



Universidade de Brasília

Faculdade de Ceilândia

Desenvolvimento e padronização de métodos para detecção de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí (*Euterpe oleracea*)

Anderson Rodrigues Araujo Vieira

Brasília

2015



Universidade de Brasília

Faculdade de Ceilândia

Desenvolvimento e padronização de métodos para detecção de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí (*Euterpe oleracea*)

Anderson Rodrigues Araujo Vieira

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Beatriz Dolabela de Lima

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Brasília

2015

Desenvolvimento e padronização de métodos para detecção de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí (*Euterpe oleracea*)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Anderson Rodrigues Araujo Vieira

Dissertação aprovada em: ____/____/____.

Comissão julgadora:

1º Mem. (presidente): _____

Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins (UnB)

2º Membro: _____

Prof.^a Dr^a. Tatiana Amabile de Campos (UnB)

3º Membro: _____

Pesq. Col. Dr. Ricardo Camargo (UnB-SES/DF)

4º Membro (suplente): _____

Prof.^a Dr^a. Flávia Nader Motta. UnB – FCE

Dedico esse trabalho à minha família, aos meus amigos e a todos que de alguma forma contribuíram para a sua realização.

Agradecimentos

Ao professor Vicente, meu orientador, pelos ensinamentos e experiências que foram de um valor inestimável para o desenvolvimento desse trabalho; pela parceria estabelecida ao longo desses dois anos; pela confiança em mim depositada, além da grande amizade.

À professora Beatriz (Bia), minha grande coorientadora, pelas pertinentes contribuições para o andamento dessa pesquisa; pela paciência e incentivo à constante busca do aprender.

À professora Tatiana Amabile pela contribuição essencial na construção da metodologia dessa dissertação.

Aos membros do laboratório de biologia do gene – LaBioGene: Ricardo Camargo, pela ajuda humildemente dada em momento crucial desse trabalho; Agenor Castro, pela apresentação às técnicas laboratoriais fundamentais para o início dessa pesquisa; Agnelo Rodrigues, Daniel Graziani e Marco Aurélio, pela amizade e pela troca de experiência e à Marinez Viana pelo suporte técnico.

Aos membros do laboratório de análises moleculares de patógenos – LAMP: Lucas Melo, Laura Fernandes, Luis Janssen, entre outros, pela amizade e por momentos de descontração.

À secretária da pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde, Núbia Carvalho, por ser sempre solícita às necessidades dos pós-graduandos.

Aos meus pais, Adão e Teresinha, pelo encorajamento e incentivo ao prosseguimento na vida acadêmica.

Às minhas irmãs, Alessandra, Talita, Iorrana e Rayslaine, pela ajuda, companheirismo e força inestimável, ao longo desses anos.

Ao meu filho, Ravi Henry, pelos momentos de alegria e descontração que foram o combustível ao longo desses meses áridos de pesquisa.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar nenhum.”

(Frank Clark)

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
1.1-Doença de Chagas.....	1
1.2- <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.3- Vetores e hospedeiros.....	4
1.4- Formas de transmissão e sintomatologia.....	6
1.5- Diagnóstico.....	9
1.6- Açai: transmissão da DC por via oral.....	10
1.7- Desafios para a prevenção e controle da transmissão da DC por via oral	13
2-OBJETIVO GERAL.....	15
2.1-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3-MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1-Material	16
3.1.2-Meios	16
3.1.3-Soluções	17
3.2.1-Delineamento experimental	18
3.4-Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).....	20
3.5- Extrações de DNA genômico.....	23
3.6- Teste de avaliação preliminar de formas para lise das células de <i>T.cruzi</i> e de interferentes presentes em polpa de Açai (<i>Euterpe oleracea</i>).....	24
4-RESULTADOS	29
4.3-Teste de sensibilidade dos primers TCZ e rDNA 28sa.....	33
4.5-Padronização de método para isolamento e concentração de células de <i>T. cruzi</i> em polpa de açai.....	36
4.6-Teste final dos protocolos de isolamento e identificação de <i>T. cruzi</i> em polpa de açai	37
4.7-PCR em tempo Real	38
6-CONCLUSÕES E PESPECTIVAS.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados para a amplificação do DNA de *T.cruzi* e açai.....20

Tabela 2: Primers utilizados para a amplificação do DNA dos experimentos em qPCR28

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Fotografia de Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas.....	2
Figura 2: Estimativa do número de infectados no mundo e rotas migratórias que contribuíram para a disseminação da doença de Chagas a partir da América Latina.....	2
Figura 3: Esquema mostrando as estruturas morfológicas dos estágios evolutivos do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 4: Estágios do ciclo de vida evolutivos dos gêneros <i>Triatoma</i>	5
Figura 5: Exemplos de habitações que favorecem a infestação por Triatomíneos	5
Figura 6: Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro invertebrado e no homem.....	6
Figura 7: Sintomatologia da Doença de Chagas.....	7
Figura 8: Fontes prováveis de contaminação por via oral da Doença de Chagas.....	8
Figura 9: Açaizeiro (<i>Euterpe oleracea</i>) (Fonte: http://plantasfrutiferas.blogspot.com.br).....	12
Figura 10: Ilustração dos processos de colheita, transporte, comercialização e consumo do açaí na região Amazônica	12
Figura 11: Fluxograma ilustrando o delineamento experimental seguido durante a realização do presente trabalho.	18
Figura 12: Bloco de aquecimento a seco utilizado na lise das células por temperatura.	25
Figura 13: Etapas do Método de flutuação em Sulfato de Zinco.....	27
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose (2% em SB) do produto da amplificação por PCR para avaliar a especificidade dos primers	30

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose (2% em SB) do produto da amplificação da padronização dos primers para genes de açaí e do teste da reação cruzada.....	32
Figura 16: Teste de sensibilidade dos primers TCZ e rDNA 28S α	33
Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 2% dos testes de detecção do DNA de <i>T. cruzi</i> em polpa de açaí.	36
Figura 18: Detecção de <i>T. cruzi</i> por PCR após isolamento pelo Método de flutuação em Sulfato de Zinco.....	37
Figura 19: Eletroforese da avaliação dos conjuntos de Primers validados (TCZ, PR açaí 1, rDNA 28S α) na detecção de <i>T. cruzi</i> em Açaí.....	38
Figura 20: Curva da quantificação da PCR em tempo real das diluições seriadas de DNA de <i>T. cruzi</i> com primers rDNA 28S α	39
Figura 21: Curva de dissociação da diluição seriada utilizando os primers rDNA28S α	40
Figura 22: Avaliação das reações cruzadas para os rDNA 28S α e primers PR açaí1.	41
Figura 23: Curvas de dissociação para avaliar as reações cruzadas dos primers rDNA 28S α	41
Figura 24: Curvas de quantificação de DNA de <i>T. cruzi</i> em amostras de açaí.....	42
Figura 25: Curva de dissociação da reação de detecção de <i>T. cruzi</i> inoculados em Açaí... ..	43
Figura 26: Esquema ilustrando a aplicabilidade do método e as perspectivas que serão tomadas para a continuidade deste estudo.	47

RELAÇÃO DE SIGLAS

BSA- Albumina de Soro Bovino (*Bovine serum albumin*)

CTAB- Brometo de Cetrimônio (Cetyl trimethylammonium bromide)

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DC- Doença de Chagas

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EDTA- Ácido EtilenoDiaminoTetraAcético

LIT- Liver Infusion Tryptose

OMS-Organização Mundial de Saúde

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PBS- Tampão salino Fosfato

qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

RNA- Ácido Ribonucleico

rDNA- Sequência de DNA que codifica para o RNA ribossomal

SB- Ácido Bórico e sódio

TBE- Tris, ácido Bórico, EDTA

TCZ- Segmentos da sequência repetitiva do DNA nuclear em *Trypanosoma cruzi*

RESUMO

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas (DC) é uma doença que afeta principalmente a população pobre de países latino americanos. Estima-se que 7-8 milhões de pessoas estão infectadas com *Trypanosoma cruzi* na América Latina, sendo que cerca de 2 a 3 milhões de pessoas são portadoras da forma crônica no Brasil. Apesar da realização do controle da transmissão vetorial da DC em regiões endêmicas, formas alternativas de transmissão tornaram-se evidentes como a transmissão oral. A transmissão oral ocorre principalmente pela ingestão acidental de triatomíneos infectados ou de alimentos contaminados com dejetos desses triatomíneos ou secreções de animais silvestres infectados com *T. cruzi*. O suco do açaí produzido artesanalmente é tido hoje como o principal responsável por surtos da DC no Norte do Brasil, pequenos surtos da DC já foram registrados após grupo de pessoas ingerirem a bebida contaminada com *T. cruzi* nos estados do Amapá, Amazonas e Pará. O objetivo desse trabalho é desenvolver e validar uma metodologia para detectar contaminação por *T. cruzi* em pasta e bebida de açaí (*Euterpe oleracea*). Para isto, 10 mL de polpa de açaí foram inoculados com 10^7 células de formas epimastigotas ou tripomastigotas de *T. cruzi*, que foram posteriormente isoladas por flutuação em sulfato de zinco, seguido de extração de DNA e análise por PCR. Para a detecção, foram amplificadas as regiões repetitivas do DNA nuclear (TCZ) e o gene ribossomal 28S α (rDNA 28S α). Também foram avaliadas a sensibilidade e a especificidade dos primers. A extração de DNA pelo método clorofórmio/álcool isoamílico foi testada após amostras serem isoladas por flutuação em Sulfato de zinco. O limite mínimo de detecção utilizando o gene ribossomal rDNA 28S α foi observado na ordem de 20 pg de DNA de *T. cruzi*, enquanto que para as regiões repetitivas nuclear TCZ foi de 20 fg. Os números mínimos detectados de células em 10 mL de polpa de açaí foram: 170.000 tripomastigotas para rDNA 28S α e 1,7 tripomastigotas para o TCZ. O limite de detecção para a amplificação do gene rDNA 28S α foi de 400 fg em PCR em tempo real (qPCR) e o número de células detectadas foram 10.000. A metodologia de isolamento de *T. cruzi* pela flutuação em sulfato de zinco, juntamente com a amplificação de regiões repetitivas do DNA nuclear (TCZ) e do gene ribossomal (rDNA 28S α) por PCR qualitativa e qPCR, demonstraram ser uma ferramenta

aplicável para a detecção de açaí contaminado com *T. cruzi*. A utilização desta metodologia pode ser apropriada em casos de surtos de transmissão de doença de Chagas por via oral.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Açaí, *Euterpe oleracea*, *Trypanosoma cruzi*, transmissão oral.

ABSTRACT

The American trypanosomiasis or disease of Wounds (DC) is a disease that affects mainly the poor population of Latin American countries. It is estimated that 7-8 million persons are infected with *Trypanosoma cruzi* in the Latin America and around 2 to 3 million persons have the chronic form in Brazil. Despite the accomplishment of the control of the vector transmission for DC in endemic regions, the alternative forms of transmission became evident like the oral transmission. The oral transmission occurs by accidental ingestion of infected triatomines, foods contaminated with feces of these triatomines or secretions of wild animals infected with *T. cruzi*. The craftily produced açai (*Euterpe oleracea*) juice is considered the main responsible for outbreaks of the DC in the North of Brazil. Small outbreaks of the DC were already registered after groups of persons ingested the juice contaminated with *T. cruzi* in the states of Amapá, Amazon and Pará. The main objective of this work is to develop and to validate a methodology to detect *T. cruzi* contaminations in açai-based foods and beverages. For this, 10 mL of açai pulp were inoculated with 10^7 *T. cruzi* epimastigote or trypomastigote cells, which were subsequently isolated by flotation in zinc sulfate. Next, the extraction of DNA and PCR analysis were conducted. For PCR detection, the repetitive regions of the nuclear DNA (TCZ) and the ribosomal gene 28S α (rDNA 28S α) were amplified. Moreover, the specificity and sensibility of the primers were determined. The method using chloroform/isoamyl alcohol was chosen for *T. cruzi* DNA extraction from açai samples. The minimum detection limit for the ribosomal gene rDNA 28S α was observed in the order of 20 pg of *T. cruzi* DNA, while for the nuclear repetitive regions TCZ it was 20 fg. The minimum number of cells detected in 10 mL of açai pulp were 170,000 trypomastigotes for rDNA 28S α and 1.7 trypomastigotes for TCZ. The detection limit for the amplification of the rDNA 28S α gene was 400 fg by real time PCR (qPCR) and the number of detected cells were 10,000. The methodology of *T. cruzi* isolation by flotation in zinc sulfate followed by the amplification of repetitive regions of the nuclear DNA (TCZ) and the ribosomal gene (rDNA 28S α) by qualitative PCR and qPCR, demonstrated to be an applicable strategy to detect *T. cruzi* contaminations in açai-based foods and beverages. The application of this

methodology can be appropriated in cases of outbreaks of Chagas disease transmission by oral route.

Keywords: Chagas disease, açai, *Euterpe oleracea*, *Trypanosoma cruzi*, oral transmission.

1-INTRODUÇÃO

1.1-Doença de Chagas

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas (DC) é conhecida há mais de cem anos desde sua descrição por Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (Figura 1) em 1909 (Chagas, 1909). É uma doença, que afeta principalmente a população pobre de países latino-americanos e é considerada emergente em países não endêmicos. Estima-se que 7-8 milhões de pessoas estão infectadas com *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), parasita causador da DC, na América Latina, sendo registrados a cada ano em torno de 55.000 novos casos nesta mesma região (DNDi, 2010) . Dentre estes pacientes 25% são sintomáticos e cerca de 30% dos pacientes crônicos apresentam alterações cardíacas e/ou intestinais irreversíveis, resultando em 14.000 mortes por ano (OMS, 2014; Moncayo et al., 2006). Estima-se que aproximadamente 400.000 estejam infectadas fora da América latina devido às migrações (Figura 2). As migrações de pessoas infectadas levam a uma distribuição a partir dos países endêmicos para a América do Norte, Europa e Oceania. Apesar do fato de que mais de 500.000 pessoas de origem latino-americana vivem atualmente na Europa, a DC não é considerada ainda como um problema de saúde pública. Casos de transmissão via doação de sangue, transplante de órgãos ou de mãe para filho são relatados por vários países europeus, mas não há nenhuma base de dados (STRASEN, 2014). Dados epidemiológicos atuais são em sua maioria disponíveis a partir de levantamentos regionais de outros países ou são extrapolados. Por isso, há uma grande variação nos números estimados sobre a incidência de Chagas nos países europeus (STRASEN, 2014).



Figura 1: Fotografia de Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (<http://revistavivelatinoamerica.com/2014/04/15/carlos-chagas/>).

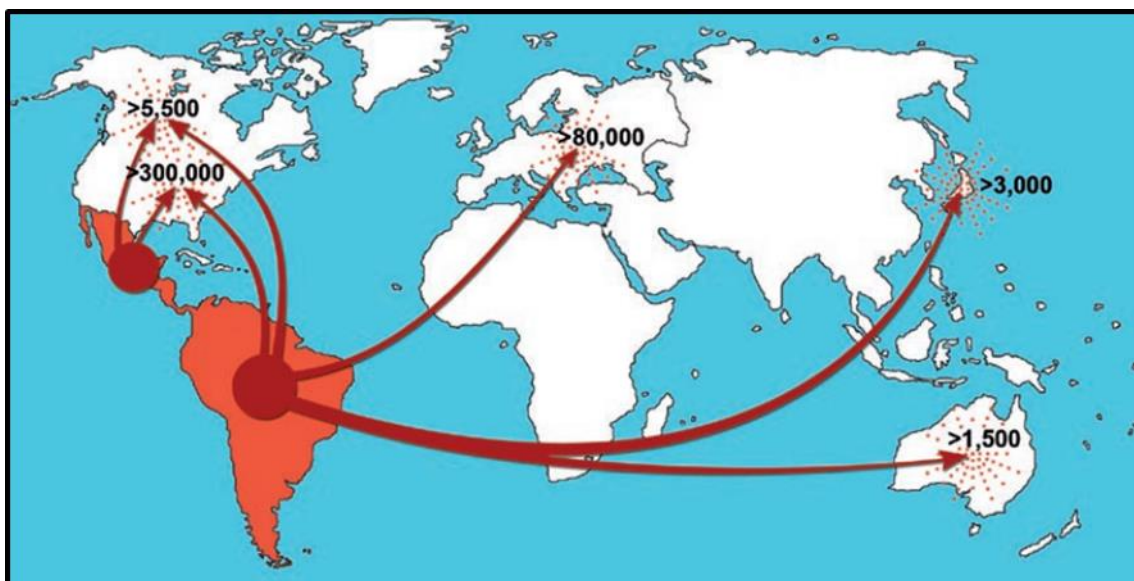


Figura 2: Estimativa do número de infectados no mundo e rotas migratórias que contribuíram para a disseminação da doença de Chagas a partir da América Latina (COURA, 2010)

A DC originou-se há milhares de anos como uma infecção enzoótica de animais silvestres e começou a ser transmitida aos seres humanos como uma antropozoonose quando o homem invadiu ecótopos silvestres. Apesar da prova de infecção humana ter sido encontrada em múmias de até 9.000 anos de idade, a DC

se estabeleceu como uma zoonose somente nos últimos 200-300 anos, com a participação de triatomíneos adaptados aos ambientes domésticos (COURA, 2009).

Um século depois de sua descoberta, a DC ainda é considerada um problema de saúde pública. A mortalidade causada pela Tripanossomíase Americana, apesar de ter diminuído entre 2000 e 2010, de 3,4% para 2,3% no Brasil, devido ao controle da transmissão por vetores e transfusões de sangue, houve um aumento de casos na região Norte de 1,6% (NÓBREGA et al., 2014). Isso se deve a mudança do perfil epidemiológico da doença em consequências dos novos padrões de migração humana e das formas alternativas de transmissão, como a oral, que levaram à urbanização e globalização da doença (COURA et al., 2010; DIAS et al., 2011).

