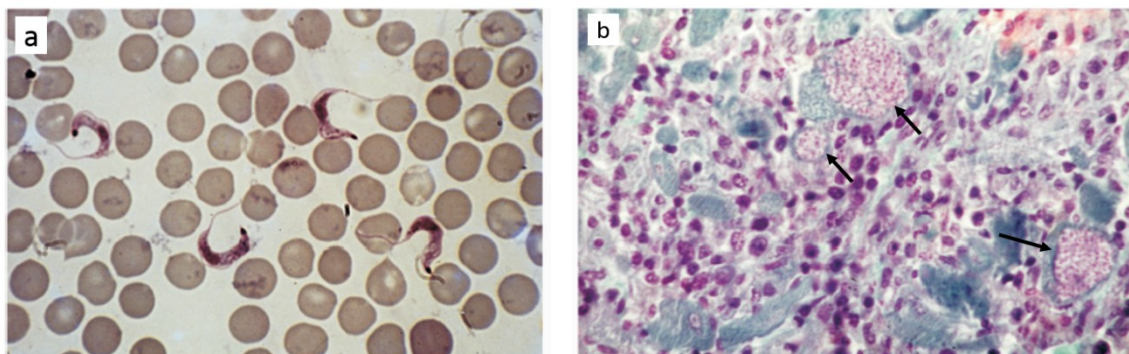


Figura 5 Duas fases do *T. cruzi* encontrada no hospedeiro mamífero
a. tripomastigotas circulantes no sangue durante a fase aguda; **b.** ninhos de amastigotas (ponta da seta) em fibras miocárdicas na fase aguda da doença de Chagas. Fonte: Adaptado de Coura (74)

Os exames laboratoriais para confirmação do diagnóstico são baseados na pesquisa direta do parasita, como hemocultura e microscopia, ou pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* (IgM), pelo ensaio de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) ou hemaglutinação indireta (HAI) (86). Atualmente, esta é a única fase que, se diagnosticada corretamente, há drogas tripanossomicida eficazes. Desta forma, a mortalidade é em menos de 5% de todos os casos sintomáticos, muitas vezes como consequência da meningoencefalite ou miocardite (91,94).

Na maioria dos casos, os indivíduos desenvolvem uma resposta imunológica inata, humoral e celular adequada responsável pela diminuição de *T. cruzi* na circulação sanguínea, resultando no desaparecimento de todos os sinais e sintomas clínicos, levando estes pacientes a fase crônica da doença podendo ou não desenvolver outras complicações clínicas (93).

2.6.2. Fase Crônica

Após a fase aguda, sintomática ou assintomática, os indivíduos infectados podem permanecer no estágio assintomático ou indeterminado por toda sua vida, ou 5 a 30 anos após a infecção inicial desenvolver comprometimento cardíaco e/ou digestivo. Os exames sorológicos utilizados para o diagnóstico nesta fase são baseados na pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* (IgG), uma vez que a parasitemia é baixa são utilizados como referência ELISA

ou IFI, e nos casos de dúvida interpretação, confirmado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a qual é feita a pesquisa do DNA do parasita (84).

A fase indeterminada, acomete em média de 60-70% dos indivíduos, é caracterizada por parasitemia sub-patente e redução quase completa da inflamação. Ela é modulada por fatores imunológicos do hospedeiro que podem durar por toda a vida do indivíduo e, praticamente, não ocorre alteração anatomopatológica, exceto alguns focos inflamatórios isolados ocasionais no miocárdio e redução no número de neurônios cardíacos e plexos mioentérico, porém insuficiente para originar manifestações clínicas (95,96).

O paciente classificado na fase indeterminada deve apresentar exame sorológico positivo para *T. cruzi*; eletrocardiograma normal e exames radiológicos do tórax, esôfago e colón normais; ausência de sinais e sintomas clínicos da doença de Chagas. Os indivíduos classificados nesta fase tem um bom prognóstico, e sua expectativa de vida é similar à de indivíduos sem esta patologia. Entretanto entre 1 a 3% de pacientes ao ano podem evoluir da forma indeterminada para a forma clínica (81,97,98).

Cerca de 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma digestiva, sendo esta caracterizada por alterações nas funções secretora, motora e absorptiva do trato gastrointestinal. Lesões no sistema nervoso entérico são fundamentais na patogênese da doença de Chagas digestiva na síndrome dos megas. O plexo mioentérico ou de Auerbach, localizado entre a camada muscular longitudinal e circular no trato digestivo, é o principal afetado (99,100). Há uma redução acentuada no número de células nervosas nesta área. A desnervação ocorre em graus variáveis, é irregular e descontínua, e provavelmente dependente de fatores do parasita e do hospedeiro. Embora desnervação intrínseca possa ser encontrada ao longo de todo o trato digestivo, o esôfago e cólon distal, por causa de sua fisiologia, são os segmentos mais envolvidos. Como consequência da desnervação, pode ocorrer incoordenação motora e acalasia do esfíncter, o que torna difícil para esses segmentos esvaziar o material semi-sólido, levando a dilatação com o tempo, sendo este o mecanismo fisiopatológico subjacente ao megaesôfago e megacólón (74,99).

Aproximadamente, 30% dos infectados desenvolvem a cardiomiopatia Chagásica crônica (CCC), sendo esta a forma mais grave da doença de Chagas. A insuficiência cardíaca de etiologia chagásica tem um mau prognóstico e taxa de sobrevivência menor que 50% quando comparada a outras cardiomiopatias de etiologias não inflamatórias, como cardiomiopatia dilatada idiopática e isquêmica. Além disso, nos países endêmicos é a principal causa de doença cardíaca e mortes relacionada a problemas cardiovasculares (101–103).

As principais características encontradas nos pacientes com CCC são: arritmias, insuficiência cardíaca, hipertrofia das fibras do miocárdio, dilatação das cavidades, presença de trombos, dor torácica atípica e morte súbita. Pode ocorrer ainda uma fibrose miocárdial extensiva, destruição do sistema de condução e uma grande redução no número de neurônios cardíacos. É importante ressaltar que, nestes casos, focos inflamatórios isolados de reação aguda estão ocasionalmente presentes, indicando um possível processo de reativação (101,103–105). Aproximadamente um terço dos pacientes com CCC desenvolvem a forma letal da cardiomiopatia dilatada e esta gravidade muitas vezes está correlacionada com a ocorrência de miocardite. Relatos da literatura sugerem que a miocardite desempenha um papel importante na destruição dos cardiomiócitos, fibrose e progressão da doença (106,107).

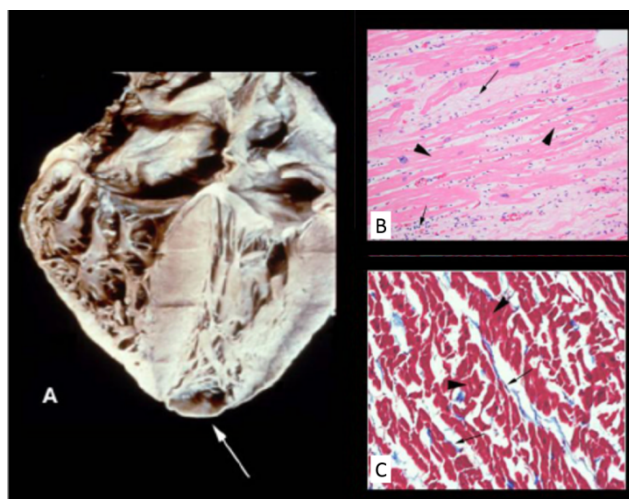


Figura 6 Imagem anatômica e corte histológico de um coração chagásico (A) mostra o alargamento de 4 câmaras do coração em um paciente chagásico. Aneurisma apical é marcado com uma seta. (B) corte histológico, corado por HE, do miocárdio de um paciente com CCC mostrando fibrose e inflamação crônica (seta). (C) corte histológico do miocárdio de um doador saudável, não infectados, para comparação. Fonte: Adaptado de Machado et al. (108)

Até o momento a patogênese da CCC não foi completamente elucidada, porém existem duas principais linhas de pesquisa, as quais tem direcionado a maioria dos estudos: a primeira, em relação a reação inflamatória local resultando em necrose, destruição tecidual e formação de cicatriz com fibrose (109); a segunda, envolve os processos imunológicos com mecanismos mais complexos, tanto para compreendê-los como para comprová-los. Dentre estes, a autoimunidade pode ser responsável por algumas características encontradas nos pacientes com CCC, mas não todas. *T.cruzi* sensibiliza os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, com o desenvolvimento de células anti-miocárdial, associada com ativação e migração de macrófagos e liberação de fatores de agregação plaquetária, resultando em miocardite e lesões miocárdial isquêmica (110,111).