1.2- *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é o agente etiológico da DC, pertencente à Ordem Kinetoplastida e à Família dos Trypanosomatidae. É caracterizado pela existência de um único flagelo e do cinetoplasto, uma estrutura contendo DNA e localizada na mitocôndria. Em seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta três formas, as quais são identificadas pela posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo. Os amastigotas (que se multiplicam dentro das células de mamíferos infectados) são arredondados e apresentam inconspícuos flagelos. Nos epimastigotas (forma do parasita no intestino do triatomíneo infectado onde se replica), o cinetoplasto e a bolsa flagelar estão em posição anterior ao núcleo, e nos tripomastigotas metacíclico e sanguíneo (estágios infectantes do parasito presente no intestino posterior do Triatomíneo e no hospedeiro mamífero respectivamente) o cinetoplasto situa-se na parte posterior do flagelado, em posição terminal ou subterminal, e o flagelo emerge da chamada bolsa flagelar, de localização próxima ao cinetoplasto (Figura 3).

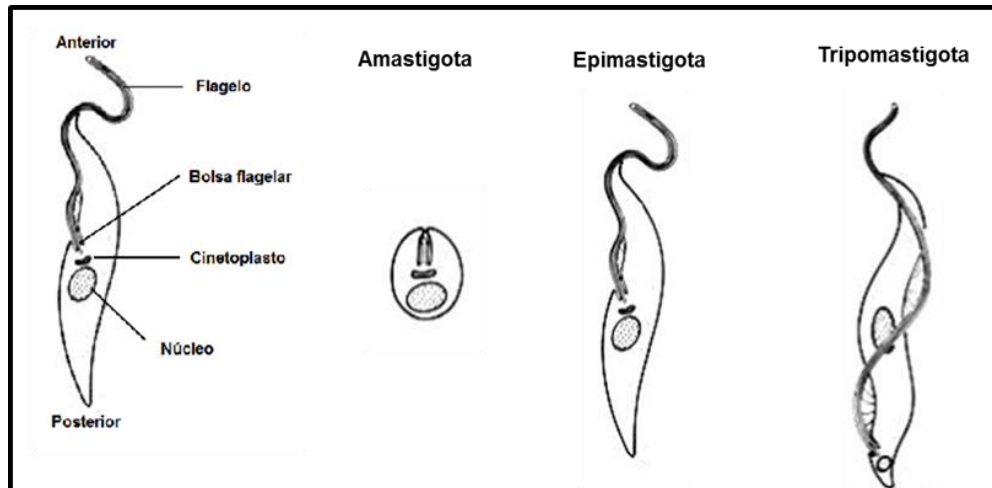


Figura 3: Esquema mostrando as estruturas morfológicas dos estágios evolutivos do *Trypanosoma cruzi* (fonte: Bases de Parasitologia Rey, com adaptações).

1.3- Vetores e hospedeiros

Os vetores biológicos são insetos domésticos e/ou silvestres encontrados em vasta área do continente americano, desde o sul dos Estados Unidos passando pelo México, Argentina até o Chile, fazendo parte da subfamília Triatominae (Hemiptera, Família Reduviidae) como as espécies *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Rhodnius pallescens* (GRAYSON, 2010). O desenvolvimento do hospedeiro invertebrado passa por cinco estágios de ninfas (Figura 4) e todos são capazes de transmitir o *T. cruzi* (CAROD-ARTAL, 2013). Após a eclosão dos ovos, as ninfas já iniciam o forrageamento em busca de alimento, sendo tanto os machos quanto os fêmeos, hematófagos obrigatórios. A proximidade da fonte alimentar é muito importante para a orientação dos triatomíneos que se alimentam principalmente de sangue de animais silvestres como marsupiais, pequenos roedores (REY, 2010). Muitas espécies de triatomíneos como a do gênero *Rhodnius* encontram-se associados a buritizais ou açazeiros (FERREIRA et al., 2014). Porém essa associação não é estável, ou seja, uma espécie de triatomíneo considerada silvestre pode se tornar domiciliadas. Devido às degradações ambientais como a abertura de pastos e construções de estruturas peridomicílios como galinheiros, currais e habitações rudimentares com paredes ou tetos com defeitos e rachaduras podem criar um habitat adequado para o alojamento dos triatomíneos, propiciando assim a transmissão doméstica (Figura 5).



Figura 4: Estágios evolutivos dos gêneros *Triatoma* (parte superior da figura) e *Rhodnius* (parte inferior da figura) (<http://www.misodor.com/CHAGAS.php>)



Figura 5: Exemplos de habitações que favorecem a infestação por Triatomíneos (fonte: <http://ambiente.hsw.uol.com.br/adobe5.htm>).

Várias espécies de mamíferos silvestres e domésticas podem ser infectadas por *T. cruzi* servindo, dessa forma, como hospedeiros e reservatórios deste protozoário parasito humano (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). Alguns mamíferos silvestres como quatis, gambás se aproximam das casas, frequentando galinheiros e currais (REY, 2010). Como por exemplo, o *Didelphis marsupialis* que é considerado uma espécie sinantrópica; podem estar servindo como fonte de infecção aos triatomíneos que ocupam os mesmos habitat dos humanos (REY, 2010; WESTPHALEN et al., 2010). E em consequência da adaptação dos

triatomíneos no peridomicílio, as infecções dos animais domésticos passaram a ser encontradas nas zonas endêmicas (WESTPHALEN et al., 2010)

1.4- Formas de transmissão e sintomatologia

A transmissão de *T. cruzi* via hospedeiro invertebrado ocorre quando triatomíneos infectados excretam o parasito através de suas fezes durante o repasto sanguíneo nos hospedeiros vertebrados, dentre os quais está incluso o homem (Figura 6) (RASSI, 2010). Parasitos presentes nas fezes podem atingir a corrente sanguínea humana através de lesões na pele, ou ainda penetrar através de mucosas, mesmo que íntegras (RASSI, 2010).

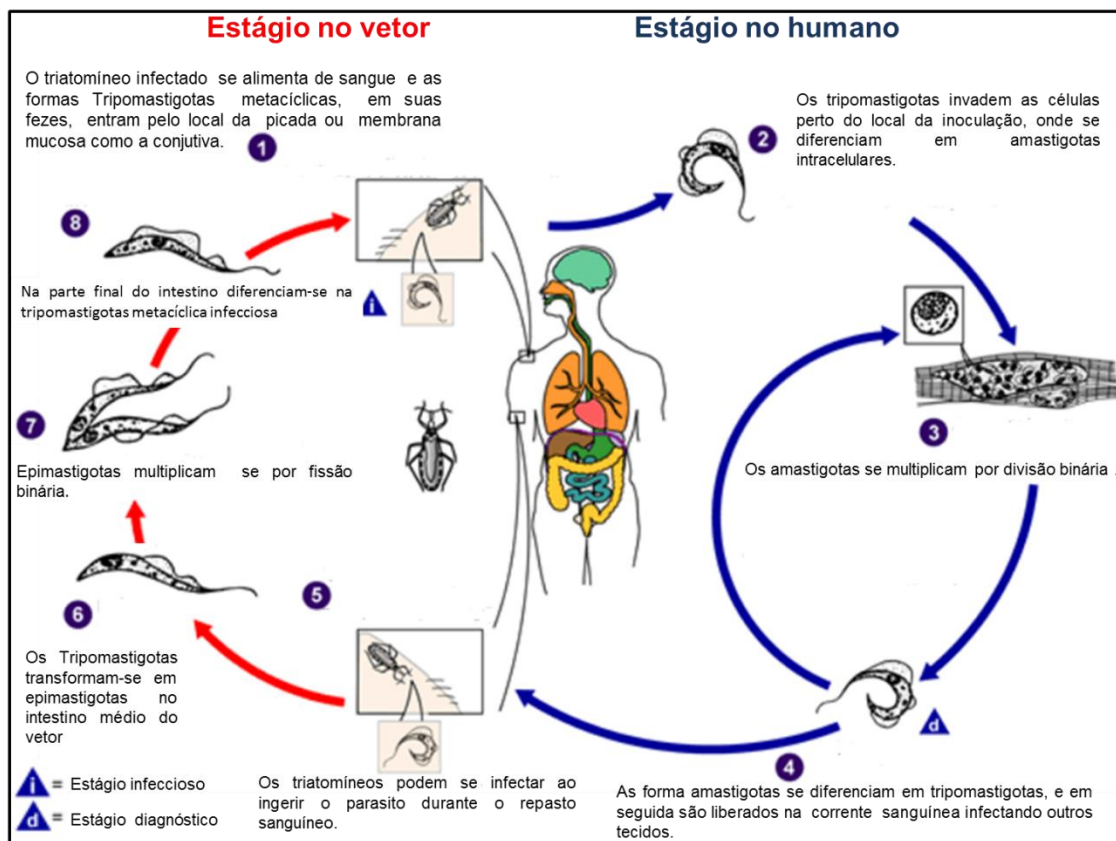


Figura 6: Ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado e no homem (Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>)

Quando a mucosa da conjuntiva for a porta de entrada do parasito o indivíduo afetado pode apresentar, entre outros sinais de inoculação, o edema das pálpebras. Este edema bpalpebral descrito pelo pesquisador argentino Romaña em 1935 é conhecido por “Sinal de Romaña” (Figura 7). A febre é o primeiro sintoma geral e de

aparecimento precoce; seguidas de outras manifestações clínicas como náuseas, vômitos e diarreias eventuais (WESTPHALEN et al., 2010). Dentre outras alterações sistêmicas, destacam-se o edema subcutâneo; manifestações de comprometimento cardíaco e meningoencefalite (DIAS; AMATO-NETO, 2011; WESTPHALEN et al., 2010). A morbidade da doença aguda é maior em crianças, que apresentam sinais e sintomas como cardiopatia aguda, meningoencefalite ou hepatoesplenomegalia (Figura 7), que na maioria dos casos, desaparecem espontaneamente, muitas vezes sem tratamento específico no prazo de semanas ou meses (DIAS; AMATO-NETO, 2011; WESTPHALEN et al., 2010).

Após o desaparecimento das manifestações da fase aguda, o paciente passa por um longo período assintomático que poderá perdurar por anos e nesse período poderá permanecer latente ou evoluir para a forma crônica da doença. Pessoas assintomáticas por vários anos podem, na fase crônica da doença, apresentar subitamente manifestações relacionadas com o sistema cardiovascular (forma cardíaca), sistema digestivo (forma digestiva) ou ambas (forma mista) (WESTPHALEN et al., 2010).

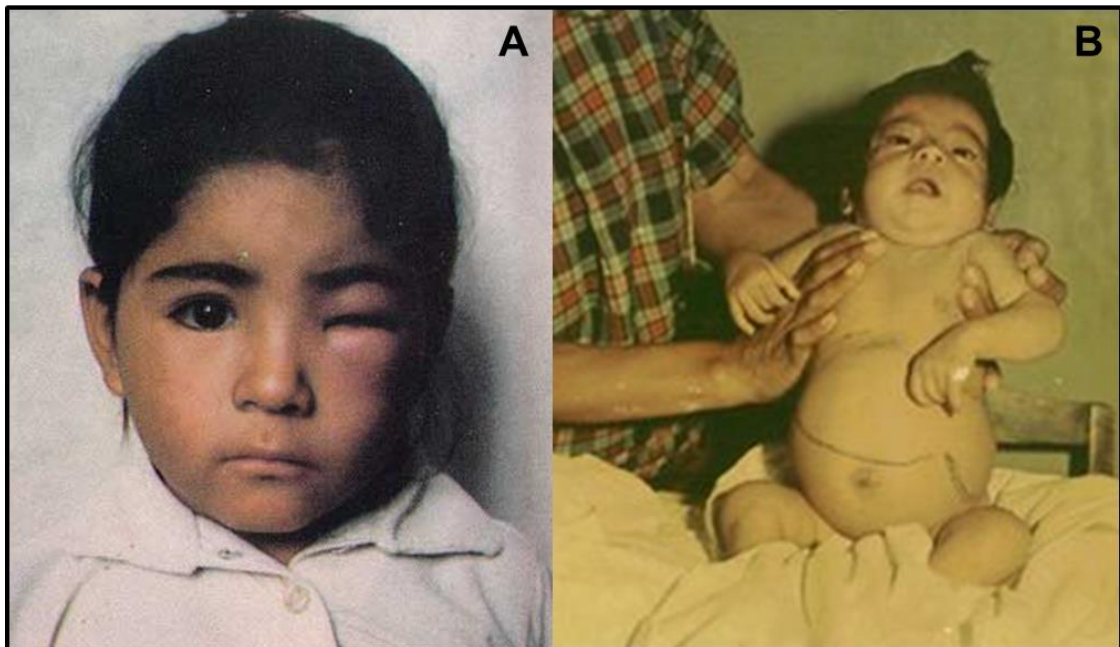


Figura 7: Sintomatologia da Doença de Chagas: A- Sinal de Romanã, B- Criança com hepatoesplenomagalia. (Fonte: <http://mobilidade-internacional-uscspainit.blogspot.com.br/2012/10/doenca-de-chagas.html>).

Em outras formas de transmissão incluem-se a congênita, quando mães infectadas transmitem os parasitos a seus fetos (intra-útero) ou recém-nascidos (durante o parto); transfusão de sangue; transplante de órgãos; inoculação acidental, em pessoas que trabalham com a manipulação de amostras contaminadas pelo parasito, e por fim a ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com *T. cruzi* (RASSI, 2010) (Figura 8). No Brasil e em outros países da América Latina, programas multicêntricos para o controle da transmissão vetorial, iniciados a partir das décadas de 1960 e 1970, assim como a implantação progressiva de programas de controle em bancos de sangue na década de 1980, conseguiram reduzir em até 70% o número de novas infecções. Isto ocorreu principalmente devido à interrupção da transmissão vetorial e por transfusões de sangue (DIAS & SCHOFIELD, 1999; DIAS et al., 2002; GRAYSON, 2010; DIAS & AMATO-NETO, 2011; SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012). Com o controle da transmissão vetorial nos países e regiões endêmicas para a DC, formas alternativas de transmissão como a transmissão oral por meio da ingestão de alimentos e bebidas contaminadas emergiram como a principal forma de contágio em humanos nos últimos anos (NÓBREGA et al., 2009, SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012).

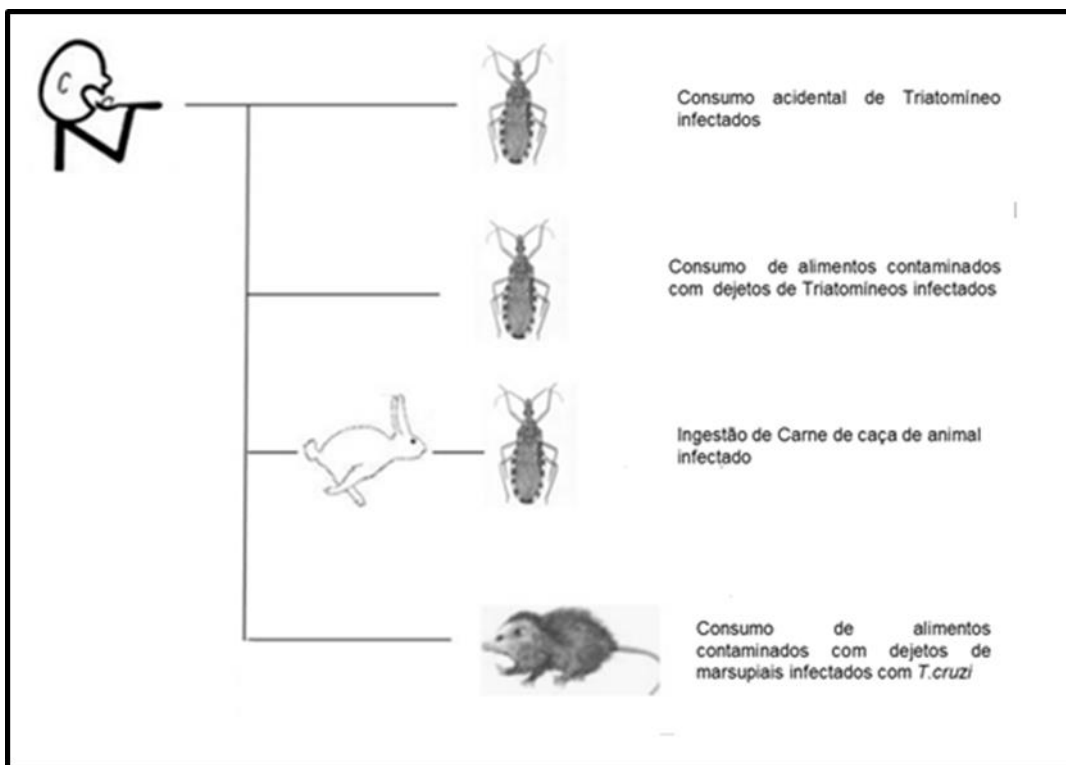


Figura 8: Fontes prováveis de contaminação por via oral da Doença de Chagas (TOSO et al., 2011; adaptado).

A transmissão oral ocorre pela ingestão de comidas ou bebidas contaminadas com triatomíneos, suas fezes e urina, ou por contaminação através de sangue e fluidos de animais infectados. A ingestão de carne crua de animais infectados também pode constituir outra forma de infecção por via oral (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; NÓBREGA et al., 2009). O primeiro caso reportado de um surto de DC aguda por infecção oral no Brasil foi diagnosticado em 1965 (DA SILVA et al., 1968). Após este acontecimento, cerca de oito surtos foram registrados no Brasil até o ano de 2009 (SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012). Entre os anos 2000 e 2010 mais de 1.000 casos de DC aguda foram relatados na região Amazônica em 138 surtos de infecção oral, principalmente na Amazônia brasileira (SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012). Dentre estes, cerca de 70% foram atribuídos à ingestão de comida ou bebida contaminada com *T. cruzi* (SVS-MS, 2011; SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012).

1.5- Diagnóstico

Há que se destacarem possibilidades de infecção progressa e reagudização da DC por fatores como imunodepressão; infecção por outras vias clássicas como vetorial e transfusão de sangue, além da realização de análises laboratoriais através da detecção de imunoglobulinas específicas contra antígenos de *T. cruzi* pelo método de ELISA ou por imunofluorescência indireta (RAMOS et al., 2009). Na fase aguda, busca-se imunoglobulinas do subtipo IgM e na fase crônica do subtipo IgG. Nestes métodos sorológicos anteriores podem ocorrer resultados falsos positivos devido às reações cruzadas com antígenos de *Leishmania*, ou *Trypanosoma rangeli* (um tripanossomatídeo que também infecta triatomíneos e compartilha algumas áreas endêmicas com *T. cruzi*) caso o paciente tenha sido infectado por estes parasitos (RAMOS et al., 2009; UMEZAWA et al., 1996; CUBA, 1998; D'ALESSANDRO, 1976; HUDSON et al., 1987; GUHL et al., 2002; XAVIER et al., 2014). Para descartar possibilidades de falsos positivos é recomendado o emprego de outros métodos laboratoriais confirmatórios como immunoblotting ou amplificação de material genético de *T. cruzi* através da reação em cadeia da polimerase (PCR)(RAMOS et al., 2009; UMEZAWA et al., 1996).

Métodos de diagnóstico molecular têm permitido a identificação mais precisa de Tripanosomatídeos e com o avanço das técnicas moleculares, oligonucleotídeos

mais sensíveis como TCZ descrito por MOISER et al., (1989), que amplificam um sequências repetitivas de DNA nuclear de *T. cruzi*, permitiram detectar uma única célula em grande volume de sangue como relatados por ELOY e LUCHEIS (2012) e GILBER et al.,(2013). Outros primers permitiram identificar grupos de Tripanosomatídeos como o descrito por SOUTO et al., (1996), que analisou amostras de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros vertebrados e invertebrados, amplificando regiões do DNA nuclear como a subunidade maior do cistron ribossômico (rDNA 28S) e o mini-exon, que é um gene que participa do mecanismo pós-traducional (trans-splicing) em Tripanosomatídeos (MURPHY et al.,1986; ULLU E. & TSCHUDI, 1995). Há também o esforço de alguns grupos no sentido de se desenvolver métodos e/ou protocolos utilizando-se técnicas quantitativas de amplificação de ácidos nucléicos, principalmente através da PCR em tempo real, da PCR com múltiplos alvos (regiões gênicas a serem amplificadas), ou também técnicas de captura de ácidos nucléicos presentes nas amostras a partir de aptâmeros e/ou oligonucleotídeos sintéticos conjugados a matrizes sólidas (CALDAS et al., 2012; BRAVO et al., 2012; QVARNSTROM et al., 2012; NAGARKATTI et al., 2012; DEBORGGRAEVE et al., 2009).

1.6- Açaí: transmissão da DC por via oral

O açaí (*Euterpe oleracea*) (Figura 9) é o alimento diário para muitas pessoas da população do norte do país, tem preço acessível e alto valor nutricional; contudo, a comercialização e o consumo são realizados imediatamente após o seu processamento, sem qualquer tratamento térmico (FERREIRA et al.,2014). E devido a este consumo sem o tratamento adequado, o açaí tem sido associado ao maior número de casos de DC ocorridos na região Norte nos últimos anos (FERREIRA et al., 2014; PEREIRA et al., 2009; PASSOS et al., 2014). Batedores de açaí que exploram o fruto, comumente, apresentam falhas higiênicas nas etapas de colheita, transporte e processamento (Figura 10). Dessa forma, insetos infectados com *T. cruzi* podem fazer parte desse processo, já que, acidentalmente, podem ser moídos com a polpa da fruta, e ao ser consumido, pode resultar em grandes concentrações de parasitos na corrente sanguínea do individuo, desencadeando os sintomas da doença na sua forma aguda (DIAS, 2006). A exportação do açaí infectado para

outras regiões pode contribuir ainda mais para o aumento do número de pessoas com DC. A viabilidade do parasito a estresse de variações térmicas tem sido demonstrada até mesmo com a polpa congelada (BARBOSA, 2010). Este fato pode explicar a razão de muitos surtos não terem a relação com transmissões clássicas, conforme demonstrado por estudos realizados na região de Belém (PA), ocasião em que XAVIER et al. (2014) relatou casos surgidos nos municípios de Val-de-cães e Jurunas onde a contaminação de DC por via oral não poderiam ser autóctonos, devido à ausência de qualquer ciclo enzoótico de *T. cruzi* em tais lugares. Em contrapartida, nas três áreas insulares a partir das quais a fruta açai é originária, 66,7% dos mamíferos selvagens e doméstico e 15,6% dos triatomíneos encontravam-se infectados por *T. cruzi*. Estes resultados reforçam a hipótese de que os casos de DC nas áreas urbanas podem ser derivados de outras regiões endêmicas. Este novo enfoque epidemiológico da DC foi denominado de "Distantiae Transmission".

Apesar de existirem importantes estratégias governamentais no sentido de combater a transmissão de DC por via oral como a RDC n° 218/2005 (ANVISA) que regula a manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais e os decretos estaduais n° 2475/2010 e n° 326/2012 do governo do Pará que estabelece boas práticas alimentares e cadastramento de batedores de açai, há uma grande necessidade de metodologias que auxiliem na prevenção e controle da DC (FERREIRA et al., 2014). Outros alimentos também já foram relacionados com surtos de DC, tais como caldo de cana de açúcar, água ou sopa contaminada com triatomíneos infectados ou suas fezes (SHAW & FRAIHA, 1969; DIAS et al., 2008; 6 CAVALCANTI et al., 2009; BASTOS et al., 2010; SVS, 2005; STEINDEL et al., 2008); ou ainda contaminados com fluidos e secreções de animais infectados (SILVA et al., 1968; SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; SVS, 2005); e bacaba (*Oenocarpus bacaba*) contaminadas com *T. cruzi* (PINTO et al., 2005; NÓBREGA et al., 2009; VALENTE et al., 2006; VALENTE et al., 2009). Além dos casos de surtos de DC aguda na Venezuela e Colômbia, atribuídos à ingestão de sucos de laranja, goiaba e tangerina contaminados por triatomíneos infectados com *T. cruzi* (HERNANDEZ et al.; 2009; NOYA et al., 2010).



Figura 9: Açazeiro (*Euterpe oleracea*) (Fonte: <http://plantasfrutiferas.blogspot.com.br>)



Figura 10: Ilustração dos processos de colheita, transporte, comercialização e consumo do Açai na região Amazônica. (Fontes: <http://www.portalamazonia.com.br/cultura/arte/novembro-e-mes-da-criatividade-e-cultura-amazonica-no-amazon-sat/>; <http://amazoniaphotos.arteblog.com.br/458605/Nacolheita-do-fruto-do-acai/>; http://pelasruasdebelem.zip.net/arch2009-09-01_2009-09-30.html).

1.7- Desafios para a prevenção e controle da transmissão da DC por via oral

A diferenciação entre a infecção por via oral e as outras vias de transmissão da DC em pacientes com a forma aguda da doença é basicamente dependente da análise de eventos epidemiológicos, assim como da análise do quadro clínico dos pacientes pelos profissionais de saúde (DIAS & AMATO-NETO, 2011). Apesar da existência de técnicas moleculares e primers sensíveis que possam detectar o *T. cruzi*. A análise e detecção direta em fontes alimentares de infecção são raras, uma vez que os sintomas surgem alguns dias após a ingestão do alimento contaminado, período em que os alimentos suspeitos já foram descartados. Além disso, não há atualmente protocolos padronizados para a realização desta investigação em amostras alimentares suspeitas (TOSO et al., 2011). Uma abordagem promissora para a detecção de *T. cruzi* em amostras de alimentos e bebidas seria a amplificação de fragmentos de ácidos nucleicos do parasito através de técnicas moleculares baseadas na amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A alta sensibilidade desta técnica permite a detecção de quantidades muito pequenas de ácidos nucleicos do parasito, na escala femtomolar (10^{-15} moles por litro), o que muitas vezes corresponde à capacidade de detectar-se uma única célula do parasito (*T. cruzi*) na amostra (DUFFY et al., 2009).

Baseado no que já foi desenvolvido e padronizado até o presente momento em termos de detecção de *T. cruzi* e diagnóstico da DC em amostras biológicas de pacientes, é racionalmente justificável que estes conhecimentos sejam utilizados no desenvolvimento de técnicas e/ou protocolos para a detecção de *T. cruzi* em outros tipos de amostras, como alimentos e bebidas. O principal desafio na adaptação destas técnicas para a utilização em amostras alimentares é a padronização de um protocolo com robustez suficiente para se evitar resultados falsos negativos em função de problemas na amostragem; de interferentes presentes nos diferentes tipos de alimentos e bebidas; assim como de variações técnicas na realização do método (erros humanos). Em relação aos resultados falsos positivos o protocolo adaptado deve ser capaz de evitar interferências e/ou reações cruzadas com tripanossomatídeos parasitos de insetos e plantas como *T. rangeli* e aqueles pertencentes aos gêneros *Phytomonas*, *Herpetomonas* e *Leptomonas*. Pois estes poderiam estar presentes em amostras de alimentos e a detecção e classificação

desses organismos como *T. cruzi*, erroneamente, poderia causar problemas para os programas de saúde pública e epidemiologia, assim como problemas socioeconômicos. Em resumo, existe uma necessidade real e urgente para que se tenha um protocolo definido e padronizado para detectar *T. cruzi* em polpa de açaí por se tratar de uma questão relevante para a Saúde Pública. Além disso, o desenvolvimento de metodologia sensível para a detecção da contaminação alimentar e seu uso na prevenção por órgãos sanitários são de extrema importância para evitar a transmissão oral da doença de Chagas.

2-OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é desenvolver uma metodologia molecular sensível e específica para a detecção do *T. cruzi* em polpa de açaí.

2.1-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar regiões gênicas de *T. cruzi* a serem amplificadas e oligonucleotídeos a serem utilizados;
- Avaliar a especificidade e sensibilidade das reações de PCR utilizando-se tanto amostras de DNA genômico purificado quanto células inteiras de *T. cruzi*;
- Desenvolver uma metodologia de isolamento de formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* inoculados em polpa de açaí;
- Avaliar a metodologia por PCR e qPCR determinando os limites mínimos de detecção de células de *T. cruzi* em polpa de açaí.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Material

3.1.2-Meios

3.1.2.1-Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (CAMARGO, 1964).

Foram dissolvidos 5 g de Bacto Liver (extrato de fígado) em 500 mL de água destilada, aquecido a 60°C em uma placa sob agitação durante 1h e filtrado em papel Whatman número 1. Depois foram adicionados:

- NaCl 4 g;
- KCl 0,4 g;
- Na₂HPO₄ 8 g;
- Glicose 2 g;
- Triptose 5 g.

Em seguida o pH foi acertado para 7,2 com HCl concentrado e posteriormente o volume para 900 mL. O meio de cultura foi esterilizado por filtração através do filtro Millipore® 0,22 µm. Após esterilização, o meio foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gibco-BRL), hemina a uma concentração final de 2 mg/mL e adicionados de ampicilina (100 µg/mL)/estreptomicina (30 µg/mL) esterilizados por filtração por filtro Millipore® 0,22 µm.

3.1.2.2-Meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

Foram adicionados lentamente 13,4g de DMEM (Gibco BRL) sob agitação constante em 900 mL de água destilada. Depois que o pó foi totalmente dissolvido, foram acrescentados 3,7 g de bicarbonato de sódio. O pH foi acertado para 6,8 com HCl concentrado. O volume foi completado com água destilada e esterilizado por filtração em filtro Millipore 0,22 µm. Após a esterilização, foram adicionados de soro fetal bovino e ampicilina (100 µg/mL)/estreptomicina (30 µg/mL) esterilizada por filtração por filtro Millipore® 0,22 µm. Em seguida, o meio foi distribuído assepticamente em garrafas previamente esterilizadas e armazenado a 4°C.

3.1.3-Soluções

3.1.3.1-Solução de Sulfato de Zinco 33%

Foram dissolvidos 330g de Sulfato de Zinco em 1.000 mL de água deionizada. Após o preparo a solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.1.3.2- Solução de CTAB/NaCl (Brometo de cetiltrimetilamônio/Cloreto de sódio) (adaptado de Ausubel et al.,(1988))

O preparo da solução foi realizado como descrito previamente por Ausubel et al. (1988). Oito gramas de Brometo de cetiltrimetilamônio e 4g de NaCl foram dissolvidos em 80 mL de água deionizada pré-aquecida a 65°C. Após a dissolução completa dos reagentes, o volume da solução foi completado para 100 mL com água deionizada pré-aquecida a 65°C. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.1.3.4-Soluções da eletroforese em gel de agarose

3.1.3.4.1-Gel de agarose

Para o preparo de gel de eletroforese, a agarose foi fundida em tampão SB 1X, em forno micro-ondas, e colocada em cuba de eletroforese horizontal.

3.1.3.4.2-Tampão SB 20X

O preparo do tampão seguiu o descrito por Brody e Kern (2004). Foram dissolvidos 8g de Hidróxido de sódio NaOH e 45g de Ácido bórico H₂BO₃ em 1.000 mL de água deionizada. Para a realização de gel de agarose e eletroforese, o tampão SB foi utilizado na concentração de 1X. As soluções tanto de estoque quanto a de uso foram armazenadas à temperatura ambiente.

3.1.3.4.3-Solução de brometo de etídio

Solução estoque: 10 mg/mL em H₂O MilliQ.

3.1.3.4.4-Tampão de amostra (10X)

Solução estoque: TBE 10 X; Glicerol 50%; Azul de Bromofenol 0,01%; Xileno Cianol 0,01%.

Para o preparo das amostras foram utilizados 2 μ L de tampão de amostra e 8 μ L de amostra de DNA genômico ou produtos de reações de PCR e aplicados nos géis de agarose para a eletroforese.

3.1.4- Linhagens celulares

3.1.4.1-*Trypanosoma cruzi*

Neste trabalho experimental foram utilizadas as formas epimastigotas das cepas Brener (BRENER; CHIARI; 1963) e G (YOSHIDA, 1983) e tripomastigota Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953).

3.1.4.2-Células HeLa

As células HeLa utilizadas são do tipo epitelial, aneuploides e foram isoladas inicialmente de adenocarcinoma de útero em 1952.

3.2-Métodos

3.2.1-Delineamento experimental

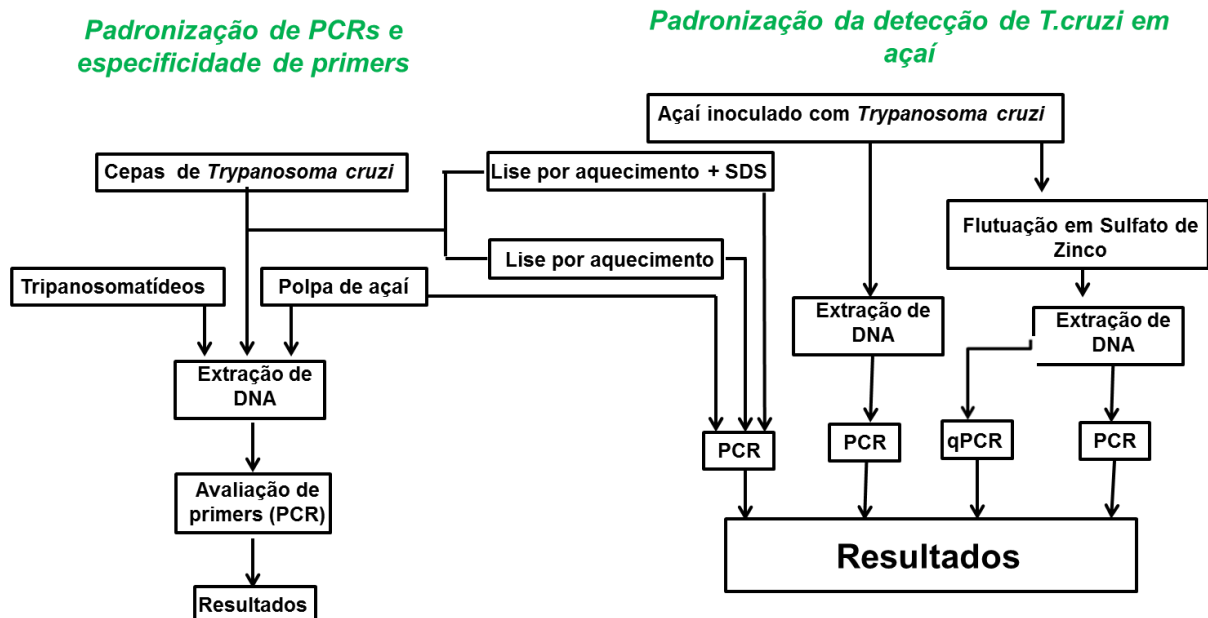


Figura 11: Fluxograma ilustrando o delineamento experimental seguido durante a realização do presente trabalho. Inicialmente foram padronizadas as reações de PCR com diferentes primers e DNA genômico isolados de cepas de *T. cruzi*, outros tripansomatídeos e de polpa de açaí. Posteriormente, células de *T. cruzi* foram inoculadas em polpa de açaí e em seguida foram testados diferentes métodos de detecção destas células de *T. cruzi* como: a extração do DNA genômico e amplificação por PCR; amplificação por PCR direta da amostra de polpa de açaí e, por último, o

isolamento de células de *T.cruzi* por flutuação em sulfato de zinco seguidas da extração de DNA e PCR.

3.3-Manutenção das culturas

3.3.1-Manutenção da cultura de células epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As células foram descongeladas a partir de estoques a -80 °C e mantidas a 28 °C em meio LIT suplementado em frascos para cultura de células (50 mL). As células eram observadas diariamente em microscópio óptico invertido. As contagens eram realizadas diariamente em câmara de Neubauer, quando as células atingiam 10^7 células epimastigotas por mL eram então utilizadas para extrações de DNA ou inoculações em açaí.