O infiltrado inflamatório na CCC é composto principalmente por macrófagos e linfócitos B e T, com predomínio de CD8⁺ em relação a CD4⁺, na taxa de 2:1. Este infiltrado inflamatório é responsável pela destruição local dos cardiomiócitos e fibrose; é mais frequente em pacientes com cardiomiopatia dilata; e além disso, quanto maior a celularidade deste infiltrado maior grau de dilatação ventricular, ou seja, este infiltrado tem um papel importante tanto no desenvolvimento como na progressão da cardiomiopatia chagásica. Curiosamente, o parasita raramente está presente neste infiltrado inflamatório, entretanto antígenos *T.cruzi* e seu DNA estão presentes (74,107,112).

Na tentativa de elucidar a imunopatogênese da doença de Chagas tem havido um grande interesse na investigação de possíveis marcadores genéticos, visto que a agregação familiar na CCC tem sido descrita, sugerindo a existência de um componente genético susceptível à doença. Isto também é apoiado pelo fato de apenas 30% dos indivíduos infectados desenvolverem a CCC e apenas um terço deles a forma letal. Dada a importância dos mecanismos inflamatórios para patogênese CCC, a susceptibilidade genética para CCC pode resultar de polimorfismos genéticos funcionalmente relevantes que levem a variações na intensidade da resposta imune inata ou adquirida e citocinas inflamatórias e quimiocinas envolvidas na patogênese da doença (100,113–115).

Por ser uma doença multi fatorial, é esperado que a participação de cada um dos genes envolvidos no desenvolvimento da CCC seja muito pequena (1-10% da susceptibilidade). No entanto, a identificação de genes-chave e potentes combinações genéticas juntamente com os fatores ambientais podem levar à identificação de possíveis fatores de risco ao desenvolvimento das formas crônicas sintomáticas da doença de Chagas (108,116–118). Polimorfismo em outros genes, além dos envolvidos na resposta imune e inflamação, como os relacionados em doenças cardiovasculares (insuficiência cardíaca e doença cardíaca isquêmica), também devem ser pesquisados na busca da elucidação mais profunda da patogênese da doença de Chagas (112).

3. JUSTIFICATIVA

As plaquetas tem papel fundamental na hemostasia. Esta função é realizada por receptores de glicoproteína de membrana plaquetária, os quais se ligam ao fator de von Willebrand (GPIb/V/IX), ao colágeno (GPIa/IIa) e ao fibrinogênio (GPIIb/IIIa) e, desta forma, realizam a tríade da hemostasia: agregação, ativação e aglutinação. Estes receptores são codificados por genes polimórficos, em sua maioria originados pela substituição de um único par de nucleotídeos resultando na troca do aminoácido e, conseqüentemente, alterando a conformação dos receptores. Estas alterações podem alterar a função dos mesmos.

Considerando a função biológica das glicoproteínas de membrana e seus polimorfismos, nas últimas décadas têm se estudado o polimorfismo dos antígenos plaquetários humanos (HPAs) em diversas patologias cardíacas, como o infarto do miocárdio, a angina instável, a insuficiência cardíaca, e também em doenças crônicas como hepatite e diabetes *mellitus* tipo 2. Os resultados ainda são controversos, mas promissores.

A cardiomiopatia chagásica crônica é a principal causa de doença cardíaca e morte relacionada a problemas cardiovasculares nos países endêmicos. A insuficiência cardíaca de etiologia chagásica tem um pior prognóstico e uma taxa de sobrevida menor que 50% quando comparada a outras cardiomiopatias de etiologias não inflamatórias. A doença de Chagas permanece como uma doença negligenciada, sem vacinas ou medicamentos antiparasitários com eficácia comprovada em adultos cronicamente infectados, quando a maioria dos pacientes são diagnosticados.

Diante do exposto, este trabalho buscou avaliar o papel dos polimorfismos dos HPAs (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-5 e HPA-15) mais frequentes, na gravidade da cardiomiopatia chagásica crônica.

4. OBJETIVO GERAL

Investigar a associação dos polimorfismos mais frequentes dos antígenos plaquetários humanos (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-5 e HPA-15) com a gravidade da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) em uma população de pacientes com CCC dividida em três grupo: sem disfunção sistólica ventricular esquerda (DSVE); DSVE leve a moderada e DSVE grave.

4.1. Objetivos específicos

- Identificar os alelos dos genes que codificam os antígenos plaquetários humanos (HPAs) em indivíduos com CCC;

- Estimar as frequências alélicas e genotípicas para estes genes polimórficos nesta população;
- Avaliar a associação entre estes genes polimórficos e a gravidade da CCC;
- Avaliar, por análise multivariada, a associação dos polimorfismos em relação a idade e ao gênero na gravidade da CCC.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thon J, Italiano J. Platelet Formation. *Semin Hematology*. 2011;47(3):220–6.
2. Machlus KR, Jr JEI. The incredible journey : From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol*. 2013;201(6):785–96.
3. Grozovosky R, Hoffmeister K, Falet H. Novel clearance mechanisms of platelets. *Curr Opin hematology*. 2015;17(6):585–9.
4. Li C, Li J, Li Y, Lang S, Yougbare I, Zhu G, et al. Crosstalk between platelets and the immune system: Old systems with new discoveries. *Adv Hematol*. 2012;2012.
5. Garraud O, Cognasse F. Are platelets cells? And if yes, are they immune cells? *Front Immunol*. 2015;6(FEB):1–8.
6. Lebreton H, Topol E, Plow EF. Evidence for a pivotal role of platelets in vascular reocclusion and restenosis. *Cardiovasc Res*. 1996;31:235–6.
7. Gaetano G. Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. *Hemost Thromb*. 2001;86:349–56.
8. Collier BS. Historical Perspective and Future Directions in Platelet Research. *J Thromb Haemost*. 2011;9(Suppl 1):374–95.
9. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman S, Kickler TS, Becker L, et al. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med*. 1996;334:1090–4.
10. Duan H, Cai Y, Sun X, Dan H, Cai Y, Sun X, et al. Platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism HPA-3 b/b is associated with increased risk of ischemic stroke in patients under 60 years of age. *Med Sci Monit*. 2012;18(1):CR19-CR24.
11. Zhang J, Zhao L, Lv P, Liu G, Du W, Yang F, et al. Association between polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Iba1 and risk of coronary heart disease in Han Chinese, Henan, China. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):6005–11.
12. Curtis BR, Mcfarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang*. 2014;106(2):93–102.
13. Hou Y, Carrim N, Wang Y, Gallant RC, Marshall A, Ni H. Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *J Biomed Res*. 2015;29(6):437–44.
14. André P, Denis C V., Ware J, Saffaripour S, Hynes RO, Ruggeri ZM, et al. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood*. 2000;96(10):3322–8.

15. Bussel JB, Kunicki TJ, Michelson AD. Platelets: New Understanding of Platelet Glycoproteins and Their Role in Disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2000;3:222–40.
16. Ginsberg M, Xiaoping D, O’toole T. Platelet Integrins. *Thromb Haemost*. 1993;70:87–93.
17. Santoso S. Human platelet alloantigens. *Transfus Apher Sci*. 2003;28(3):227–36.
18. Peterson J, McFarland J. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. *Br J Haematol*. 2013;161(1):3–14.
19. Newman PJ. Nomenclature of Human Platelet Alloantigens: A Problem With the HPA System? *J Am Soc Hematol*. 1994;83(6):1447–51.
20. Immuno Polymorphism Database [Internet]. 2016 [cited 2016 Oct 1]. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/>
21. Jones D, Bunce M, Fuggle S, Young N, Marshall S. Human platelet alloantigens (HPAs): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. *Eur J Immunogenet*. 2003;30(6):415–9.
22. Feng M, Liu D, Shen W, Guo Z, Zhang X, Du K. Establishment of an HPA-1- to -16-typed platelet donor registry in China. *Transfus Med*. 2016;16(5):369–74.
23. Pai SC, Burnouf T, Chen JW, Lin LI. Human platelet antigen alleles in 998 taiwanese blood donors determined by sequence-specific primer polymerase chain reaction. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
24. Bianchi JVDS, de Azevedo MRA, Jens E, Nukui Y, Chamone DAF. Frequency of human platelet antigens in oncohematological patients with thrombocytopenia and the probability of incompatibility to platelet transfusions. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(3):202–5.
25. Tanaka S, Ohnoki S, Shibata H, Okubo Y, Yamaguchi H, Shibata Y. Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein IIIa in Japanese. *Transfusion*. 1996;36(9):813–7.
26. Ohto H, Miura S, Ariga H, Ishii T, Fujimori K, S M. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfus Med*. 2004;14(6):399–408.
27. Castro V, Origa A, Annichino-Bizzacchi, JM Soares M, Menezes R, MS G, Costa F, et al. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *Eur J Immunogenet*. 1999;26(5):355–60.
28. Peterson JA, Gitter ML, Kanack A, Curtis B, Mcfarland J, Aster R. New low-frequency platelet glycoprotein polymorphisms associated with neonatal alloimmune