3.3.2-Manutenção da cultura de células HeLa

As células HeLa foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico a 37°C com 5% de CO₂. A manutenção foi realizada com repiques semanal, como descrito a seguir: O meio DMEM suplementado utilizado para a multiplicação foi retirado e descartado, 2 mL de solução de verseno contendo 1% de tripsina foram adicionados à garrafa e nas células foram mantido nesta solução à temperatura ambiente por aproximadamente 30 seg. Após esse período, a solução de verseno foi retirada e descartadas e as células incubadas a 37°C por 10 min para que descolassem da garrafa. Em seguida, 2 mL de meio DMEM suplementado foram adicionados em cada cultura para a homogeneização das células e 500 µL de suspensão das células forma inoculadas em garrafas de 25 cm² (*Corning*) contendo 5 ml de meio DMEM suplementado. As células forma incubadas a 37°C evitando-se que as mesmas entrassem em confluência, realizando-se repiques periódicos.

3.3.3-Manutenção da cultura de células tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Os tripomastigotas foram cultivados e purificados a partir de culturas de células HeLa em confluência de 50% em meio DMEM e incubados a 37°C a uma atmosfera com 5% de CO₂.

3.4-Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Tabela 1: Primers utilizados para a amplificação do DNA de T.cruzi e açai

Primer	Característica	Sequência (5'-3')	Tamanho	Tm
PR 315	TCZ1 T.cruzi-DNA nuclear	CGAGCTCTTGCCCA CACGGGTGCT	24	80
PR 316	TCZ2 T.cruzi-DNA nuclear	CCTCCAAGCAGCG GATAGTTCAGG	24	76
PR 434	Tc rRNA 28S α 5'	AAGGTGCGTGCAC AGTGTG	19	60
PR 435	Tc rRNA 28S α 3'	TTTTCAGAATGGCC GAACAGT	21	60
PR 440	Miniexon	CCCCCTCCAGG CCCACTG	21	74
PR 441	Miniexon	GTGTCCGCCACCTC CTTCGGGCC	23	80
PR 442	Miniexon	CCTGCAGGCACAC GTGTGTGTG	22	72
PR 528	PR açai	CGAAAGAGTTAGA GACGGC	20	58
PR 529	PR açai	GAAATCTCATTCGT ACTCATAAC	23	60
PR 530	PR açai	GATTCGTTGGGCAC AACAATTA	22	62
PR 531	PR açai	TTGCCTCCAAAAA GGGAAATAT	23	62
PR 532	PR açai	ATTCCATTCTTGCT GCGATTAG	22	64

Para as PCRs qualitativas foram utilizados os primers TCZ1 e TCZ2 (MOSER *et al.*, 1989) que delimitam um fragmento de 188 pb (Tabela 1). O sistema de reação de PCR foi realizado em um volume final de 30 μ L constituído de Tampão 1X; 0,4 μ M de cada primer, 1,9 mM de MgCl₂ , 0,2 mM de dNTP, 1 unidade de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen/Life Technologies). As quantidades das amostras em cada experimento serão detalhadas nos resultados e discussão.

As amostras foram amplificadas em um termociclador (BioRad) e os parâmetros de amplificação para o gene TCZ foram:

1. Pré-desnaturação: 94°C por 5 min;

2. Desnaturação: 94 °C por 20 seg;
3. Anelamento: 57 °C por 10 seg;
4. Extensão: 72 °C por 30 seg;
5. Repetição das etapas de 2 a 4 por 40 vezes;
6. Extensão final: 72 °C por 7 minutos;

Para o gene rDNA 28S α foram utilizados os primers PR 434 e PR 435 (SOUTO et al., 1996) (Tabela1) que delimitam fragmentos de 110 ou 125 pb. O sistema da reação de PCR foi realizado em um volume final de 30 μ L constituído de 0,33 μ M de cada primer, Tampão 1X, 1X de BSA; 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1,5 unidades de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen/Life Technologies), os volumes e as quantidades de amostras utilizadas serão detalhados nos resultados e discussão.

As amostras foram amplificadas em um termociclador (BioRad) e os parâmetros de amplificação para o gene rDNA 28S α foram:

1. Pré-desnaturação: 94 °C por 5 min;
2. Desnaturação: 94 °C por 30 seg;
3. Anelamento: 58 °C por 30 seg;
4. Extensão: 72 °C por 40 seg;
5. Repetição das etapas de 2 a 4 por 35 vezes;
6. Extensão final: 72 °C por 1 min;

Baseado na sequência parcial de um gene de proteína ribossomal S16 e de um pseudogene de cloroplasto de *Euterpe oleracea* (GenBank – números de acessos: AM1146471 e AJ240889), conjuntos de primers para amplificar DNA de Açai (*Euterpe oleracea*) foram desenhados: PR 528 e PR 529 que denominados de PR açai 1, que delimitam fragmentos de 97 pb; PR 530 e PR 531, denominados PR açai 3 que delimitam um fragmento de 190 pb e PR 532 com o PR 531 delimitam fragmentos de 110 pb. Este último fragmento denominados PR açai 2 (Tabela 1). Com esses primers foram feitos experimentos com DNA de Açai.

Para a amplificação a reação de PCR foi realizada em um volume final de 30 μ L constituído de 0,33 μ M de cada primer, Tampão 1X, 1X de BSA; 1,5 mM de M

gCl_2 , 0,2 mM de dNTP, 1,5 u de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen/Life Technologies).

As amostras foram amplificadas em um termociclador (BioRad) e os parâmetros de amplificação para os primers de Açaí utilizados foram:

1. Pré-desnaturação: 94 °C por 5 min;
2. Desnaturação: 94 °C por 30 seg;
3. Anelamento: 58 °C por 30 seg;
4. Extensão: 72 °C por 40 seg;
5. Repetição das etapas de 2 a 4 por 35 vezes;
6. Extensão final: 72 °C por 1 min;

Para a amplificação de uma região de Miniexon foram utilizados primers que delimitam fragmentos de 300 a 350 pb: PR 440, PR 441 e PR 442 (SOUTO et al., 1996). O sistema de PCR foi realizado em um volume final de 30 μL constituído de 0,33 μM de cada primer, Tampão 1X , 1X de BSA; 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de dNTP, 1,5 u de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen/Life Technologies), os volumes e as quantidades de amostras utilizadas serão detalhados nos resultados e discussão.

As amostras foram amplificadas em um termociclador (BioRad) e os parâmetros de amplificação para a região de Miniexon foram:

1. Pré-desnaturação: 94 °C por 5 min;
2. Desnaturação: 94 °C por 30 seg;
3. Anelamento: 58 °C por 30 seg;
4. Extensão: 72 °C por 40 seg;
5. Repetição das etapas de 2 a 4 por 35 vezes;
6. Extensão final: 72 °C por 1 min;

Avaliamos a sensibilidade e a especificidade de cada primer para o DNA de *T.cruzi* e açaí. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% tratados com brometo de etídeo 0,3 $\mu\text{g/ml}$, e visualizados em sistema de fotodocumentação BioRad Universal Hood II(BioRad).

3.5- Extrações de DNA genômico

Neste trabalho foram utilizados dois tipos de extração de DNA genômico: Segundo o método que se baseia na utilização de Clorofórmio/Álcool isoamílico (adaptado de Ausubel et al. (1988)) e outro por meio do kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen/Life Technologies) seguindo as especificações do fabricante.

3.5.1-Extração de DNA pelo método adaptado de Ausubel et al. (1988)

Um mililitro de amostra purificada pelo método de flutuação em sulfato de zinco foi centrifugada a 4.000 g por 10 min. O precipitado foi ressuspenso em 200µL de PBS 1X, em seguida foram adicionados 100µL de NaCl 5M e 100µL de CTAB/NaCl (pré-aquecido a 65°C). Esta mistura foi homogeneizada em vórtex por 20 seg e logo em seguida incubada a 65°C por 10 min. Após a incubação foram adicionados 750 µL de Clorofórmio/álcool Isoamílico (24:1) e homogeneizado por 10 seg em vórtex.

O tubo foi novamente centrifugado a 12.000 g por 5 min e posteriormente a fase aquosa superior foi transferida para outro tubo, na qual foram adicionados 0,6 volumes (60%) de Isopropanol (-20°C) e incubado a -20°C por 30 min.

Após esse período de incubação o tubo foi centrifugado a 12.000 g por 30 min a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado duas vezes, cuidadosamente sem ressuspendê-lo, com etanol 70% e centrifugações a 12.000g por 3 min. Após lavagem do *pellet* de DNA, o tubo foi deixado para secar a temperatura ambiente e o DNA foi ressuspenso em 200 µL de H₂O Milli Q e estocado a 4°C. Para as reações de PCR foram utilizados 10 µL destas amostras de DNA.

3.6- Teste de avaliação preliminar de formas para lise das células de *T.cruzi* e de interferentes presentes em polpa de Açaí (*Euterpe oleracea*)

Para verificar a possibilidade de se adicionar a amostra de açaí contaminado direto no sistema de PCR, realizamos uma série de testes preliminares para confirma-la. Primeiro, o da lise de células isoladas por aquecimento, posteriormente o açaí foi adicionado ao sistema de PCR sem o parasito, e por último foi realizado a extração de DNA do açaí inoculado com *T.cruzi* pelo método de Ausubel et al., (1988) e realizado a PCR, a metodologia foi descrito a seguir:

Três tubos de 1,5 mL contendo 1 mL de meio de cultura (LIT) e $1,02 \times 10^7$ parasitos foram centrifugados a 1500 g por 5 min e lavados duas vezes em 200 µL de PBS 1X e ressuspensos em 100 µL de PBS 1X.

Para avaliar a lise das células por aquecimento, os tubos foram colocados no bloco de aquecimento a seco a 100°C e retirados após diferentes tempos de incubação (5, 10, 15 min).

A lise em detergente foi testada com SDS nas seguintes concentrações crescentes: 0%, 0,25% e 0,50% respectivamente. Os Tubos foram colocados no bloco de aquecimento a seco a 100°C e retirados após 10 minutos. Logo em seguida centrifugados a 17.000 g por 15 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados em novos tubos e 5 µL de cada tubo foram utilizados para PCR e os produtos analisados em gel de agarose.

Para a análise de interferentes da polpa de açaí, volumes crescentes da polpa foram adicionados em sistema de PCR como representado na Figura 13.

Na análise da detecção de *T.cruzi* em amostra de açaí inoculado. Um mL de polpa de açaí foi inoculada com 10^6 células de epimastigota de *T.cruzi* e o DNA desta amostra foi extraído pelo método de Ausubel et al., (1988) seguida da amplificação por PCR.

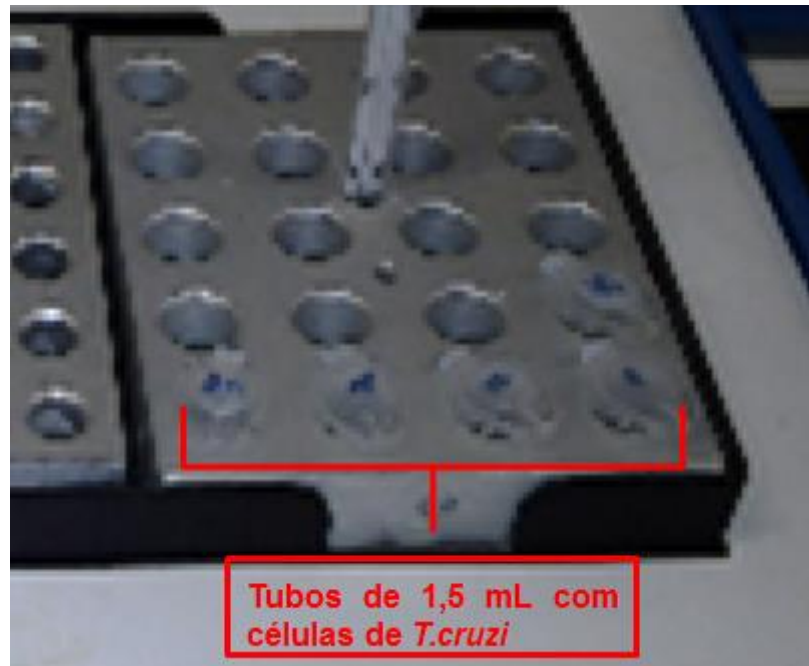



Figura 12: Bloco de aquecimento a seco utilizado na lise das células por temperatura.



Sistema de PCR	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Polpa de açaí	-	10%	20%	20%
DNA de <i>T.cruzi</i>	+	+	+	-

Figura 13: Imagem ilustrativa do procedimento de preparo das amostras contendo polpa de açaí e DNA genômico de *T. cruzi*. Os volumes finais foram ajustados para 10 uL utilizando-se água deionizada.

3.7- Metodologia de isolamento de *T. cruzi* da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) por flutuação em Sulfato de Zinco

Após a cultura atingir 10^7 células de epimastigotas ou tripomastigotas de *T. cruzi* por mL de meio de cultura, 1 mL foi separado e inoculado em 9 mL de polpa de açaí em um tubo de fundo cônico de 15 mL e homogeneizado (Figura 14) .

O método de isolamento das células de *T. cruzi* foi adaptado do procedimento descrito por FAUST e colaboradores (1938). O tubo de 15 mL com 10 mL de açaí inoculado com *T. cruzi* foi filtrado em gaze em um tubo de fundo cônico de 50 mL e 20 mL de PBS 1X foram adicionados para lavagem. Após essa primeira lavagem o material filtrado foi centrifugado a 4.000 g por 15 min, e posteriormente o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido. O procedimento de lavagem foi repetido por 3 vezes utilizando-se 20 mL de PBS 1X.

Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspendido em 20 mL da solução de sulfato de zinco 33% e centrifugado a 1.200 g por 2 min. Depois de centrifugado, o tubo foi deixado em repouso por 10 min. Logo após esse intervalo formam-se duas fases sendo coletado 1 mL do sobrenadante.

Posteriormente, a alíquota de 1 mL coletada da fase superior do gradiente em sulfato de zinco foi diluída (1:30) em PBS 1X e centrifugada a 4.000 g por 10 min. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 1 mL de PBS 1X e transferido para um tubo de 1,5 mL, no qual iniciou-se o protocolo de isolamento de DNA genômico segundo Ausebel e colaboradores (1988).

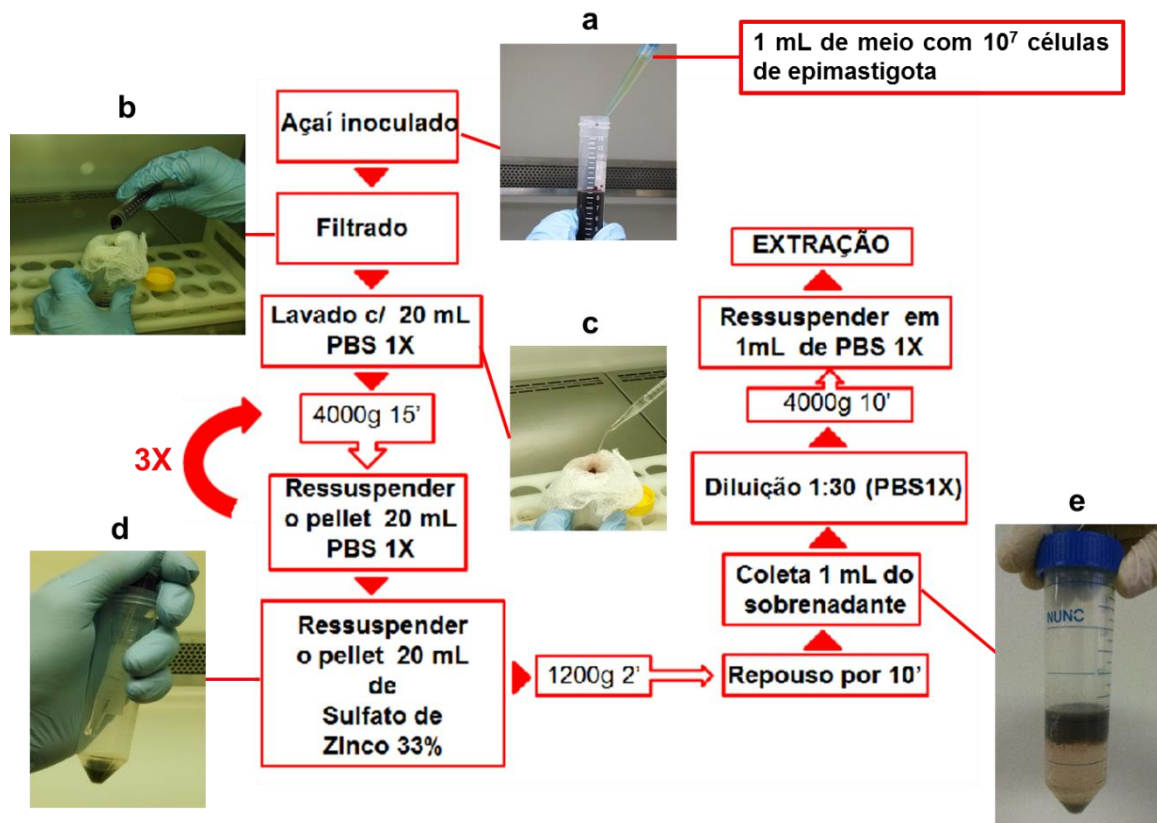


Figura 13: Etapas do Método de flutuação em Sulfato de Zinco (a) Adição de 10^7 células (10^7 / mL) de *T. cruzi* sendo inoculado em 9 mL de açai; (b) O açai inoculado sendo filtrado em gaze; (c) Lavagem da gaze com PBS 1X; (d) *pellet* formado após a lavagem com PBS 1X; (e) Coleta de 1 mL do sobrenadante da amostra em Sulfato de Zinco.

3.8-PCR em tempo Real

As reações de amplificação foram realizadas com o aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). Cada reação contendo: 250 nM de cada primer (Tabela 1), 5 μ L de Fast SYBR® Green Master Mix, 2,5 μ L de DNA (4ng/ μ L) e H₂O q.s.p 10 μ L.

Após a desnaturação inicial a 95°C por 20 seg, as amplificações foram realizadas por 40 ciclos de 95°C por 3 seg, seguidos por 60°C por 30 seg. Para confirmar a especificidade das amplificações, os produtos de PCR foram submetidos à análise de dissociação (*melting curve*).

Os experimentos conduzidos em PCR em tempo real objetivaram testar a sensibilidade dos primers utilizados, comparativamente ao método de PCR convencional de detecção de *T. cruzi* em açai, assim como, verificar os limites

mínimos de detecção. As reações foram realizadas em triplicata técnica e biológica para os genes analisados.

Tabela 2: Primers utilizados para a amplificação do DNA dos experimentos em qPCR

Primer	Característica	Sequência (5'-3')	Tamanho	Tm
PR 315	TCZ1 <i>T.cruzi</i> - DNA nuclear	CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT	24	80
PR 316	TCZ2 <i>T.cruzi</i> - DNA nuclear	CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG	24	76
PR 434	Tc rDNA 28S α 5'	AAGGTGCGTCGACAGTGTG	19	60
PR 435	Tc rDNA 28S α 3'	TTTTCAGAATGGCCGAACAGT	21	60
PR 528	PR açai 1	CGAAAGAGGTTAGAGACGGC	20	58
PR 529	PR açai 1	GAAATCTCATTTCGTA CTCATAAC	23	62

4-RESULTADOS

4.1-Teste de avaliação da especificidade dos primers na detecção do *Trypanosoma cruzi*.

Três pares de Primers foram escolhidos para serem usados neste trabalho TCZ, rDNA 28S α e Mini-exon. Para a avaliação da especificidade desses primers foram realizadas PCRs com 10ng de DNA de 4 diferentes espécies de parasitas: *Crithidia fasciculata*, *Phytomonas serpens*, *Trypanosoma rangeli* e *T. cruzi*, pertencentes ao grupo dos Cinetoplastídeos; sendo que para o *T. cruzi*, 3 cepas foram usadas; CL Brener, G e Y. Na Figura 15-A são apresentados os resultados das reações de PCR para testar a especificidade dos primers utilizados para detecção do DNA de *T. cruzi*. Utilizou-se DNA genômico de diferentes espécies de tripanossomatídeos. As PCRs com primers para a região TCZ amplificaram o DNA de *Crithidia fasciculata*, *Phytomonas serpens* e as três cepas de *T. cruzi*, mas não de *T. rangeli*. Todos amplicons tiveram o mesmo tamanho em torno de 188 pb. Na Figura 15-B são apresentados os resultados para a PCR com os primers para a região ribossomal rDNA 28S α , na qual pode-se observar que não houve amplificação com DNA de *C. fasciculata* e *T. rangeli*. Com estes primers foi possível diferenciar as cepas de *T. cruzi* do grupo II (Brener e Y) com amplicons em torno de 110 pb, de cepas do grupo I (G), cujo amplicom possui cerca de 125 pb. Na Figura 15-C estão apresentados os resultados obtidos com a utilização dos primers para a região de mini-exon, na qual pode-se observar que houve amplificação de DNA de todas as espécies de tripanossomatídeos utilizados. Com os primers para mini-exon também foi possível diferenciar entre cepas do grupo I (350 pb) do grupo II (300 pb) de *T. cruzi*.

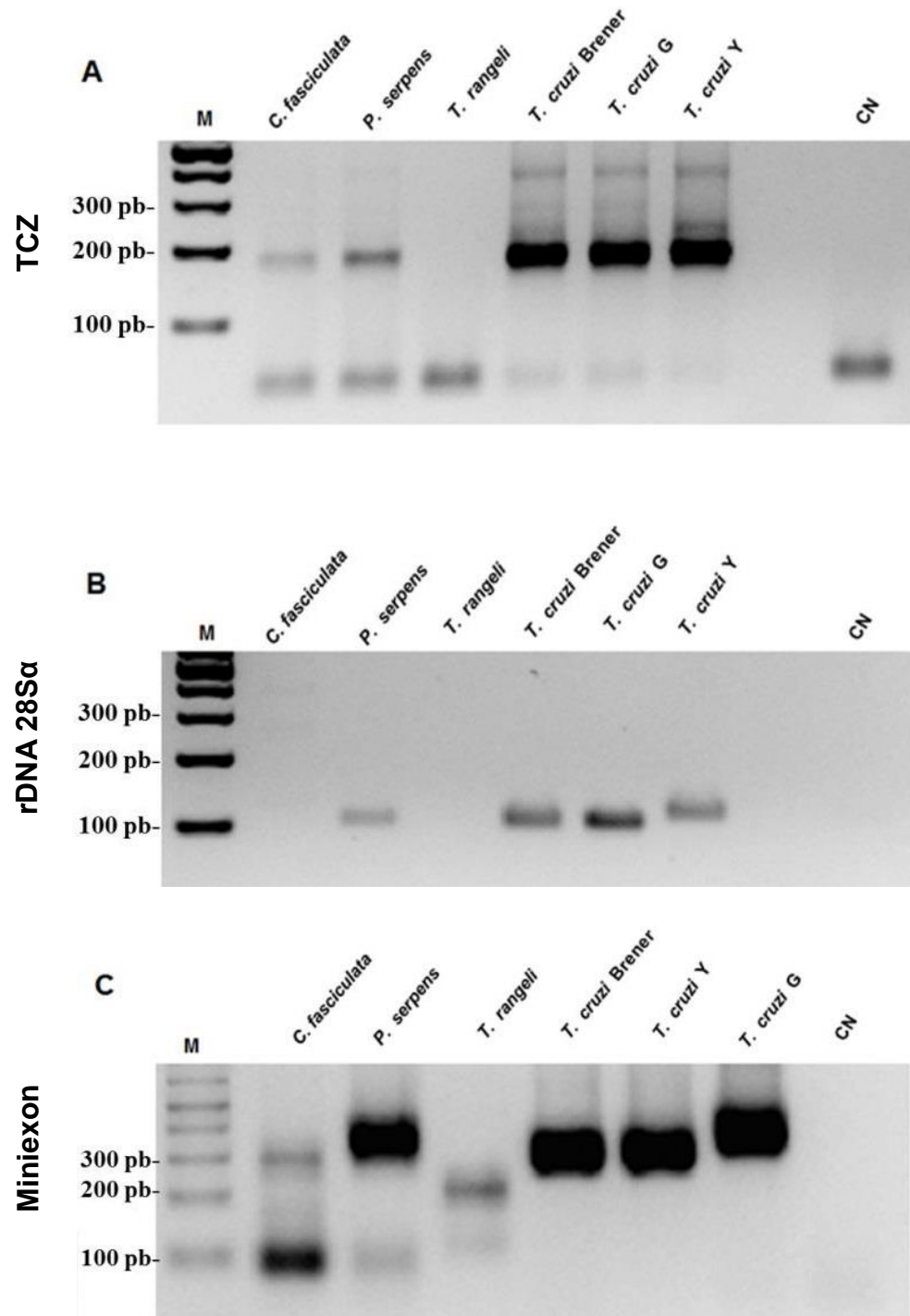


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose (2% em SB) do produto da amplificação por PCR para avaliar a especificidade dos primers. (A) TCZ, (B) rDNA 28S α e (C) Miniexon. (M) Marcador molecular e (CN) Controle negativo.

4.2-Padronização dos primers para *açai* e teste de especificidade

Para os testes com os primers desenhados para *açai* foram utilizados 10 ng de DNA de *açai* nas reações de PCR. A extração do DNA de *açai* foi obtido pelo método adaptado de Ausubel et al.(1988). Os resultados dos experimentos com os primers para *açai* foram específicos para o DNA de *açai* e apresentaram os tamanhos das bandas esperadas (Figura 16-A e B). Foi possível observar que o par de primers PR *açai* 1, para amplificar o gene de proteína ribossomal S16 de *Euterpe oleracea*, mostrou uma maior intensidade em relação aos outros primers PR *açai* 2 e PR *açai* 3 (Figura 16-A). O teste da reação cruzada foi negativo para os primers PR *açai* 1 testados, que pode ser verificado pela não amplificação do DNA de *T. cruzi* (Figura 16-B).

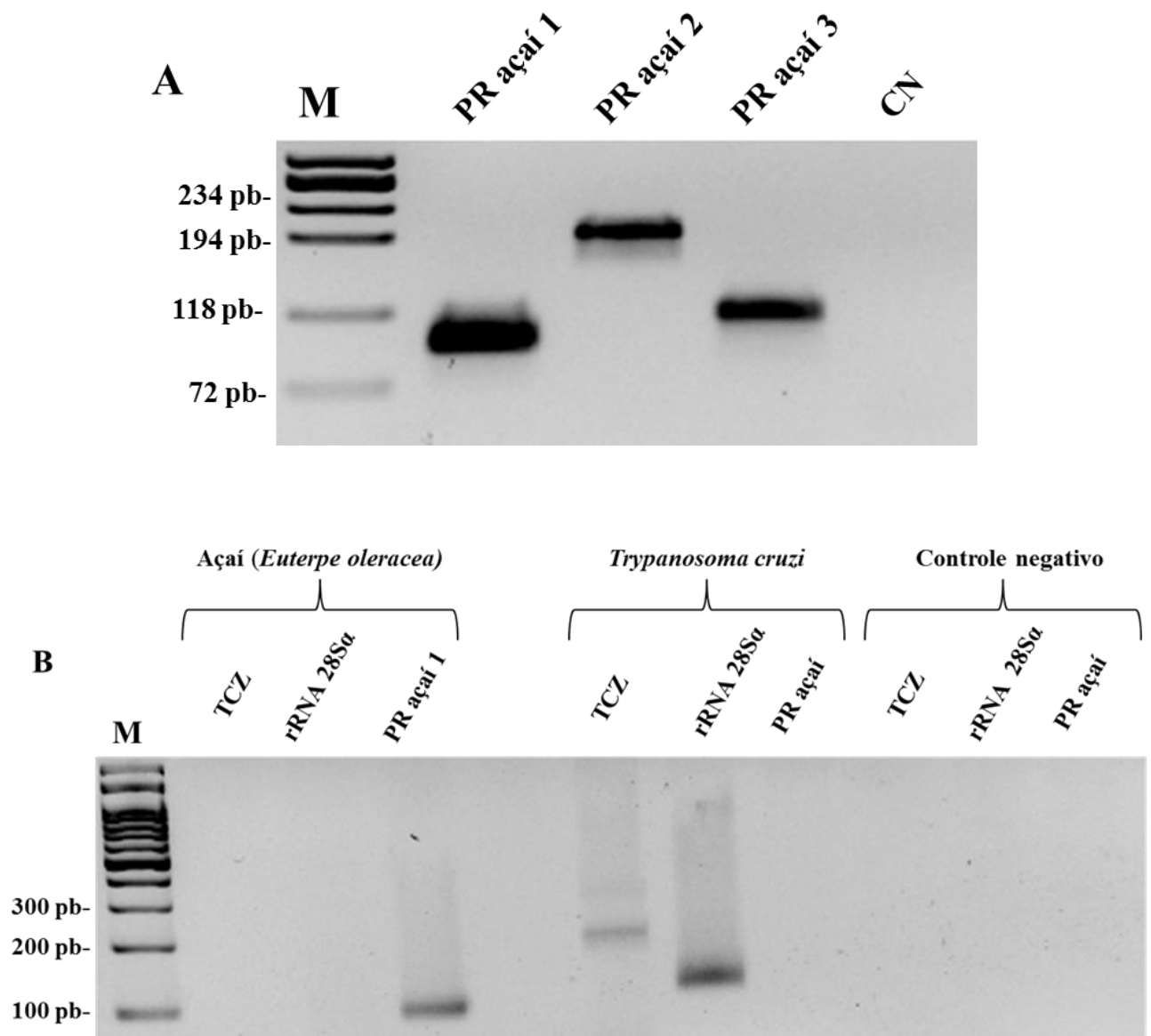


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose (2% em SB) do produto da amplificação da padronização dos primers para genes de açai e do teste da reação cruzada: (A) o resultado dos três pares de primers desenhados para amplificar DNA de açai (*Euterpe oleracea*). (B) Experimentos para verificar se há reação cruzada entre os primers que amplificam DNA de açai (*Euterpe oleracea*) e *T. cruzi*; (M) Marcador molecular.

4.3-Teste de sensibilidade dos primers TCZ e rDNA 28S α

Para determinar a sensibilidade e os limites mínimos de detecção (amplificação) do DNA de *T. cruzi* por PCR, foram utilizadas diferentes quantidades de DNA genômico, isolado da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Foi possível observar que os primers TCZ (Figura 17-A) propiciaram uma maior sensibilidade comparado com os primers para rDNA 28S α (Figura 17-B). Com os primers TCZ foram amplificadas amostras contendo uma quantidade mínima de DNA de 20 fg, enquanto os primers para rDNA 28S α não amplificaram amostras abaixo de 20 pg de DNA por reação de PCR.

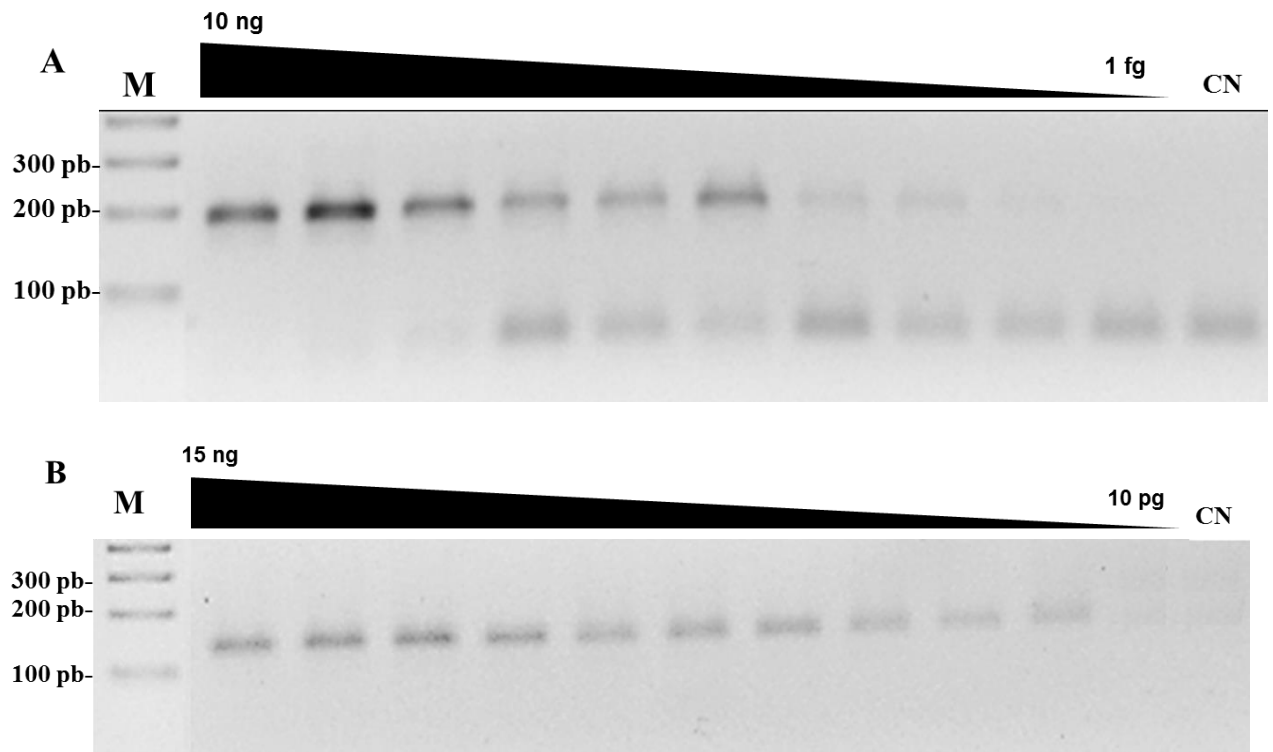
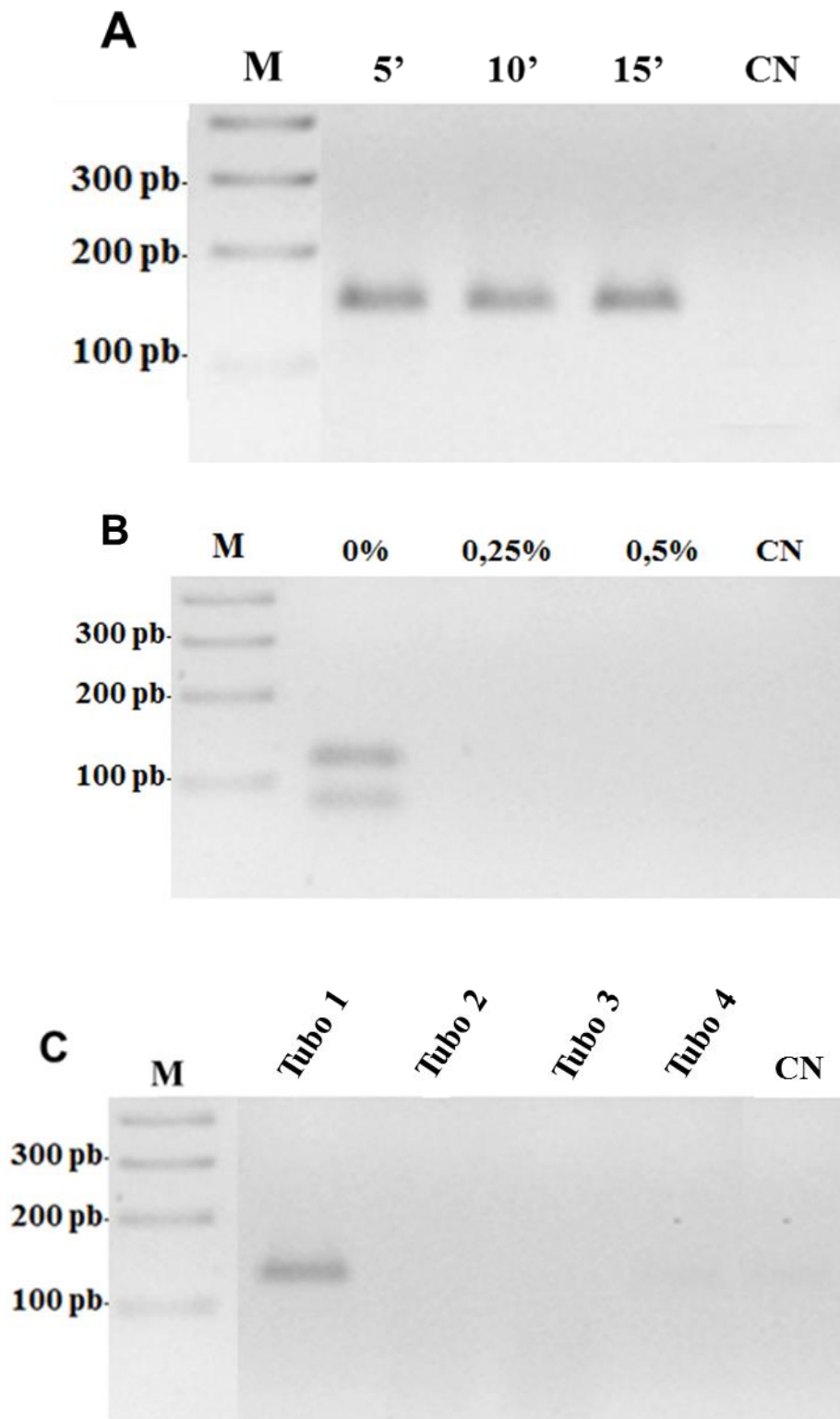