- thrombocytopenia Julie. *Transfusion*. 2010;50(2):324–33.
29. Newman PJ, Goraki J, White G, Gidwitz S, Cretney C, Aster R. Enzymatic Amplification of Platelet-specific Messenger RNA Using the Polymerase Chain Reaction. *J Clin Invest*. 1988;81(3):932–8.
 30. Lyman S, Aster RH, Visentin GP, Newman PJ. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Baka/Bakb alloantigen system. *Blood* [Internet]. 1990;75(12):2343–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2350579>
 31. Deckmyn H, Ulrichts H, Van De Walle G, Vanhoorelbeke K. Platelet antigens and their functions. *Vox Sang*. 2004;87(Suppl 2):105–11.
 32. Kuijpers R, Faber N, Cuypers Ht, Ouwehand W, von dem Borne Aegk. NH2-Terminal Globular Domain of Human Platelet Glycoprotein Ibal Has a Methionine145/Threonine145 Amino Acid Polymorphism, Which Is Associated with the HPA-2 (Ko) Alloantigens R. *J Clin Invest*. 1992;89(February):381–4.
 33. Santoso S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Mueller-eckhardt C, Newman PJ. The Human Platelet Alloantigens Bra and Brb Are Associated with a Single Amino of 1251-radio-labeled platelet proteins. *J Clin Invest*. 1993;92(November):2427–32.
 34. Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, Harmer NJ, Lin M, Prosper JYA, et al. A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood*. 2002;99(5):1692–8.
 35. Jallu V, Poulain P, Fuchs PFJ, Kaplan C, Brevern AG De. Modeling and Molecular Dynamics of HPA-1a and -1b Polymorphisms : Effects on the Structure of the beta3 Subunit of the alphaIIb beta3 Integrin. *PLoS One*. 2012;7(11):1–10.
 36. Nurden A, Pillois X, Wilcox D. Glanzmann Thrombasthenia: State of the Art and Future Directions. *Semin Thromb Hemost*. 2014;39(6):642–55.
 37. Li J, Dai K, Wang Z, Cao L, Bai X, Ruan C. Platelet functional alterations in a Bernard-Soulier syndrome patient with filamin A mutation. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2015;8:10–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-015-0171-z>
 38. Goldschmidt-Clermont PJ, Coleman LD, Pham YM, Cooke GE, Shear WS, Weiss EJ, et al. Higher prevalence of GPIIIa PlA2 polymorphism in siblings of patients with premature coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123(12):1223–9.
 39. Bojesen S, Juul K, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard B. Platelet Glycoprotein IIb / IIIa Pl A2 / Pl A2 Homozygosity Associated With Risk of Ischemic Cardiovascular Disease and Myocardial Infarction in Young Men The Copenhagen

- City Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(4):661–7.
40. Abboud N, Ghazouani L, Ben-Hadj-khalifa S, Anabi F, Added F, Khalfallah A, et al. Human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, and HPA-3 polymorphisms associated with extent of severe coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2010;29(4):409–15.
 41. Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Corral J, Iniesta JA, Moraleda JM, et al. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease. *Blood*. 1998;92(8):2771–6.
 42. Candore G, Piazza G, Crivello A, Grimalde MP, Orlando V, CARUSO M, et al. Association between Platelet Glycoprotein Ib- and Myocardial Infarction: Results of a Pilot Study Performed in Male and Female Patients from Sicily. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1089(1):502–8.
 43. Park S, Park HY, Park C, Ko YG, Im EK, Jo I, et al. Association of the gene polymorphisms of platelet glycoprotein Ia and IIb/IIIa with myocardial infarction and extent of coronary artery disease in the Korean population. Vol. 45, *Yonsei Medical Journal*. 2004. p. 428–34.
 44. Furihata K, Nugent DJ, Kunicki TJ. Influence of platelet collagen receptor polymorphisms on risk for arterial thrombosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(3):305–9.
 45. Carlsson LE, Greinacher A, Spitzer C, Walther R, Kessler C. Polymorphisms of the Human Platelet Antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-5 on the Platelet Receptors for Fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrand Factor (GPIb/IX), and Collagen (GPIa/IIa) Are Not Correlated With an Increased Risk for Stroke. *Stroke*. 1997;28:1392–5.
 46. Hato T, Minamoto Y, Fukuyama T, Fujita S. Polymorphisms of HPA-1 Through 6 on Platelet Membrane Glycoprotein Receptors Are Not a Genetic Risk Factor for Myocardial Infarction in the Japanese Population. *Excerpta Medica, Inc*. 1997;1222–3.
 47. Kraft P, Drechsler C, Gunreben I, Heuschmann PU. Case-Control Study of Platelet Glycoprotein Receptor Ib and IIb / IIIa Expression in Patients with Acute and Chronic Cerebrovascular Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;10(3):e0119810.
 48. Ridker P, Hennekens C, Schmitz C, Stampfer M, Lindpainter K. P1A1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet*. 1997;349(9049):385–8.
 49. Aleksic N, Juneja H, Folsom A, Ahn C, Boerwinkle E, Chambless L, et al. Platelet P1A2 Allele and Incidence of Coronary Heart Disease Results From the Atherosclerosis

- Risk In Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 2000;102:1901–5.
50. Verdoia M, Casseti E, Schaffer A, Di Giovine G, De Luca G. Platelet glycoprotein IIIa Leu33Pro gene polymorphism and coronary artery disease: A meta-analysis of cohort studies. *Platelet*. 2015;26(6):530–5.
 51. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, O'Donnell CJ, Lipinska I, Sutherland PA, et al. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa P1A2 polymorphism. *Arter Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1142–7.
 52. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, O'Donnell CJ, Lipinska I, Sutherland PA, et al. Platelet Glycoprotein IIIa P1A Polymorphism, Fibrinogen, and Platelet Aggregability. *Circulation*. 2001;104:140–4.
 53. Iniesta JA, González-Conejero R, Piqueras C, Vicente V, Corral J. Platelet GP IIIa polymorphism HPA-1 (P1A) protects against subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2004;35(10):2282–6.
 54. Faraday N, Goldschmidt-Clermont PJ, Bray PF. Gender differences in platelet GPIIb-IIIa activation. *Thromb Haemost*. 1997;77(4):748–54.
 55. Boudoulas KD, Cooke GE, Roos CM, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ. The P1A polymorphism of glycoprotein IIIa functions as a modifier for the effect of estrogen on platelet aggregation. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125(1):112–5.
 56. Verdichio-Moraes C, Toralles-Pereira C, Grotto R, Silva G, Pardini M. Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in patients infected with hepatitis C virus. *J Med Virol*. 2009;81(4):757–9.
 57. Grotto R, Picelli N, Souza L, Silva G, Ferrasi A, Silveira L, et al. Human Platelet Polymorphism can be a Genetic Marker Associated With HIV/HCV Coinfection. *J Med Virol*. 2015;87:1677–81.
 58. Zhang YH, Xu SF, Zheng J, Hong HS, Fan LM. Correlation between polymorphism of platelet alloantigen genes HPA-1-5 and type 2 diabetes complication by carotid atherosclerosis in a Chinese population. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):4607–15.
 59. Silva G, Grotto R, Verdichio-Moraes C, Corvino S, Ferrasi A, Silveira L, et al. Human platelet antigen genotype is associated with progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 2012;84(1):56–60.
 60. Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Vol. 1, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1909. p. 159–218.
 61. Chagas C. Tripanosomíaze americana - forma aguda da molestia. Vol. 8, Memórias do

- Instituto Oswaldo Cruz. 1916. p. 37–65.
62. Chagas C, Villela E. Forma cardíaca da Trypanosomíase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro. 1922;5–61.
 63. Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Trypanos Mamm A Zool Monogr. 1972;5:749.
 64. Araújo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease-- a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104 Suppl(June):9–16.
 65. Carlier Y, Dias JCP, Luquetti AO, Honteberye M, Torrico F TC. Trypanosomíase americana ou maladie de Chagas. In 2002.
 66. Bean W. The illness of Charles Darwin. Am J Med. 1978;4:572–4.
 67. Andrade LO, Andrews NW. Opinion: The Trypanosoma cruzi–host-cell interplay: location, invasion, retention. Nat Rev Microbiol. 2005;3(10):819–23.
 68. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010;375(9723):1388–402.
 69. World Health Organization. CONTROL OF CHAGAS DISEASE Second report of the WHO Expert Committee World Health Organization. W H O T e c h n i c a l R e p o r t S e r i e s. 2002;905:1–109.
 70. Noireau F, Carbajal-De-La-Fuente AL, Lopes CM, Diotaiuti L. Some considerations about the ecology of Triatominae. An Acad Bras Cienc. 2005;77(3):431–6.
 71. Coura JR. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(3):277–82.
 72. Dias J, Silveira A, Schofield C. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro. 2002;97(5):603–12.
 73. Ferreira I, Silva T. transmissão da doença de Chagas pelo Triatoma infestans no Brasil: um fato histórico; Transmission elimination of Chagas' disease by Triatoma infestans. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(5):507–9.
 74. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102 Suppl(August):113–22.
 75. Nouvellet P, Cucunubá ZM, Gourbière S. Ecology, Evolution and Control of Chagas Disease: A Century of Neglected Modelling and a Promising Future. Adv Parasitol. 2015;87:135–91.
 76. World Health Organization [Internet]. [cited 2016 Oct 10]. Available from: <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>
 77. Franco-Paredes C, Von A, Hidron A, Rodríguez-Morales AJ, Tellez I, Barragán M, et