Figura 16: Teste de sensibilidade dos primers TCZ e rDNA 28S α : As amostras abaixo do retângulo correspondem às diluições seriadas de DNA de *T. cruzi* por reação. (A) produtos da amplificação pelos primers TCZ: 10ng; 2ng; 0,4ng; 80 pg; 16 pg; 3 pg; 0,6 pg; 0,1 pg; 20 fg; 5 fg; 1 fg; (B) produtos da amplificação pelos primers rDNA 28S α : 15 ng; 7,5 ng ; 3,75 ng ; 1,87 ng; 0,93 ng; 0,4 ng; 0,2 ng; 0,11 ng; 50 pg; 20 pg; 10 pg; (CN) controle negativo.

4.4 - Avaliações preliminares da detecção direta de *T. cruzi* e da inibição da reação de PCR pela polpa de açaí

Após a padronização dos primers para detecção de DNA de *T. cruzi* e a sensibilidade dos diferentes pares de primers estabelecida, foram realizados testes preliminares para verificar se é possível colocar amostra de açaí contaminada direto na reação de PCR. Foram feitos testes para avaliar a lise das células de *T. cruzi* por aquecimento; a lise destas células por aquecimento com detergente e da possível inibição da PCR por componentes presentes no açaí. Para avaliar a inibição da PCR pelo açaí, foram preparadas amostras em que se variava o volume de polpa de Açaí adicionada a 5µL de DNA (1ng/µL) de *T. cruzi*, para um volume final de 10 µL de amostra, conforme a Figura 13. A PCR foi realizada para primers que amplificam o gene rDNA 28Sα. E após estes testes, o DNA de um mL de polpa de açaí inoculado com *T. cruzi*, extraído pelo método de Ausubel et al.,(1988),foi utilizado na reação de PCR. Na Figura 18-A pode-se observar que amostras de DNA obtidas da lise de células *T. cruzi* por aquecimento resultaram na amplificação de fragmento de DNA por PCR. Na Figura 18-B também está demonstrado que a lise utilizando-se SDS não resultou amplificação de nenhum fragmento correspondente à amplificação de DNA de *T. cruzi* por PCR. Na Figura 18-C está demonstrado que a simples adição da fração líquida da polpa de açaí é suficiente para inibir as reações de PCR.

Na extração do DNA da amostra de açaí contaminada com epimastigotas de *T. cruzi* verificou-se que não havia amplificação de nenhum fragmento de DNA por PCR (Figura 18-D). Este fato sugeria que algum composto presente na polpa de açaí estaria interferindo nas reações de PCR (Figura 18-C e D).



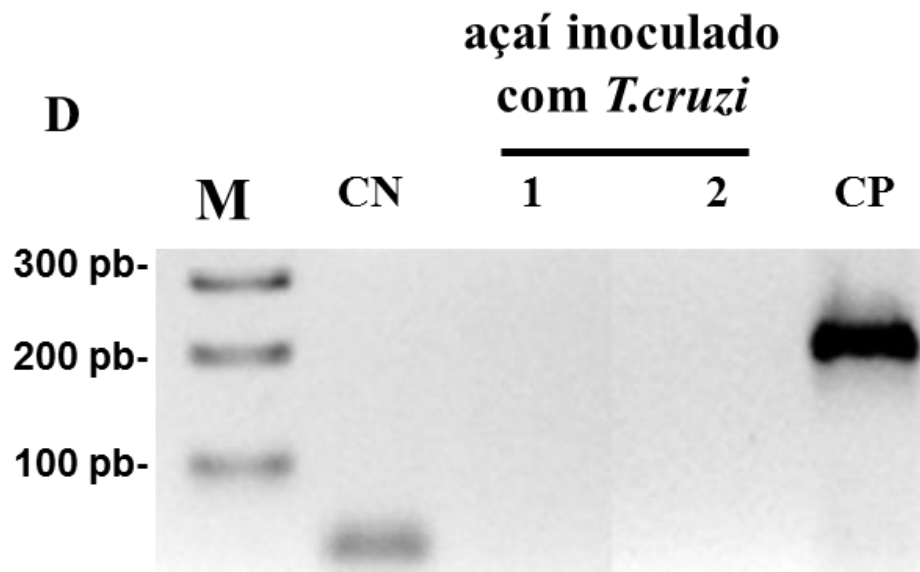


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 2% dos testes de detecção do DNA de *T. cruzi* em polpa de açai: (A) PCR de amostras de polpa de açai contendo *T. cruzi* e submetidas ao aquecimento em bloco seco a 100 °C. (B) PCR de amostras de polpa de açai contendo *T. cruzi* e submetidas à lise com detergente (Dodecil Sulfato de Sódio-SDS). (C) Teste da inibição da reação de PCR pelo aumento do volume da polpa de açai na reação; (D) Avaliação da extração do DNA da polpa de açai inoculado com *T.cruzi* sem a flutuação em sulfato de zinco (M) Marcador molecular e (CN) Controle Negativo.

4.5-Padronização de método para isolamento e concentração de células de *T. cruzi* em polpa de açai

Como demonstrado anteriormente a lise direta das células de *T. cruzi* presentes em polpa de açai, por aquecimento ou mesmo por lise com detergente, não possibilitou a amplificação do DNA do parasito por PCR. Tentou-se também a purificação do DNA diretamente das amostras de açai contendo células de *T. cruzi* pelo método de purificação de DNA descrito por Ausubel e colaboradores (1988). Estas tentativas não resultaram em nenhuma detecção do DNA de *T. cruzi* com diferentes pares de primers.

Com o intuito de purificar e concentrar as células de *T. cruzi*, para eliminar a interferência da polpa de açai nas reações de PCR, o método de isolamento de protozoários por gradiente em sulfato de zinco foi adaptado.

Pela Figura 19, é possível observar que com o método de flutuação em Sulfato de Zinco foi capaz de detectar o *T. cruzi* da polpa de açaí. Foi observada amplificação em amostras contendo 0,17 células de tripomastigotas de *T. cruzi* inicialmente inoculadas em 10 mL de polpa de açaí com o primer TCZ (Figura 19-A). Contudo para os primers rDNA 28S α (Figura 18-B) o mínimo detectado foi de 10^4 células em 1 mL de polpa de açaí.

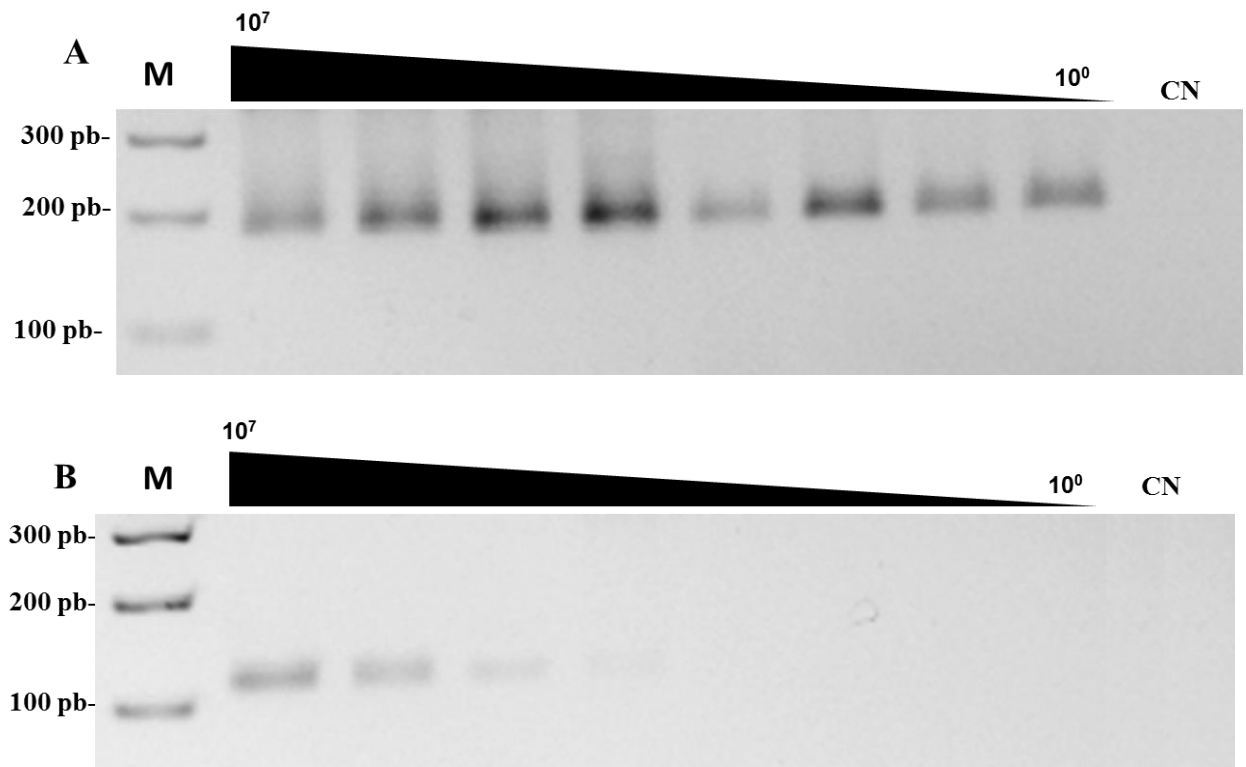


Figura 18: Detecção de *T. cruzi* por PCR após isolamento pelo Método de flutuação em Sulfato de Zinco: (A) Amostras detectadas com primers TCZ (B) Amostras detectadas pelos primers rDNA28S α . Amostras no retângulo correspondem ao decréscimo no número de células de tripomastigotas de *T. cruzi* inoculadas em 10 mL de Açaí: $1,7 \times 10^7$ (10^6 /mL); $1,7 \times 10^6$ (10^5 /mL); $1,7 \times 10^5$ (10^4 /mL); $1,7 \times 10^4$ (10^3 /mL); $1,7 \times 10^3$ (10^2 /mL); $1,7 \times 10^2$ (10^1 /mL); $1,7 \times 10^1$ (10^0 /mL); $1,7 \times 10^0$ (10^{-1} /mL); (M) Marcador molecular; (CN) controle negativo.

4.6-Teste final dos protocolos de isolamento e identificação de *T. cruzi* em polpa de açaí

Após a padronização dos métodos de isolamento de células de *T. cruzi* (epimastigotas e tripomastigotas) a partir da polpa de açaí por flutuação em sulfato de zinco; a amostra ficou livre de interferentes na extração do DNA genômico, e de inibidores da reação de PCR presentes na polpa de açaí. Para confirmar a

reprodutibilidade dos protocolos padronizados, foram realizadas amplificações por PCR utilizando-se todos os primers padronizados. Para este fim, uma amostra de 10 mL de açaí inoculada com $1,5 \times 10^6$ células de tripomastigota de *T. cruzi* foi utilizada. A Figura 20 mostra a eletroforese com o resultado da amplificação da amostra. É possível observar que é possível detectar o DNA de *T. cruzi* e do açaí o que demonstra a especificidade do método.

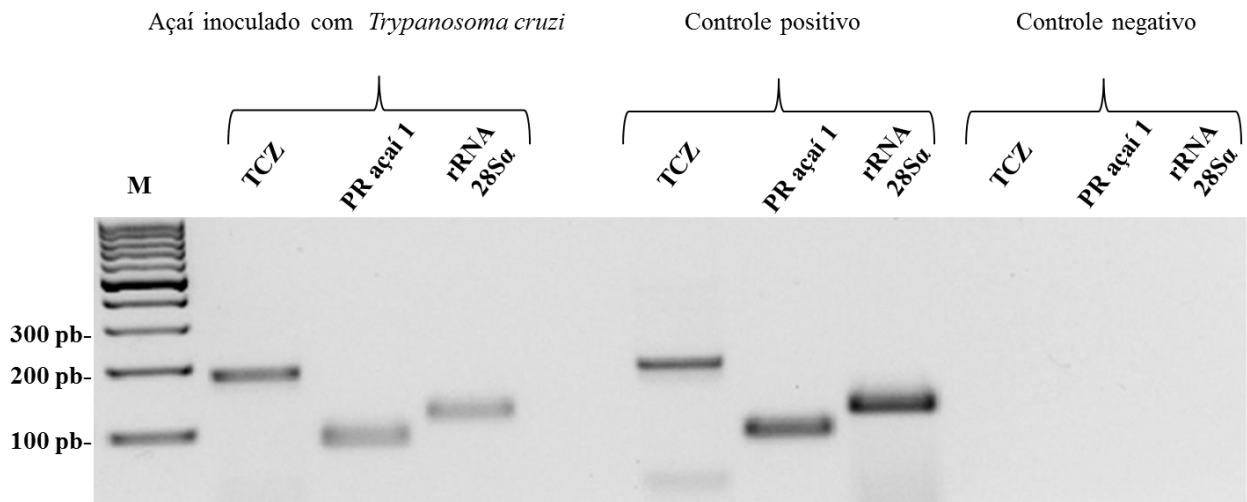


Figura 19: Eletroforese da avaliação dos conjuntos de Primers validados (TCZ, PR açai 1, rDNA 28S α) na detecção de *T. cruzi* em Açai. As amostras de açai foram inoculadas com células de *T. cruzi* e estas foram recuperadas por flutuação em Sulfato de Zinco e em seguida submetidas ao protocolo de extração de DNA genômico e reações de PCR. (M) Marcador molecular. O controle positivo consistiu em. No controle negativo foi utilizada água no lugar do DNA molde.

4.7-PCR em tempo Real

Nas Figuras 21 e 22, referem-se à padronização da PCR em tempo real para a detecção do DNA de *T. cruzi* com os Primers rDNA 28S α . As curvas foram obtidas por diluição seriada do DNA de *T. cruzi* (400 pg; 40 pg; 4 pg; 400 fg; 40 fg; 4 fg; 0,4 fg). A escala log de amplificação (eixo y) é interceptada pela linha do Threshold (0,025228), valor determinado pelo programa do aparelho de qPCR. As sete primeiras curvas da esquerda para a direita na Figura 21 correspondem às diluições de DNA genômico e a última curva a direita é o controle negativo (amostra sem DNA molde).

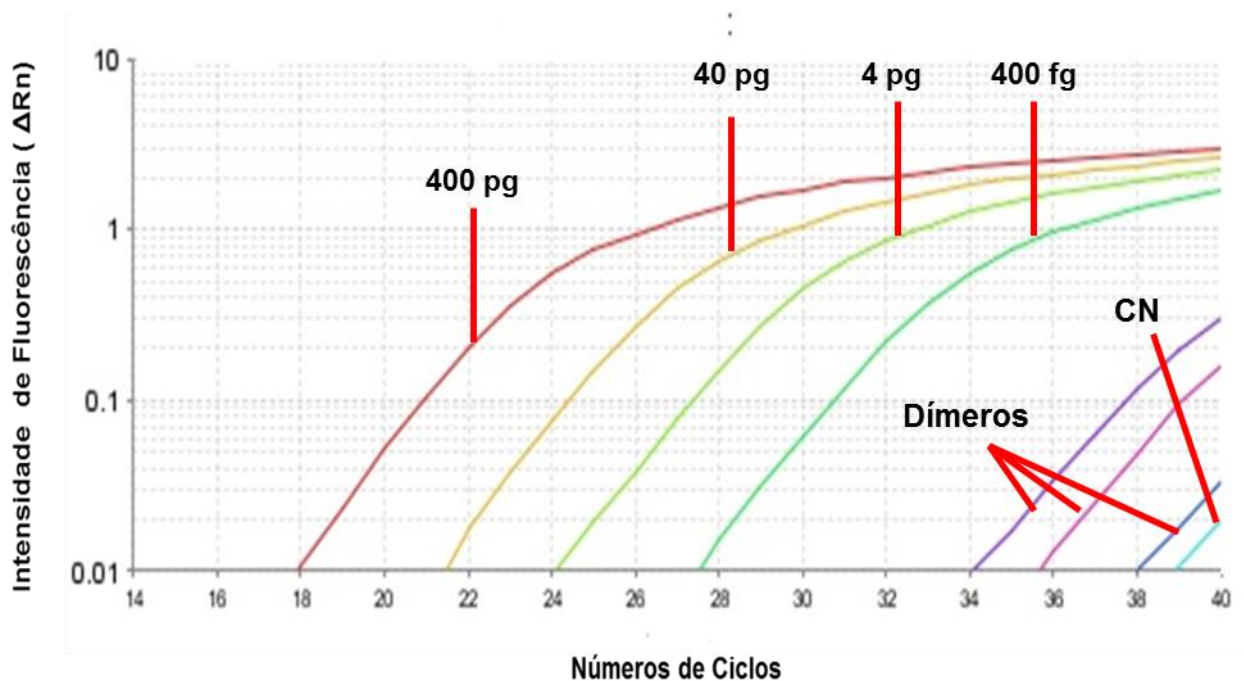


Figura 20: Curva da quantificação da PCR em tempo real das diluições seriadas de DNA de *T. cruzi* com primers rDNA 28S α , limite de fluorescência de 0,025228. As sete primeiras curvas são referentes às seguintes quantidades de DNA genômico: 400 pg; 40 pg; 4 pg; 400 fg; 40 fg; 4 fg; 0,4 fg. A última curva da direita corresponde ao controle negativo (CN) sem DNA molde.

Na Figura 22 pode-se observar que apenas as 4 primeiras diluições geraram o fragmento de DNA esperado, enquanto as 3 últimas representam fluorescência proveniente de amplificação inespecífica, provavelmente devido à formação de dímeros de primers, com tamanhos menores do que o fragmento específico. Ainda na figura 22 é destacado pela curva de dissociação que a temperatura de dissociação do fragmento específico foi de 79,34 °C. O limite de detecção foi de 400 fg de DNA no Ct 28,7, correspondente à menor concentração de DNA gerou um produto (fragmento) específico.

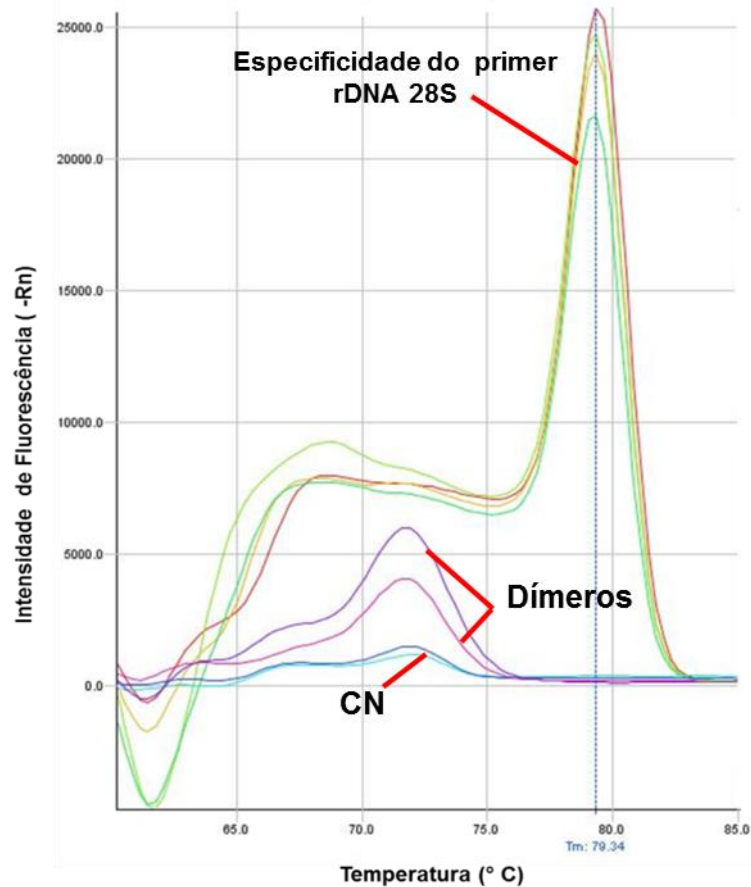


Figura 21: Curva de dissociação da diluição seriada utilizando os primers rDNA28S α . A temperatura de dissociação dos fragmentos específicos foi de 79,34°C. (CN) controle negativo.

A Figura 23 mostra os resultados das reações cruzadas entre os primers rDNA 28S α , utilizando-se DNA molde de açaí, assim como, os primers para amplificar DNA de açaí (PR açaí 1) com DNA molde de *T.cruzi*. Somente os controles positivos para os primers foram detectados, como mostrado nas curvas de amplificação. As duas curvas vermelhas a esquerda representam as amplificações do DNA de *T. cruzi* com os primers para *T. cruzi*, as duas curvas em amarelo correspondem às amplificações do DNA de açaí com primers para açaí. As quatro curvas a direita são, respectivamente as curvas de DNA de *T. cruzi* com primers para açaí e DNA de açaí com primers para *T. cruzi*. Na Figura 24 estão destacadas as curvas de dissociação para os primers de *T. cruzi* com DNA de *T. cruzi* (78,45 °C) e para os primers de açaí com DNA de açaí (72,34 °C).

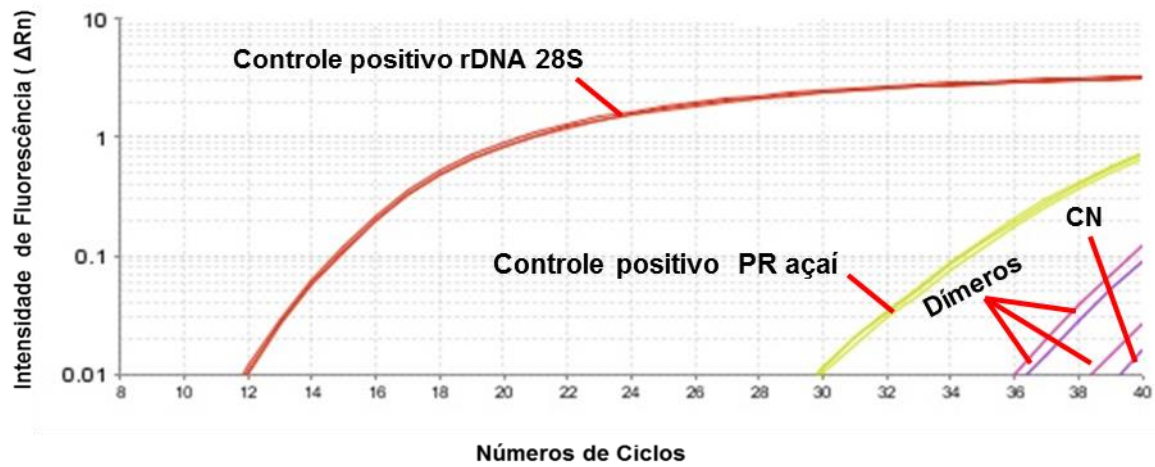


Figura 22: Avaliação das reações cruzadas para os rDNA 28S α e primers PR açai1. Foram utilizadas 10 ng de DNA de *T.cruzi* e DNA de açai no sistema. A última curva da direita corresponde ao controle negativo (CN) sem DNA molde.

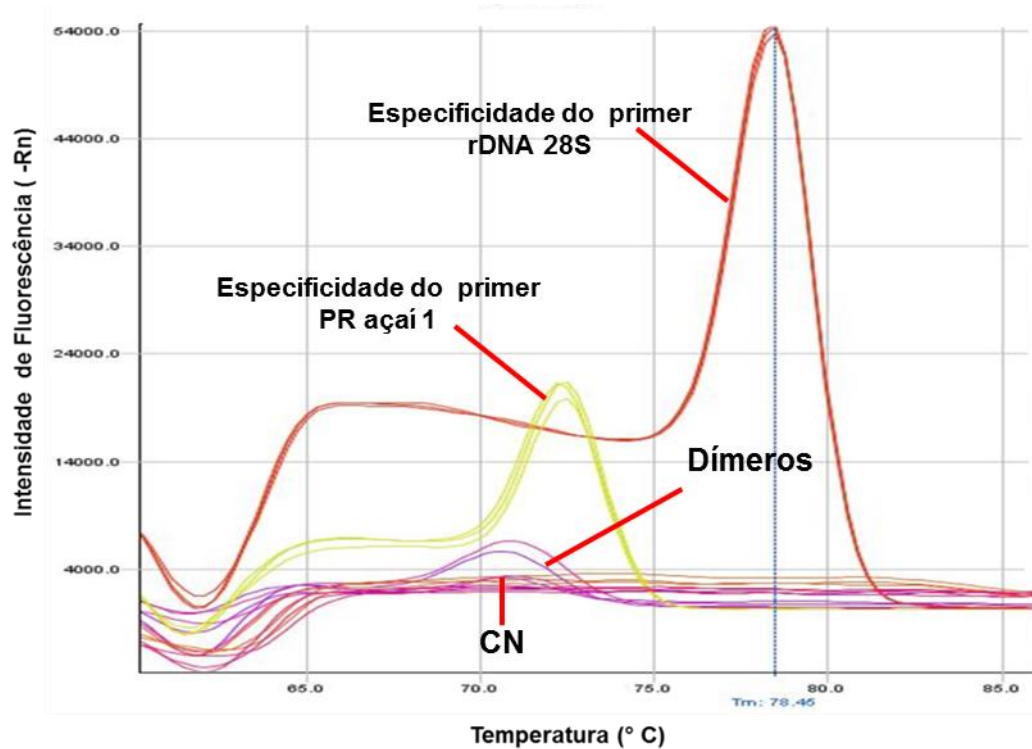


Figura 23: Curvas de dissociação para avaliar as reações cruzadas dos primers rDNA 28S α (T_m 79,35) e primers PR açai 1 (T_m 72,34). (CN) controle negativo.

Amostras de Açaí inoculadas com *T. cruzi* foram testadas com a PCR em tempo real com os primers rDNA 28S α , o número de *T.cruzi* inoculados nas amostras de Açaí foram: 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 ; 10^0 parasitos por mL respectivamente (Figura 25). Um controle positivo com DNA de *T.cruzi* foi utilizado. Nas curvas de amplificação foram detectadas as amostras inoculadas com 10^5 e 10^4 parasitos, enquanto as amostras com quantidades menores de parasitos ficaram abaixo do limiar (Threshold= 0,052972). A Figura 26 mostra a curva de dissociação (Tm 79,35)

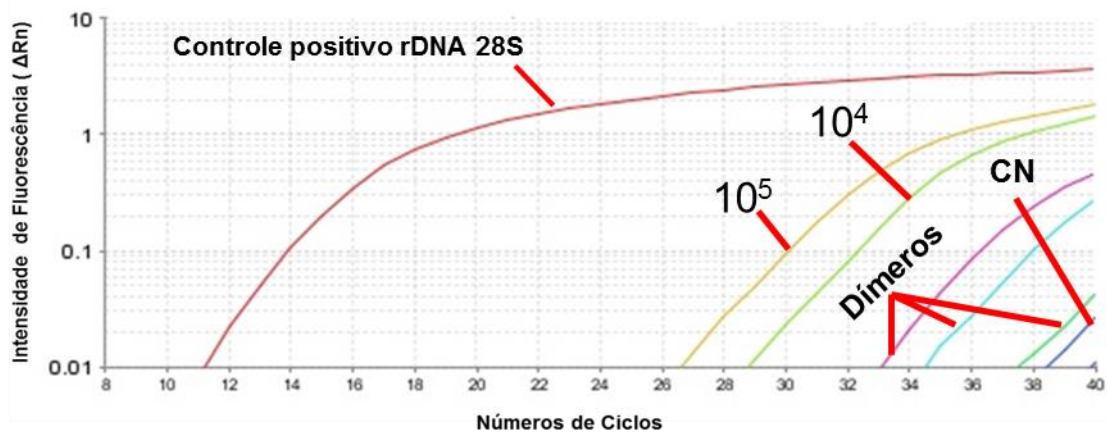


Figura 24: Curvas de quantificação de DNA de *T. cruzi* em amostras de açaí. A PCR em tempo real foi realizada com os primers rDNA 28S α . A curva. A primeira curva a esquerda representa a amplificação do controle positivo (DNA genômico de *T. cruzi*), as outras seis curvas correspondem a amostras de açaí que foram inoculadas com diferentes quantidades de tripomastigotas (10^5 a 10^0 por mL de polpa de açaí). A oitava curva corresponde ao controle negativo sem DNA. A última curva da direita corresponde ao controle negativo (CN) sem DNA molde.

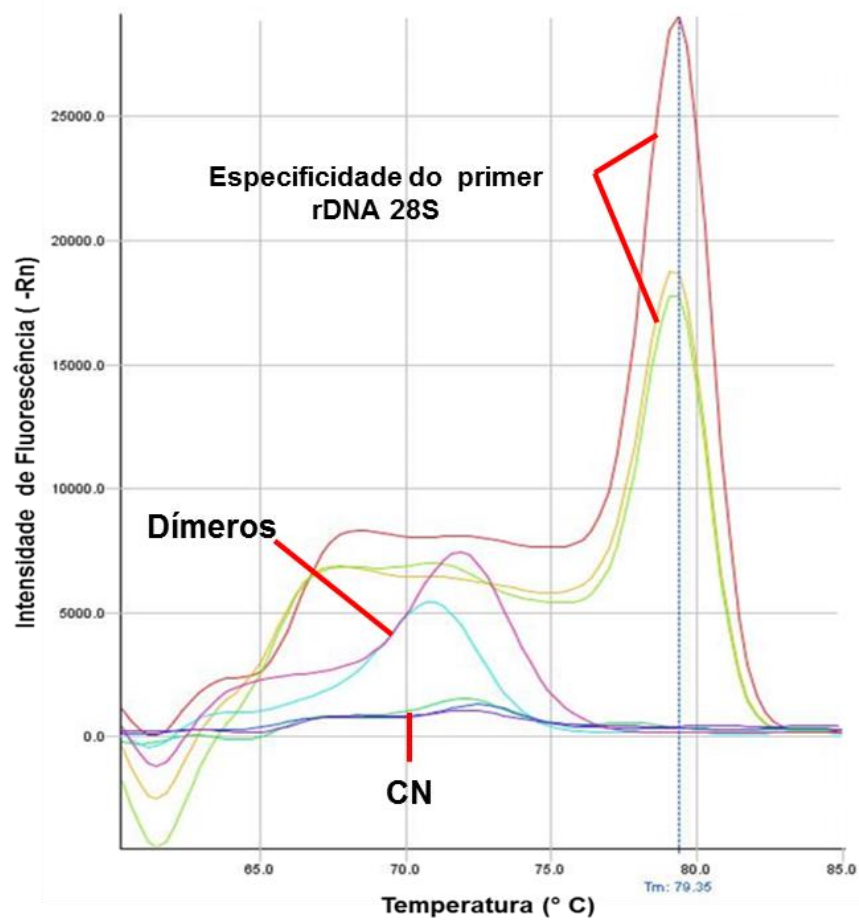


Figura 25: Curva de dissociação da reação de detecção de *T. cruzi* inoculados em Açaí mostrando a temperatura de melting de 79,35 °C para os primers rDNA 28S. (CN) controle negativo.

4-DISCUSSÃO

A transmissão por via oral da Doença de Chagas tem aumentado nos últimos anos; ainda não se conhece, precisamente, em qual etapa do processo da coleta ou produção ou preparo da polpa de açaí ocorra à contaminação. A principal hipótese é que durante a coleta do fruto sem maiores cuidados, as ninfas que são os imaturos das espécies de Triatomíneos sejam acidentalmente moídas no preparo. Outro fator a ser abordado são as estimativas de transmissão subestimadas pela falta de um diagnóstico preciso de contaminação por via oral (DIAS et al.,2006). Ferramentas para a pesquisa de contaminação do açaí, como a apresentada pelo presente trabalho, podem auxiliar na detecção da contaminação por via oral, que muitas vezes só é aceita depois de descartada a transmissão pelos mecanismos tradicionais (TOSO et al.,2011).

Neste trabalho desenvolvemos uma metodologia molecular sensível para a detecção do *T. cruzi* em polpa de açaí, e a padronizamos em um protocolo simples que poderá ser aplicado na detecção de contaminações de derivados desta fruta. Selecionamos três conjuntos de primers: TCZ que amplifica regiões repetitivas no DNA nuclear, rDNA 28S que amplifica regiões ribossomais e Miniexon que amplifica o espaçador intergênico do gene.

Avaliamos a especificidade e sensibilidade das reações por PCRs qualitativa utilizando o DNA de diferentes espécies de tripanosomatídeos (Figura 15). Todos os conjuntos de primers testados foram sensíveis, mas alguns não foram específicos somente para *T. cruzi*. O primer Miniexon amplificou todas as amostras de DNA das espécies analisadas, enquanto que o TCZ só não amplificou *T. rangeli*. Por outro lado o primer ribossomal rDNA 28S detectou *Phytomonas serpens* e as três cepas de *T.cruzi*. Isso se deve muito a similaridade entre *Phytomonas serpens* e outros tripanosomatídeos

(SERRANO et al., 1999; SANTOS et al.,2007 e JANKEVICIUS et al., 1989). *Phytomonas* é um gênero de protozoários com ampla distribuição geográfica e que infecta uma grande variedade de plantas de importância econômica como caju, café, coco, tomate, laranja e palmeiras. *Phytomonas* podem ser transmitidas por diversas

famílias de insetos fitófagos (SANTOS *et al* 2007). Deste modo, é possível que se encontrem amostras de açaí que sejam infectados com *Phytomonas serpens*. Assim, em uma análise por PCR com o primer ribossomal rDNA 28S de uma amostra suspeita de açaí contaminado com *T. cruzi*, o cruzamento dos dados sintomatológico do paciente com o resultado molecular da amostra de açaí, poderão ser usados para concluir a infecção por via oral. Contudo, é possível fazer a distinção das espécies *T. cruzi* e *Phytomonas serpens*. SERRANO e colaboradores (1999) descreveram um método que utiliza sequências “Spliced-Leader” para diferenciar *Phytomonas* de outros tripanosomatídeos. Atualmente estamos buscando regiões gênicas que possibilitem a diferenciação entre *Phytomonas* e *T. cruzi* por reações simples de PCR, sem a necessidade de se utilizar hibridizações com sondas de oligonucleotídeos

Por esta razão escolhemos os primers TCZ e ribossomal rDNA 28S para os testes de sensibilidade por PCR convencional. TCZ foi capaz de detectar 20 fg de DNA, o equivalente a 1/10 de parasito de *T. cruzi* (DUFFY *et al.*, 2009), enquanto que o primer rDNA 28S α detectou o equivalente a 100 parasitos no teste de sensibilidade (Figura 17) após a análise desses dados passamos a inocular quantidades variáveis de *T. cruzi* em um volume fixo de polpa de açaí e em seguida tentamos detectá-los por técnicas moleculares.