- al. Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. *BMC Int Health Hum Rights*. 2007;7:7.
78. Drugs for Neglected Disease initiative [Internet]. Available from: <http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/#ftn3>
 79. World Health Organization - NTDs [Internet]. [cited 2016 Oct 10]. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/
 80. Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(i):31–40.
 81. Nunes MCP, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(9):767–76.
 82. Requena-Méndez A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DAJ, et al. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):1–16.
 83. Conners EE, Vinetz JM, Weeks JR, Brouwer KC. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. *Acta Trop*. 2016;156:68–78.
 84. Bonney KM. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite*. 2014;21:11.
 85. World Health Organization - Map [Internet]. Map production: Neglected Tropical Disease (NTD). [cited 2016 Oct 11]. Available from: http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png
 86. Dias JCP. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Vol. 25, *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2016. p. 7–86.
 87. Ministério da Saúde - Datasus [Internet]. Doenças e agravos de notificação. [cited 2016 Oct 11]. Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>
 88. Cevallos AM, Hernández R. Chagas' disease: Pregnancy and congenital transmission. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 89. Bonney KM, Engman DM. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many? *Curr Mol Med*. 2008;8(6):510–8.
 90. Coura JR. Morbidade da Doença de Chagas..pdf. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1983;362–72.
 91. Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MOC. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. 2012;9(10):576–89.

92. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med*. 2015;373:456–66.
93. Ayo CM, Dalalio MMDO, Visentainer JEL, Reis PG, Sippert EÂ, Jarduli LR, et al. Genetic Susceptibility to Chagas disease: An overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
94. Pinto AY das N, Valente V da C, Coura JR, Valente SA da S, Junqueira ACV, Santos LC, et al. Clinical Follow-Up of Responses to Treatment with Benznidazol in Amazon: A Cohort Study of Acute Chagas Disease. *PLoS One*. 2013;8(5):1–9.
95. Lopes ER, Chapadeiro E, Andrade ZA, Almeida HO, Rocha A. Anatomia patológica de corações chagásicos assintomáticos falecidos de modo violento. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1981;76:189–97.
96. Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold RJ Jr, Hilbert SL FV. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;57:328–36.
97. Dias JCP. THE INDETERMINATE FORM OF HUMAN CHRONIC CHAGAS' DISEASE. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1989;22(3):147–56.
98. Sabino EC, Ribeiro AL, Salemi VMC, Di C, Oliveira L, Antunes AP, et al. Ten-Year Incidence of Chagas Cardiomyopathy Among Asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-Seropositive Former Blood Donors. *Circulation*. 2013;127:1105–15.
99. Rassi A, Rezende JM, Luquetti AO, Rassi Jr. A. American Trypanosomiasis Chagas Disease - Clinical Phases and Forms of Chagas Disease. 2010. p. 710–41.
100. De Oliveira AP, Bernardo CR, Da Silveira Camargo AV, Ronchi LS, Borim AA, De Mattos CCB, et al. Genetic susceptibility to cardiac and digestive clinical forms of chronic chagas disease: Involvement of the CCR5 59029 A/G polymorphism. *PLoS One*. 2015;10(11):1–13.
101. Bestetti RB, Muccillo G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 1997;60(2):187–93.
102. Freitas HFG, Chizzola PR, Paes AT, Lima ACP, Mansur AJ. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: Role of Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*. 2005;102(2):239–47.
103. Barbosa AP, Cardinalli Neto A, Otaviano AP, Rocha BF, Bestetti RB. Comparison of outcome between Chagas cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(6):517–25.
104. Higuchi M de L. Human Chronic Chagasic Cardiopathy: Participation of Parasite

- Antigens, Subsets of Lymphocytes, Cytokines and Microvascular Abnormalities. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(SUPPL. 1):263–7.
105. Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, Rassi GG, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. 2006;355(8):799–808.
 106. Higuchi M de L, Morais CF, Barreto ACP, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The Role of Active Myocarditis in the Development of Heart Failure in Chronic Chagas' Disease : A Study Based on Endomyocardial Biopsies. *Clin Cardiol*. 1987;10:665–70.
 107. Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm*. 2014;2014.
 108. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob K, Teixeira M, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. 2013;34(6):753–70.
 109. Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas.” *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1911;3:193–276.
 110. Tarleton R. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol*. 2003;10:447–51.
 111. Bonney KM, Engman DM. Autoimmune pathogenesis of chagas heart disease: Looking back, looking ahead. *Am J Pathol*. 2015;185(6):1537–47.
 112. Cunha-neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(Suppl. I):252–8.
 113. Ayo CM, Guimar P, Machado M, Dalalio DO. Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors and Their HLA Ligands are Related with the Immunopathology of Chagas Disease. 2015;1–13.
 114. Ramasawmy R, Fae KC, Cunha-neto E, Müller NG, Cavalcanti VL, Ferreira RC, et al. Polymorphisms in the Gene for Lymphotoxin- alpha Predispose to Chronic Chagas Cardiomyopathy. 2007;196.
 115. Torres OA, Calzada JE, Berau Y, Morillo CA, González A, Gonzalez CI, et al. Infection , Genetics and Evolution Role of the IFNG + 874T / A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. 2010;10:682–5.
 116. Layrisse Z, Fernandez MT, Montagnani S, Matos M, Balbas O, Herrera F, et al. HLA-C * 03 Is a Risk Factor for Cardiomyopathy in Chagas Disease. *Hum Immunol*.

- 2000;61:923–9.
117. Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Cardoso MRA, Braga PE, F KC, et al. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas ' disease cardiomyopathy patients. 2006;8:598–603.
 118. Ayo CM, Oliveira AP de, Camargo AV da S, Mattos CCB de, Bestetti RB, Mattos LC de. Association of the Functional MICA-129 Polymorphism With the Severity of Chronic Chagas Heart Disease. *Clin Infect Dis*. 2015;61(8):1310–3.

CAPÍTULO II

HUMAN PLATELET ANTIGEN POLYMORPHISMS: A RISK FACTOR IN THE CHRONIC CHAGAS DISEASE CARDIOMYOPATHY

HUMAN PLATELET ANTIGEN POLYMORPHISMS: A RISK FACTOR IN THE CHRONIC CHAGAS DISEASE CARDIOMYOPATHY

Deborah Elzita do Carmo Corrêa¹ e Ana Maria Sell^{1*}

¹ Post Graduation Program of Bioscience and Physiopathology Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Maringa State University, Maringa, Parana, Brazil.

* anamsell@gmail.com; amsell@uem.br

Abstract

The human platelet antigen (HPA) polymorphisms were considered risk factors in the vascular diseases and the role of genetic factors in development of chronic Chagas disease cardiomyopathy (CCC) is unclear at this moment. Therefore, the aim of this study was to investigate the association of HPA polymorphisms, HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-5 and HPA-15, in severity of left ventricular systolic dysfunction (LVSD) in CCC patients. This study enrolled 221 patients with CCC, separate in three groups according to the severity of LVSD, such as without LVSD, mild/moderate LVSD (M/M) and severe LVSD. Genotype of HPAs was performed by PCR-SSP and the risk was evaluated by SNPstats software. Lower frequency of HPA-1b allele and HPA-1a/1b genotype were in M/M LVSD patients group. After multivariate logistic regression analyses, HPA-1a/1b genotype was more frequent in males with severe LVSD compared to M/M LVSD (OR = 3.46), and HPA-2 a/b and HPA-3 a/b genotypes were more frequent in males with severe LVSD compared to without LVSD (OR = 3.74; OR = 2.90, respectively). In conclusion, polymorphisms in HPA-1, HPA-2 and HPA-3 were associated to severity of left ventricular systolic dysfunction in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy.

Author Summary

Chronic Chagas disease cardiomyopathy (CCC) is the most severe complication of the Chagas disease. Inflammatory infiltrates, persistence of *Trypanosoma cruzi* in myocardial tissue and changes in microcirculation are involved in the pathogenesis of cardiomyopathy. To date, there is no available marker to indicate the progression neither to determinate the severity of heart damage. Platelets have a key role in hemostasis, being responsible for the activation, adherence and platelets aggregation; however, platelet activation triggers a flow of soluble molecules that participate in inflammation, in innate and immune responses, and in

tissue homeostasis. These functions are performed by membrane glycoproteins receptors, which carry the human platelet antigens. The genes encoding them are polymorphic and these polymorphisms are originate from the substitution of one nucleotide pair generating an exchange of amino acid in the protein, and resulting in a change in conformational membrane glycoproteins responsible to change their roles. HPA polymorphisms have been linked to diseases such as myocardial infarction, coronary heart disease, stroke, and carotid atherosclerosis due to type 2 diabetes mellitus, and fibrosis in HCV. In this context, we investigate the association of the polymorphism of HPA-1 to -3, HPA-5 and HPA-15 in the severity of CCC. We found that polymorphisms in the HPA-1, HPA-2 and HPA-3 might be related to a risk factor in the severity of LVSD observed in the setting of CCC. However, HPA-5 and HPA-15 were not associated with CCC development.

INTRODUCTION

Approximately 30% of infected individuals develop chronic Chagas disease cardiomyopathy (CCC), a progressive inflammatory disease resulting from permanent damage to the heart (1,2). It is a major cause of deaths related to cardiovascular disease in endemic areas. Heart failure due to CCC has a poor prognosis with a survival of 50% less when compared to other cardiomyopathies of different etiologies (3–5). In CCC, it is common to find hypertrophy of myocardial fibers and dilatation of the cavities, with the presence of thrombi and microvascular lesions, myocardial fibrosis, and thinning of the ventricular apices particularly in the left ventricle (6,7). Mechanisms underlying differential progression to CCC are not well established, however, the genetic predisposition may play a role in this death (8,9).

Large interests on platelets have been focused in the cardiac and vascular complications and human platelet antigen (HPA) polymorphisms were linked as risk factors in these pathologies (10–14). Platelets play an important role in haemostasis. Currently, it is known that platelets also have roles in both innate and adaptive immune response, by expression of many immunomodulatory molecules (P-selectin, TLR, CD40L) and cytokines (IL-1 β and TGF- β), and interacting with several immune system cells (15–17).

The main functions of platelets are act as ligand–receptor interaction involving many glycoproteins (GP) expressed on their surfaces. Platelet membrane GPs are expressed in polymorphic forms caused by single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes that encode them. The amino acid replacement resulting from these SNPs induce changes in glycoprotein structure (18,19). To date, there are 35 HPAs systems. Twenty-nine antigens are

clustered into six biallelic groups (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5 and HPA-15), such consists of two alleles: a, in higher frequency and b, in lower frequency (20).

The receptor GPIIb/IIIa complex carries two major polymorphic sites, HPA-1 (rs5918; 176T>C; L33P) and HPA-3 (rs5911; 2921T>G; I843S), binding in fibrinogen, vitronectin, fibronectin and von Willebrand factor (vWF) molecules. The GPIIb (integrin α IIb, CD41) and GPIIIa (integrin β IIIa, CD61) are encoded by the genes *ITGA2B* and *ITGB3*, respectively, located on chromosome 17. This heterodimeric complex appears to be the most immunogenic of the platelet glycoproteins, perhaps related to the high density of GPIIb/IIIa on the platelet surface with ~80,000 molecules expressed per platelet (21–24).

The GPIb/V/IX complex is expressed on HPA-2 (rs6065; 482C>T; T145M), binding vWF-mediated platelet adhesion to sites on injured blood vessels. GPIb β is encoded by *GP1BB* on chromosome 22, GPIb α by *GP1BA* on chromosome 17 and GPIX by *GP9* on chromosome 3 (19,25).

The GPIa/IIa complex carrying the HPA-5 polymorphic system (rs10471371; 1600G>A; E505K), is the major collagen receptor on platelets. GPIa is encoded by *ITGA2* on chromosome 5 and GPIIa by *ITGB1* on chromosome 9 (19,26).

CD109 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked protein, encoded by *CD109* on chromosome 6, carried by HPA-15 (rs10455097; 2108C>A; S682Y), binding and negatively regulating signaling of transforming growth factor beta (TGF- β). There are only about 1000 molecules of CD109/platelet, but larger numbers are also expressed on activated T lymphocytes, CD34⁺ hematopoietic cells and endothelial cells. These HPA polymorphisms may affect the functions of these receptors (19,27).

Di Castelnuovo et al. (28), in a meta-analysis study, assessed 34 studies about coronary artery disease, and 6 for restenosis after revascularization and they identified association of HPA-1b allele with overall cardiovascular disease in the general population; however higher risk had been found in the younger cohorts. Another study evaluated the HPA-1 and HPA-3 polymorphism in relation to ischemic stroke, and association with only HPA-3b/3b genotype was found in younger, especially males (29). The polymorphism of HPA-2 also was to consider risk factor of coronary heart disease (13) and arterial thrombotic disease (11). In contrast, many others research lack to found association of HPAs polymorphism with vascular disease (30–35).

In a recent study, the HPA-1, HPA-3 and HPA-5 polymorphisms were evaluated between patients coinfecting with human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C virus (HCV), monoinfected with HCV and uninfected individuals, and association was observed for HPA-

5a/5b genotype with HCV, and HPA-1a/1b genotype and HPA-5b allele with HIV/HCV coinfection (36).

Considering the biological functions of human platelet antigens related to thrombus formation, fibrinolysis, repair and fibrosis, and also with the inflammatory process, we hypothesizes that polymorphism of HPA could be associated with cardiomyopathy in Chagas disease. The aim of this study was to investigate the association of HPA polymorphisms, HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-5 and HPA-15, in severity of left ventricular systolic dysfunction (LVSD) in patients with CCC.

MATERIAL AND METHODS

Subjects study

This study enrolled 221 unrelated chronic Chagas disease cardiomyopathy patients diagnosed in the Cardiomyopathy Clinic of Hospital de Base of Foundation School of Medicine of São José do Rio Preto and from Clinical Hospital of the State University of Londrina. Infection by *T. cruzi* was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA – “Chagas III reagents – GrupoBios, Santiago, Chile) according to manufacturer's instructions, and indirect immunofluorescence when necessary, according WHO recommendations (IFI: IMUNOCRUIZI® antigen - Biolab, Rio de Janeiro, Brazil, and human anti-immunoglobulin G conjugated to fluorescein – Laborclin, Pinhais, Brazil). All patients underwent 12-lead electrocardiogram, 2-dimensional echocardiogram and chest X-rays. Patients were considered to have CCC when presenting electrocardiographic or echocardiographic abnormalities consistent with the disease. The severity of left ventricular systolic dysfunction (LVSD) was graded according to left ventricular ejection fraction (LVEF) values measured with the Teichholz method according to the Brazilian guidelines of severe chronic heart disease (37). Patients were classified into the following three groups according to LVEF: LVEF \geq 60% (patients without LVSD), LVEF $<$ 60% and \geq 40% (mild to moderate - M/M LVSD patients), and LVEF $<$ 40% (patients with severe LVSD). Of a total of subjects with CCC (N=221), 101 (45.7%) were male and 120 (54.3%) female, with mean age of 63.06 ± 10.18 . The patients without LVSD were 51.1% (N=113); mild to moderate LVSD 25.3% (M/M; N=56); and severe LVSD 23.5% (N=52). The characteristics of the patients are shown in table 1. The groups were matched by age and gender, except for severe LVSD whose male was more frequent when compared with without LVSD.

The Human Research Ethics Committee of the Maringa State University (COPEP-UEM # 012/2010) and Medicine School of Sao Jose do Rio Preto (FAMERP #009/2011) approved

this study. The objectives, laboratory procedures, and all details of the study were explained to the patients, and those who agreed to participate signed an informed consent form. Investigations were conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

Table 1. Characteristics of chronic Chagas disease cardiomyopathy patients

	Severe LVSD N = 52	Mild/Moderate LVSD N = 56	Without LVSD N = 113
Mean age (years) ^a	62.37±10.740	63.23±10.486	63.58±9.308
Gender N (%) ^b			
Male	30 (57.7)*	25 (44.6)	46 (40.7)*
Female	22 (42.3)*	31 (55.4)	67 (59.3)*

LVSD: left ventricular systolic dysfunction.

^a Between-group comparison by Student *t* test

^b Between-group comparison by χ^2 test

* Severe versus Without LVSD, *p*<0.05

Genotyping

A total of 5 mL of peripheral blood was collected from each patient in tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Genomic DNA was extracted by PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), according to the manufacturer's instruction. The concentration and purity of DNA were verified using NanoDrop 2000 equipment (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

The method used for genotyping of HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-5 and HPA-15 was PCR-SSP (sequence-specific primer) (27,38). For allele's amplification, were used two specific primers that differ in one nucleotide at the 3' end corresponding to the sequence of genomic DNA encoding each of the alleles. The combination of each specific primer with the common primer complementary enabled amplification of all alleles (Table 2). All reactions contained an internal control that amplified a known fragment of 434 bp of the human growth hormone gene (HGH). Each reaction had a final volume of 12.5 μ L containing 1.5 μ M of sense and antisense specific primers for each allele, 1.0 μ M of each HGH primers, 10x buffer, 1.0 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY) and 50 ng/ μ L of DNA. The samples were amplified in a System 9700 thermocycler (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). The HPA-1 cycling conditions used to HPA-1 were: 32 cycles 94°C for 5 min, 65°C for 50s, 95°C for 40s, 72°C for 40s, 72°C for 7 min. The cycle was similar for the others HPAs, expect melting temperature 63°C (HPA-2) 62°C (HPA-3 e -5) 61°C (HPA-15). Analysis of PCR products was performed after 2% agarose gel electrophoresis, stained with SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY).

Table 2. Specific primers for HPA-1 to 5 and HPA-15 genotyping

HPA	Sequences of primers specific (5'-3')	Sequence of primer common (5'-3')	SNP	Size of the fragment (pb)
1a	TCTTACAGGCCCTGCCTCT	AGCCGGAGTGCAATCCTCTG	176T	196
1b	TCTTACAGGCCCTGCCTCC		176C	196
2a	CCCCCAGGGCTCCTGAC	GCAGCCAGCGACGAAAATA	482C	244
2b	CCCCCAGGGCTCCTGAT		482T	244
3a	GGGGGAGGGGCTGGGGA	GGCCCTGGGACTGTGAATG	2621T	293
3b	GGGGGAGGGGCTGGGGC		2621G	293
5a	AGTCTACCTGTTTACTATCAAAG	CTCTCATGGAAAATGGCAGTAC	1600G	250
5b	AGTCTACCTGTTTACTATCAAAA		1600A	250
15a	TTCAAATTCTTGGTAAATCCTGG	ATGACCTTATGATGACCTATTC	2108C	225
15b	TTCAAATTCTTGGTAAATCCTGT		2108A	225

Fonte: HPA-1 to HPA-3 and HPA-5 Lyou et al.(38) and HPA-15 Schuh et al. (27)

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using the OpenEpi (39) and SNPStats (40) software. Student *t*-test was used to compare differences between groups. The association was evaluated using the chi squared with Yates correction and logistic regression, and the correlation was deemed present by an odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI) only for significant *p*-values ($p < 0.05$). Logistic regression analysis included the age and gender covariates. The association tests were realized to the codominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive genetic inheritance models. The haplotype analysis of HPAs was evaluated using Expectation Maximization algorithm (EM algorithm). Genotype distribution was evaluated to Hardy-Weinberg balance (41).

RESULTS

The ratio distributions of genotype and allele frequency for all analyzed HPA genes were in Hardy-Weinberg equilibrium.

The HPA allele and genotype frequencies distribution in CCC patients without LVSD, M/M LVSD and severe LVSD are shown in table 3. The HPA-1b allele and 1a/1b genotype frequencies were lower in M/M LVSD patients when compared to severe or without LVSD. The significance was observed in different models of genetic inheritance: log-additive (OR = 0.41; 95%CI = 0.19-0.95) and dominant (OR = 0.43; 95%CI = 0.19-0.97). The best inheritance model according Akaike information criteria (AIC) was log-additive and that means that each copy of the “b” modifies the risk in additive form, and the homozygous b/b have double risk than heterozygous a/b. HPA-2, HPA-3, HPA-5 and HPA-15 allele and genotype frequencies distribution was similar in all analyzed groups.

Table 3. Allele and genotype frequencies for HPAs in chronic chagasic cardiomyopathy patients (N=221).

	Severe LVSD N = 52 n (%)	Mild/Moderate LVSD N = 56 n (%)	Without LVSD N = 113 n (%)	P-value	
Alleles					
1a	88 (84.6)	103 (92.0)	190 (84.1)	0.020*	
1b	16 (15.4)	9 (8.0)	36 (15.9)		
2a	93 (89.4)	105 (93.8)	204 (90.3)		
2b	11 (10.6)	7 (6.2)	22 (9.7)		
3a	57 (54.8)	60 (56.6)	111 (50.9)		
3b	47 (45.2)	46 (43.4)	107 (49.1)		
5a	97 (93.3)	99 (88.4)	209 (92.5)		
5b	7 (6.7)	13 (11.2)	17 (7.5)		
15a	52 (50.0)	63 (56.3)	110 (48.7)		
15b	52 (50.0)	49 (43.8)	116 (51.3)		
Genotypes					
1a/1a	36 (69.2)	47 (83.9)	78 (69.0)		0.028*
1a/1b	16 (30.8)	9 (16.1)	34 (30.1)		
1b/1b	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.9)		
2a/2a	41 (78.8)	49 (87.5)	93 (82.3)		
2a/2b	11 (21.2)	7 (12.5)	18 (15.9)		
2b/2b	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.8)		
3a/3a	15 (28.9)	13 (24.5)	23 (21.1)		
3a/3b	27 (51.9)	34 (64.2)	65 (59.6)		
3b/3b	10 (19.2)	6 (11.3)	21 (19.3)		
5a/5a	45 (86.5)	45 (80.4)	96 (85.0)		
5a/5b	7 (13.5)	9 (16.1)	17 (15.0)		
5b/5b	0 (0.0)	2 (3.5)	0 (0.0)		
15a/15b	11 (21.2)	17 (30.3)	30 (26.5)		
15a/15b	30 (57.6)	29 (51.8)	56 (49.6)		
15b/15b	11 (21.2)	10 (17.9)	27 (23.9)		

LVSD: left ventricular systolic dysfunction.

* Significant difference between mild to moderate *versus* without LVSD and *versus* severe LVSD

After multivariate logistic regression analysis in regard age and gender covariables, HPA-1a/1b genotype was found more frequent in males with severe LVSD compared to M/M LVSD (OR = 3.9, 95%CI= 1.03-11.82); HPA-2 a/b and HPA-3 a/b genotypes were more frequent in males with severe LVSD compared to without LVSD (OR = 3.74, 95%CI = 1.01-13.82; OR = 2.90, 95%CI = 1.15-7.36, respectively) (Table 4).

Table 4. Multivariate regression logistic of HPA risk factors associated to Chagas cardiomyopathy severity in male patients.

	OR	CI (95%)
HPA-1a/1b genotype		
Severe LVSD versus M/M LVSD	3.49	1.03-11.82
HPA-2a/2b genotype		
Severe LVSD versus Without LVSD	3.74	1.01-13.82
HPA-3a/3b genotype		
Severe LVSD versus Without LVSD	2.90	1.15-7.36

LVSD: left ventricular systolic dysfunction. Only significant results are showed, stratified according gender and age.

In general, the HPA-1a/1b, 2a/2b and 3a/3b genotypes seem to be a risk factor for severe LVSD in male patients. Meanwhile HPA-5 and HPA-15 was not associated with CCC development.

There were not significant differences about HPA haplotype frequencies among CCC groups.

DISCUSSION

One third of patients with CCC develop a lethal form of dilated cardiomyopathy (severe CCC) with ventricular dysfunction, heart failure, arrhythmia, fibrotic lesions, and thromboembolic events (3,7,42). HPA polymorphisms were associated to coronary thrombosis, severe coronary artery disease, myocardial infarction, and are determinants for the onset of thrombotic microangiopathies (29,43–45), and type 2 diabetes complications by carotid atherosclerosis (46). These polymorphisms also has been studied in hepatic fibrosis in patients infected with HCV (47) and HCV/HIV coinfection (36,48). Most research had been sought to investigate the hypothesis that these genetic changes in GP platelets may alter the surface expression of these membrane glycoproteins and thus activating and leading modifications in the hemostatic process. In this context, we define the hypothesis that HPA polymorphisms may be correlated to CCC pathogenesis. To our knowledge, this is the first study to address the association of HPA polymorphisms with severity of the CCC.

In our study, the HPA-1b allele and HPA-1a/1b genotype were in lower frequency in the M/M LVSD patients compared to severe or without LVSD, indicating protection to development of this cardiac form. After multivariable analyses, this same genotype, HPA-1a/1b, plus HPA-2a/2b and HPA-3a/3b were associated to risk for severe form of chronic Chagas cardiomyopathy in male patients.

The first research relating HPA polymorphism with cardiac disease was reported by Weiss et al. (10), in a case-control study, identifying association between HPA-1b allele and acute coronary thrombosis, being more prominent in patients who had coronary events before the age of 60 years. Similarly, HPA-1b/1b and HPA-3b/3b genotype were related to myocardial infarction (14,45) and ischemic stroke (29) in younger men. The HPA-2 polymorphism was also associated to risk of coronary heart disease (11,13). In contrast, other studies found no association in polymorphism of HPA-1 to 6 in relation to myocardial infarction (35) and stroke (34), even in younger men (30,31). Among them, a large prospective study should be highlighted: 14,916 initially healthy men participating were followed prospectively for 8.6 yearst and three hundred seventy-four men had the first myocardial infarction, 209 had stroke,

and 121 had venous thrombosis during follow-up. They concluded that HPA-1 polymorphism was not associated with risk of myocardial infarction, stroke, or venous thrombosis (33). In our study, the small number of patients with CCC younger than age 60 years does not allow us to draw conclusions concerning the relation between the age of CCC onset and HPA polymorphisms.

On the other hand, Silva et al. (49) evaluated frequencies of HPA-1, HPA-3 and HPA-5 in degree of liver fibrosis in 143 HCV-infected patients. They identified that HPA-1a/1b genotype promotes the development of liver fibrosis in HCV infection. In CCC is common to find hypertrophy of myocardial fibers and dilation of the cavities with the presence of thrombi and fibrosis (6,7), thus the association of HPA polymorphism with fibrosis development corroborates with those found in our study relating to ab genotype and severe LVSD.

The exact mechanism involved in association of HPA polymorphisms with pathologies variables is not yet clear. However, a possible explanation for the HPA association with severity of CCC is that the GPIIb/IIIa and GPIb/V/IX complex are platelets receptors important in aggregation and adhesion, respectively. The polymorphism of these antigens would result in a conformational change in the receptors modifying the binding with its specific molecules (as fibrinogen and von Willebrand factor) altering the thrombus formation, and likewise fibrosis formation. In this context, Feng et al. (50) evaluated HPA-1 genotypes regarding platelet reactivity and reported that HPA-1 polymorphism was associated with platelet reactivity *in vitro*. In another research, the structure of the GPIIb/IIIa receptor in HPA-1b was available and the polymorphism altered the platelet receptor which become more flexible, favoring the adhesion to the fibrinogen (51). However, others studies failed to found association between GP polymorphism and platelet functions (52,53). Furthermore, Ulrichtis et al. (54) demonstrated, contrary to what had been stated, that the absence of polymorphism in GPIIa favored the interaction of HPA-2a with von Willebrand factor.

A possible explication for our findings could be correlated to the biologic function of platelets in the inflammatory process and tissue repair. The HPA polymorphism modifies the structure of the GPIIb/IIIa receptor in HPA favoring the adhesion to the fibrinogen. Initially this adhesion and platelet aggregation could contribute to favorable inflammatory response and less heart cells degeneration. However, the progressive accumulation of interstitial collagen may contribute to progressive impairment of the contractile performance of the myocardium, and abnormalities of microcirculation contributes to persistent necrosis and myofibrosis. Fibrosis is one of the most prominent features in Chagas heart whose alterations in the expression of integrins have been associated. The integrins regulating the activation of

transforming growth factor beta (TGF- β) and dysfunction in the regulation of TGF- β signaling have been implicate in fibrosis and heart disease progression (55,56). Severe fibrosis of hepatic cells in chronic Hepatitis C patients was also correlated to HPA-1a/1b genotype (49).

We found a higher prevalence of severe LVSD in male patients compared to without LVSD and yet HPA polymorphisms were risk factor for severe CCC in male. Male gender was included as one of risk factor of death (between others) in patients with Chagas' heart disease in a model developed by Rossi et al. (57). In general there are a higher prevalence of cardiac diseases in male, especially when compared to female in premenopausal (58–60). In order to relating HPA polymorphisms with biological functions and gender, Boudoulas et al. (61) identified that the estrogen at physiological concentrations in the presence of the HPA-1a/1b genotype results in an inhibition of platelet aggregation; this same level of estrogen in the presence of HPA-1a/1a requires about 1000-fold higher concentration of estrogen to the inhibition. In our study, the female patients no longer suffer the influence of the estrogen in function of her age and being in menopause; so this fact does not constitute a bias in our results. In menopause, the prevalence of heart problems between male and female are almost equal (62,63).

The cardiomyopathy in Chagas disease is a multistep disease, the input of each gene involved in the development of CCC is expected to be very small (1-10% of the susceptibility). However, identification of key genes and potent genetic combinations coupled with environmental factors may lead to the identification of *T. cruzi*-infected individuals that will progress to CCC. The evaluation of the role of HPAs polymorphic variants as risk factors for CCC requires additional studies involving larger numbers of subjects and methods that can verify how this polymorphism may modulate platelet function.

CONCLUSION

In conclusion, human platelet antigens polymorphisms were associated to severity of left ventricular systolic dysfunction in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy.

Acknowledgment

The Biosciences and Physiopathology Program; technicians, students, and teachers of Immunogenetics Laboratory - LIG-UEM. The financial support of CAPES, CNPq, Fundação

Araucária do estado do Paraná and São Paulo Research Foundation (FAPESP) [#2013/06580-9, #2011/08075-4].

REFERENCES

1. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med*. 2015;373:456–66.
2. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob K, Teixeira M, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. 2013;34(6):753–70.
3. Bestetti RB, Muccillo G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 1997;60(2):187–93.
4. Freitas HFG, Chizzola PR, Paes AT, Lima ACP, Mansur AJ. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: Role of Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*. 2005;102(2):239–47.
5. Barbosa AP, Cardinalli Neto A, Otaviano AP, Rocha BF, Bestetti RB. Comparison of outcome between Chagas cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(6):517–25.
6. Higuchi M de L. Human Chronic Chagasic Cardiopathy: Participation of Parasite Antigens, Subsets of Lymphocytes, Cytokines and Microvascular Abnormalities. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(SUPPL. 1):263–7.
7. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl(August):113–22.
8. Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm*. 2014;2014.
9. Ayo CM, Dalalio MMDO, Visentainer JEL, Reis PG, Sippert EÂ, Jarduli LR, et al. Genetic Susceptibility to Chagas disease: An overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
10. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman S, Kickler TS, Becker L, et al. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med*. 1996;334:1090–4.
11. Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Corral J, Iniesta JA, Moraleda JM, et al. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease. *Blood*. 1998;92(8):2771–6.
12. Goldschmidt-Clermont PJ, Cooke GE, Eaton GM, Binkley PF. P1(A2), a variant of GPIIIa implicated in coronary thromboembolic complications. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36(1):90–3.
13. Zhang J, Zhao L, Lv P, Liu G, Du W, Yang F, et al. Association between polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Iba and risk of coronary heart disease in Han Chinese, Henan, China. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):6005–11.
14. Park S, Park HY, Park C, Ko YG, Im EK, Jo I, et al. Association of the gene polymorphisms of platelet glycoprotein Ia and Iib/IIIa with myocardial infarction and extent of coronary artery disease in the Korean population. *Vol. 45, Yonsei Medical Journal*. 2004. p. 428–34.
15. Garraud O, Cognasse F. Are platelets cells? And if yes, are they immune cells? *Front Immunol*. 2015;6(FEB):1–8.
16. Dewitte A, Tanga A, Villeneuve J, Lepreux S, Ouattara A, Desmoulière A, et al. New frontiers for platelet CD154. *Exp Hematol Oncol*. 2015;4:6.
17. Collier BS. Historical Perspective and Future Directions in Platelet Research. *J Thromb*

- Haemost. 2011;9(Suppl 1):374–95.
18. Santoso S. Human platelet alloantigens. *Transfus Apher Sci.* 2003;28(3):227–36.
 19. Curtis BR, Mcfarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang.* 2014;106(2):93–102.
 20. Immuno Polymorphism Database [Internet]. 2016 [cited 2016 Oct 1]. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/>
 21. Newman PJ, Goraki J, White G, Gidwitz S, Cretney C, Aster R. Enzymatic Amplification of Platelet-specific Messenger RNA Using the Polymerase Chain Reaction. *J Clin Invest.* 1988;81(3):932–8.
 22. Lyman S, Aster RH, Visentin GP, Newman PJ. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Baka/Bakb alloantigen system. *Blood* [Internet]. 1990;75(12):2343–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2350579>
 23. Peterson JA, Gitter ML, Kanack A, Curtis B, Mcfarland J, Aster R. New low-frequency platelet glycoprotein polymorphisms associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia Julie. *Transfusion.* 2010;50(2):324–33.
 24. Peterson J, McFarland J. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. *Br J Haematol.* 2013;161(1):3–14.
 25. Kuijpers R, Faber N, Cuypers Ht, Ouwehand W, von dem Borne Aegk. NH2-Terminal Globular Domain of Human Platelet Glycoprotein Iba1 Has a Methionine145/Threonine145 Amino Acid Polymorphism, Which Is Associated with the HPA-2 (Ko) Alloantigens R. *J Clin Invest.* 1992;89(February):381–4.
 26. Santoso S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Mueller-eckhardt C, Newman PJ. The Human Platelet Alloantigens Bra and Brb Are Associated with a Single Amino of 1251-radio-labeled platelet proteins. *J Clin Invest.* 1993;92(November):2427–32.
 27. Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, Harmer NJ, Lin M, Prosper JYA, et al. A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood.* 2002;99(5):1692–8.
 28. Di Castelnuovo A, de Gaetano G, Donati M, Iacoviello L. Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism PLA1/PLA2 and coronary risk: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2001;85(4):626–33.
 29. Duan H, Cai Y, Sun X, Dan H, Cai Y, Sun X, et al. Platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism HPA-3 b/b is associated with increased risk of ischemic stroke in patients under 60 years of age. *Med Sci Monit.* 2012;18(1):CR19-CR24.
 30. Candore G, Piazza G, Crivello A, Grimalde MP, Orlando V, CARUSO M, et al. Association between Platelet Glycoprotein Ib- and Myocardial Infarction: Results of a Pilot Study Performed in Male and Female Patients from Sicily. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1089(1):502–8.
 31. Rosenberg N, Zivelin A, Chetrit A, Dardik R, Kornbrot N, Freimark D, et al. Effects of platelet membrane glycoprotein polymorphisms on the risk of myocardial infarction in young males. *Isr Med Assoc J.* 2002;4(6):411–4.
 32. Ishida F, Ito T, Takei M, Shimodaira S, Kitano K, Kiyosawa K. Genetic linkage of Kozak sequence polymorphism of the platelet glycoprotein Ib platelet antigen-2 and variable number of tandem repeats polymorphism and its relationship to coronary artery disease. *Br J Haematol.* 2001;111:1247–9.
 33. Ridker P, Hennekens C, Schmitz C, Stampfer M, Lindpainter K. P1A1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet.* 1997;349(9049):385–8.
 34. Carlsson LE, Greinacher A, Spitzer C, Walther R, Kessler C. Polymorphisms of the Human Platelet Antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-5 on the Platelet Receptors

- for Fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrand Factor (GPIb/IX), and Collagen (GPIa/IIa) Are Not Correlated With an Increased Risk for Stroke. *Stroke*. 1997;28:1392–5.
35. Hato T, Minamoto Y, Fukuyama T, Fujita S. Polymorphisms of HPA-1 Through 6 on Platelet Membrane Glycoprotein Receptors Are Not a Genetic Risk Factor for Myocardial Infarction in the Japanese Population. *Excerpta Medica, Inc.* 1997;1222–3.
 36. Grotto R, Picelli N, Souza L, Silva G, Ferrasi A, Silveira L, et al. Human Platelet Polymorphism can be a Genetic Marker Associated With HIV/HCV Coinfection. *J Med Virol*. 2015;87:1677–81.
 37. Dutra OP, Besser HW, Tridapalli H, Luiz T, Leiria L, Afi MA, et al. II Diretriz Brasileira De Cardiopatia Grave. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87(2):223–32.
 38. Lyou J-Y, Chen Y-J, Hu H-Y, Lin J-S, Tzeng C-H. PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to -13w. *Transfusion*. 2002;42(8):1089–95.
 39. Dean A, Sullivan K, Soe M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versão. [Internet]. 2013. Available from: www.OpenEpi.com
 40. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñesta R, Moreno V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928–9.
 41. Guo S, Thompson E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 1992;2(48):361–72.
 42. Ayo CM, Oliveira AP de, Camargo AV da S, Mattos CCB de, Bestetti RB, Mattos LC de. Association of the Functional MICA-129 Polymorphism With the Severity of Chronic Chagas Heart Disease. *Clin Infect Dis*. 2015;61(8):1310–3.
 43. Abboud N, Ghazouani L, Ben-Hadj-khalifa S, Anabi F, Added F, Khalfallah A, et al. Human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, and HPA-3 polymorphisms associated with extent of severe coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2010;29(4):409–15.
 44. Furihata K, Nugent DJ, Kunicki TJ. Influence of platelet collagen receptor polymorphisms on risk for arterial thrombosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(3):305–9.
 45. Bojesen S, Juul K, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard B. Platelet Glycoprotein IIb / IIIa Pl A2 / Pl A2 Homozygosity Associated With Risk of Ischemic Cardiovascular Disease and Myocardial Infarction in Young Men The Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(4):661–7.
 46. Zhang YH, Xu SF, Zheng J, Hong HS, Fan LM. Correlation between polymorphism of platelet alloantigen genes HPA-1-5 and type 2 diabetes complication by carotid atherosclerosis in a Chinese population. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):4607–15.
 47. Verdichio-Moraes C, Toralles-Pereira C, Grotto R, Silva G, Pardini M. Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in patients infected with hepatitis C virus. *J Med Virol*. 2009;81(4):757–9.
 48. Picelli N, Tanikawa AA, Maria R, Grotto T, Silva GF, Barbosa AN, et al. Major Article The absence of the human platelet antigen polymorphism effect on fibrosis progression in human immunodeficiency virus-1 / hepatitis C virus coinfecting patients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(4):406–9.
 49. Silva G, Grotto R, Verdichio-Moraes C, Corvino S, Ferrasi A, Silveira L, et al. Human platelet antigen genotype is associated with progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 2012;84(1):56–60.
 50. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, O'Donnell CJ, Lipinska I, Sutherland PA, et al. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PIA2 polymorphism. *Arter Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1142–7.
 51. Jallu V, Poulain P, Fuchs PFJ, Kaplan C, Brevern AG De. Modeling and Molecular

- Dynamics of HPA-1a and -1b Polymorphisms : Effects on the Structure of the beta3 Subunit of the alphaIIb beta3 Integrin. *PLoS One*. 2012;7(11):1–10.
52. Aleksic N, Juneja H, Folsom A, Ahn C, Boerwinkle E, Chambless L, et al. Platelet PIA2 Allele and Incidence of Coronary Heart Disease Results From the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 2000;102:1901–5.
 53. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, O'Donnell CJ, Lipinska I, Sutherland PA, et al. Platelet Glycoprotein IIIa PIA Polymorphism, Fibrinogen, and Platelet Aggregability. *Circulation*. 2001;104:140–4.
 54. Ulrichs H. Von Willebrand Factor But Not -Thrombin Binding to Platelet Glycoprotein Ib Is Influenced by the HPA-2 Polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(7):1302–7.
 55. de Oliveira FL, Araújo-Jorge TC, de Souza EM, de Oliveira GM, Degraive WM, Feige JJ, et al. Oral administration of gw788388, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, prevents heart fibrosis in chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6).
 56. Ferreira R, de Souza E, de Oliveira F, Ferrão P, Gomes L, Mendonça-Lima L, et al. Proteins involved on TGF- β pathway are up-regulated during the acute phase of experimental Chagas disease. *Immunobiology*. 2016;221(5):587–94.
 57. Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, Rassi GG, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. 2006;355(8):799–808.
 58. Stähli BE, Gebhard C, Yonekawa K, Gebhard CE, Altwegg LA, Von Eckardstein A, et al. Gender-Related Differences in Patients Presenting with Suspected Acute Coronary Syndromes: Clinical Presentation, Biomarkers and Diagnosis. *Cardiol*. 2015;132(3):189–98.
 59. Onat A, Karadeniz Y, Tusun E, Yüksel H, Kaya A. Advances in understanding gender difference in cardiometabolic disease risk. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2016;14(4):513–23.
 60. Wells GL. Cardiovascular Risk Factors : Does Sex Matter? *Curr Vasc Pharmacol*. 2016;14:1–6.
 61. Boudoulas KD, Cooke GE, Roos CM, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ. The PIA polymorphism of glycoprotein IIIa functions as a modifier for the effect of estrogen on platelet aggregation. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125(1):112–5.
 62. Merz A, Susan C. Sex differences in cardiovascular ageing. *Heart*. 2016;102(11):825–31.
 63. Gori M, Lam CSP, Gupta DK, Santos ABS, Cheng S, Shah AM, et al. Sex-specific cardiovascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction Methods and results. *Eur J Heart Fail*. 2014;16:535–42.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

O polimorfismo dos antígenos plaquetários humanos, HPA-1, HPA-2 e HPA-3 foram associados a possíveis fatores de risco à gravidade da cardiomiopatia chagásica em indivíduos do gênero masculino.

O genótipo HPA-1a/1b e o alelo HPA-1b foram menos frequentes no grupo de indivíduos com a disfunção sistólica ventricular esquerda de leve a moderado.

O polimorfismo do HPA-5 e HPA-15 não foram associados ao desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os estudos envolvendo o polimorfismo dos antígenos plaquetários humanos como um fator de susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento de determinadas doenças ainda são recentes e portanto divergentes. Desta forma mais estudos devem ser feitos no intuito da elucidação da ação destes polimorfismos nas diversas patologias, dentre elas a doença de Chagas.

Outro ponto importante é o fato das frequências dos HPAs variarem de acordo com o grupo étnico e geográfico, assim sendo estudos em diferentes etnias com a utilização de marcadores genéticos das mesmas é de suma importância.

Do mesmo modo, um número maior de amostras de pacientes, de preferência, de diversas partes do Brasil, seria interessante na busca de um polimorfismo genético que possa ser utilizado no futuro como um marcador de susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento da forma grave da cardiomiopatia chagásica.

Além dos estudos dos polimorfismos genéticos faz-se necessários estudos que possam avaliar de fato a ação destes polimorfismos nas funções dos seus receptores específicos mensurando, por exemplo, seus ligantes específicos como fibrinogênio ou fator von Willebrand.

Este tipo de estudo é de suma importância tanto do ponto de vista de encontrar um possível marcador genético para o desenvolvimento da forma grave da cardiomiopatia chagásica e então tentar produzir fármacos que ajam nesta via impedindo a progressão da doença, como para tentar elucidar os mecanismos imunopatológicos envolvidos nesta patologia.