Durante o desenvolvimento da metodologia tentamos a extração de DNA direta do açaí inoculado com *T. cruzi* pelo por métodos de lise com aquecimento e com detergentes, mas não obtivemos nenhuma amplificação por PCR ao final da extração. As amostras apresentaram uma coloração arroxeada, ainda com resquício do açaí, que de certa maneira pode ter interferido na reação. A partir destes resultados buscamos uma alternativa de isolar o *T. cruzi* da polpa de açaí.

Um método bastante utilizado para detectar estruturas de parasitas em solução é a flutuação em Sulfato de Zinco de FAUST *et al.* (1938). Ela consiste na flutuação de corpos com densidade menores que a densidade do sulfato de Zinco (1200g. cm⁻³). TITTO *et al.*, 1981 em seus experimentos determinou a densidade do *T. cruzi* em cerca de 1,05g.cm⁻³.

Após os testes de recuperação do *T. cruzi*, a técnica de flutuação se mostrou bastante eficaz no isolamento do *T. cruzi* da amostra de açaí o que pode ser

verificado nas FIGURAS 18 e 19. A flutuação em sulfato de Zinco é muito utilizada na detecção de infecções parasitárias gastrointestinais (DANTAS et al., 2007). É uma técnica sensível na detecção de estruturas leves e pesadas de parasitas. Associado à essa técnica, foi possível do DNA das células de epimastigotas inoculadas em açai por PCR.

Depois das análises com PCR qualitativa, passamos a testar as amostras em PCR em tempo real. Houve uma melhora na sensibilidade de detecção do primer rDNA 28S α que foi de 400 fg isso representa ser 50 vezes mais sensível que o resultado apresentado pela PCR convencional para o mesmo primer. O primer rDNA 28S α usado para *T. cruzi* e o primer desenhado para amplificar o DNA de açai, PR açai 1 foram específicos, não sendo observado a reação cruzada, tanto na qPCR como na qualitativa (Figuras 15, 22 e 24). Os primers TCZ se mostraram mais sensíveis e específicos do que os primers rDNA 28S em PCRs convencionais detectando 20 fg de DNA de *T. cruzi*. No entanto, na PCR quantitativa os primers TCZ formaram dímeros e não foi possível adaptar a PCR quantitativa para utilização dos mesmos na detecção de *T. cruzi*.

No teste de detecção de células de *T. cruzi* em açai por qPCR foram amplificadas amostras com até 10^3 parasitos por mL de amostra, sendo 10^4 parasitos por mL de amostra o limite de detecção para a PCR convencional, um aumento de sensibilidade de 10 vezes. Mesmo com este aumento de sensibilidade o método mais sensível que encontramos ainda foi a PCR convencional com os primers TCZ, a qual amplificou amostras de açai contaminadas com até 0,17 células de *T. cruzi* por mL de amostra.

DIAS, 2006 relatou em seu trabalho que, experimentos conduzidos com cobaias, mostraram que entre 10^4 a 10^5 parasitos introduzidos por via oral são suficientes para desencadear a infecção por esta via. Em nossa pesquisa conseguimos detectar estas quantidades.

A metodologia apresentada nesse trabalho poderá ser aplicada tanto em análise da qualidade do açai produzido artesanalmente, como para confirmação de surtos de DC por via oral caso tenha o material preservado (Figura 27). O resultado inicial da análise do açai contaminado poderá ser apresentado em até 6 horas, em caso de testes confirmatórios de PCR para distinção entre *T. cruzi* e *Phytomonas*

serão necessárias mais 3 horas, totalizando 9 horas. Esta abordagem possibilitará celeridade às sanções administrativas ou aos tratamentos dispensados aos pacientes.

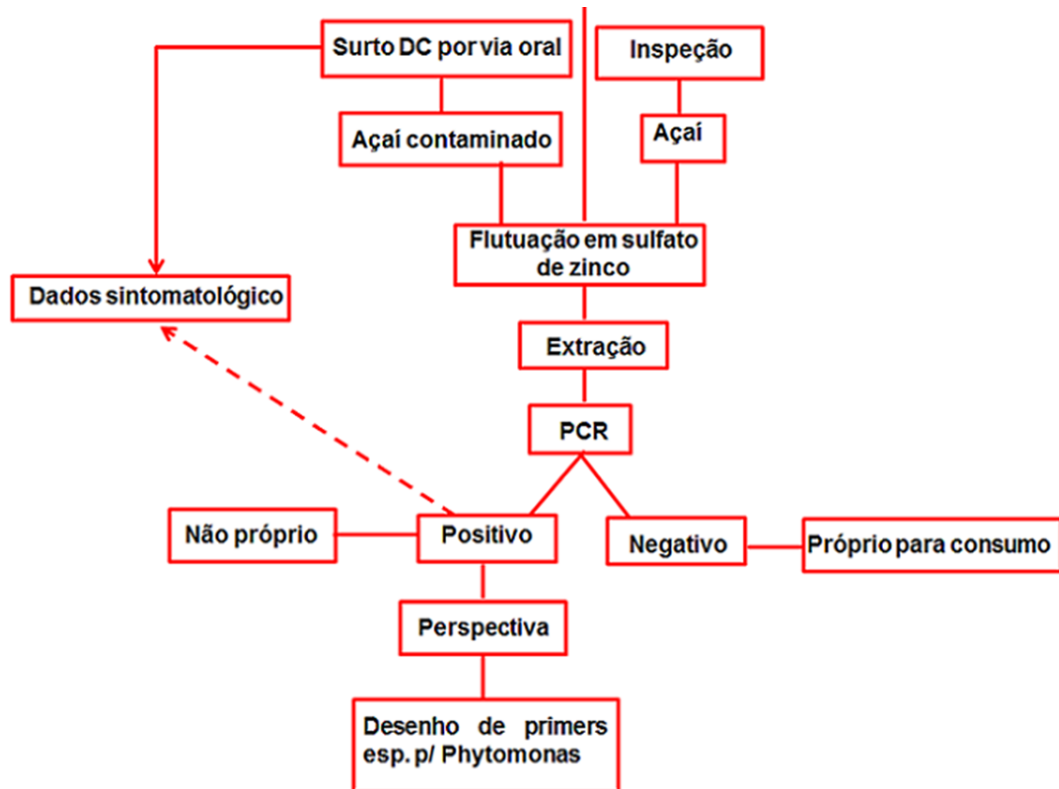


Figura 26: Esquema ilustrando a aplicabilidade do método e as perspectivas que serão tomadas para a continuidade deste estudo.

Na região amazônica, têm sido registrados muitos casos de DC em forma de surto. Isso se dá quando um grupo de pessoas reunidas em um mesmo lugar que, ao ingerirem um mesmo tipo de alimento, adoecem quase que simultaneamente (FERREIRA et al., 2014). Em 2015, foram confirmados 12 casos de doença de chagas no município de Carauari, a 789 km de Manaus, é o segundo caso de surto na cidade (<http://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/2015/01/com-12-casos-municipio-no-am-registra-surto-de-doenca-de-chagas.html>). Isto demonstra a real necessidade de uma metodologia que auxilie na prevenção e controle da DC

Em caso de surtos, geralmente, é realizado um trabalho da vigilância epidemiológica para identificar a fonte de infecção e interromper a cadeia de transmissão

da doença. Esta vigilância se dá por meio de inspeções em estabelecimentos que atuam com o processamento do açaí, verificando as condições de produção. Associando as inspeções sanitárias a uma tecnologia acessível e de fácil aplicabilidade para o controle da qualidade poderia tornar mais seguro o consumo do açaí nessas regiões endêmicas, contribuindo para a segurança alimentar global (FERREIRA et al., 2014).

Portanto, nossos dados demonstraram que a metodologia de isolamento do *T. cruzi* da polpa de Açaí por Sulfato de Zinco, associados à técnicas moleculares como a PCR, pode ser utilizada na detecção em amostras suspeitas. E com isto acelerar ações de controle e tratamento, pois a falta de um diagnóstico preciso sobre em qual via se deu a infecção pode gerar prejuízos ao paciente. E a metodologia apresentada nesse trabalho poderá fornecer resultados consistentes para dirimir dúvidas sobre casos concretos.

6-CONCLUSÕES E PESPECTIVAS

Com a técnica de flutuação em Sulfato de Zinco/PCR, foi possível detecção da contaminação do açaí por *T. cruzi*. O método foi sensível o bastante para detectar DNA de *T.cruzi* inoculados em açaí na escala femtomolar por PCR em tempo real e em PCR convencional.

Os testes com as amostras de açaí inoculadas com *T.cruzi* permitiram concluir que não podem ser colocadas diretamente na reação de PCR sem o tratamento prévio, ou seja, um isolamento do *T.cruzi*, que na nossa metodologia foi feita por Sulfato de Zinco 33% seguida da extração de DNA.

A técnica de flutuação em Sulfato de Zinco/PCR se mostrou de fácil aplicabilidade.

A metodologia de isolamento de *T. cruzi* com a flutuação em sulfato de zinco, juntamente com a PCR qualitativa e qPCR com a amplificação das regiões TCZ e rDNA 28S α demonstraram ser uma ferramenta aplicável para a detecção de açaí contaminado com *T. cruzi*, e seu uso pode ser apropriado em casos de surtos de transmissão de doença de Chagas por via oral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC nº 218, de 29 julho 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimento higiênico sanitários para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais. Diário Oficial da União. 30 jul 2005.

Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Smith, J.A.; Seidman, J.G.; Struhl, K. 1988. Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates
Barbosa W, Czerewuta AC, Oliveira RL. Tentativa de isolamento primário de *T. cruzi* de pacientes crônicos de doença de Chagas por hemocultura agentes bloqueadores. *Rev Patol Trop* 1983; 12:155-63.

Barbosa-Labello, R. Transmissão oral do *Tripanosoma cruzi* pela polpa de açaí em camundongos. Dissertação [Mestrado em Parasitologia]-Universidade Estadual de Campinas; 2010.

Bravo n, Muñoz C, Nazal N, Saavedra M, Martínez G, Araya E, Apt W, Zulantay I. Real-Time PCR in faecal samples of *Triatoma infestans* obtained by xenodiagnosis: proposal for an exogenous internal control. *Parasites & Vectors* 2012, 5:59.

Caldas S, Caldas IV, Diniz LF, Lima WG, Oliveira RP, Cecílio AB, Ribeiro I, Talvani A, Bahia MT. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *T. cruzi* infection. *Acta Tropica* 2012;123:170– 177.

Carod-Artal FJ. American trypanosomiasis. In: H.H. Garcia, H.B. Tanowitz, and O.H. Del Brutto. Handbook of Clinical Neurology - Neuroparasitology and Tropical Neurology. 3rd: Elsevier; 2013.p. 103-123.

Chagas, C., 1909. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1, 159–218.

Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989; 22:19-23.

Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009 Jul; 104 (1):31-40.

Cuba cuba A (1998) Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 31: 207–220.

Dantas LMS, Otilio Bastos PM, Brener B, Salomão M, Guerrero J, Labarthe NV. Técnica de centrifugo-flutuação com sulfato de zinco no diagnóstico de helmintos gastrintestinais de gatos domésticos *Ciêñ Rural* 2007 mai-ju; 37(3):904-906,

D'alessandro A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. Tejera, 1920. In: Lumdsen WHR, Evans DA, editors. Biology of the *Kinetoplastida*, I. New York: Academic Press; 1976. pp. 329–393.

Deborggraeve S, Coronado X, Solaria, Zulantay I, APT W, Mertens P, Laurent T, Leclipteux T, Stessens T, Dujardin JC, Herdewijn P, Buscher P. T. cruzi OligoC-Test: A Simplified and Standardized Polymerase Chain Reaction Format for Diagnosis of Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis., 2009, 3(6): e450. doi:10.1371.

Dias JCP, Amato Neto, V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 2011, 44, supl.2.

Dias JCP Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos [Nota prévia] Rev da Soc Bras de Med Trop 2006; 39(4): 370-375.

Drugs for Neglected Diseases initiative [homepage na internet]. Doença de Chagas [acesso em 13 Fev 2015]. Disponível em: <http://www.dndial.org/pt/doencasnegligenciadas/doenca-de-chagas.html>

Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favalaro RR, Freilij H, Schijman AG. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2009 Apr; 3(4):419.

Embrapa [homepage na internet]. Agência Embrapa de informação tecnológica árvore do conhecimento [acesso em Jan de 2015]. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/acai/arvore>

Eloy LJ, Lucheis SB. Hemoculture and Polymerase Chain Reaction Using Primers TCZ1/TCZ2 for the Diagnosis of Canine and Feline Trypanosomiasis. ISRN Vet Sci. 2012 May 31;2012:419378.

Faust, E.C. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces I. Preliminary communication. Am J of Trop Med 1938; 18:169-183.

Ferreira RTB, Branquinho MR, Cardarelli-Leite P. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. Vig Sanit Debate 2014;2(04):4-11.

Gilber SR, Alban SM, Gobor L, Bescrovaine J de O, Myiazaki MI, Thomaz-Soccol V. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. Rev Soc Bras Med Trop. 2013 May-Jun; 46(3):310-5

Governo do Estado do Pará. Decreto nº 326, de 20 de janeiro 2012. Estabelece regras para cadastramento dos batedores artesanais de açaí e bacaba; padrões para instalações, materiais, máquinas e equipamentos; condições higiênico-sanitárias e boas práticas de processamento, e atividades de inspeção e fiscalização. Diário Oficial do Estado do Pará; 24 jan 2012.

Governo do Estado do Pará. Decreto nº 2.475, de 10 de setembro de 2010. Dispõe sobre a implementação do Programa Estadual de Qualidade do Açaí, e dá outras providências. Diário Oficial do Estado do Pará; 13 set 2010

Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo, GA. Molecular Characterization and Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. Archives of Medical Research 2002; 33: 362–370.

Jankevicius J.V, Jankevicius S.I, Campaner M, Conchon I, Maeda L.A, Teixeira M.M.G, Freymuller E, Camargo E.P, Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes, *J. Protozool* 1989;36 :265-271.

Martins VP, Galizzi M, Salto ML, Docampo R, Moreno SNJ. Developmental Expression of a *Trypanosoma cruzi* Phosphoinositide-Specific Phospholipase C in Amastigotes and Stimulation of Host Phosphoinositide Hydrolysis. *Infection and Immunity* 2010; 78: 4206-4212.

Martins, VP. ; Okura, M. ; Maric, D. ; Engman, D. M. ; Vieira, M. ; Docampo, R. ; Moreno, S. N. J. . Acylation-dependent Export of *Trypanosoma cruzi* Phosphoinositide-specific Phospholipase C to the Outer Surface of Amastigotes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285, p. 30906-30917.

Moser DR1, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989 Jul;27(7):1477-82

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trend for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Ows Cruz Rio de Janeiro* 2009; 204(suppl 1):17–30.

Nagarkatti R, Bist V, Sun s, De araujo FF, Nakhasi HL, Debrabant A. Development of an Aptamer-Based Concentration Method for the Detection of *Trypanosoma cruzi* in Blood *PLoS ONE* , 2012, 7(8): e43533. doi:10.1371.

Nobrega AA, Garcia MH, Tatto E, Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.*, 2009; 15:653–5.

Nóbrega AA, de Araújo WN, Vasconcelos AM. Mortality due to Chagas disease in Brazil according to a specific cause. *Am J Trop Med Hyg* 2014 Sep;91(3):528-33.

Passos, Lac, guaraldo, AMA, Alves, DP. Análise da interferência da polpa de açai na transmissão oral de *Trypanosoma cruzi*, contribuindo para o surgimento de surtos de Doença de Chagas Aguda (DCA) na região Norte do Brasil: relatório final, convênio 667/ 2008 com Ministério da Saúde. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2010. [Relatório final, convênio 667/2008, com Ministério da Saúde].

Pávia P, Cuervo C, Montilla M, Nicholls RS, Puerta C. Diseño y estandarización de uma PCR para la detección específica de *trypanosoma cruzi*. *Infectio.*, 2003; 7: 129-36.

Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AMA, Franco RMB, Dias VL, Passos LAC. Chagas disease as a foodborne illness. *J Food Prot.* 2009;72(2):441-6.

Portela-Lindoso AAB & Shikanai-Yasuda, MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saúde Pública*, 2003; 37(1): 107-15.

Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, Da silva AJ. Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens Using a Multi-

Target Real-Time PCR Approach. PLoS Negl Trop Dis., 2012, 6(7): e1689. doi:10.1371.

Ramos JR AN, Luquetti A, Guaraldo AM, Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. Rio de Janeiro: Panafiosa – VP/OPAS/OMS, 2009:92. p.:il. (Série de Manuais Técnicos, 12 PAHO/HSD/CD/539.09).

Rassi A JR, Rassi A, Marin-Neto JÁ. Chagas disease. Lancet, 2010, 375: 1388–1402.

Rey L. Bases da parasitologia médica. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p. 38-45

Santos AL, d'Avila-Levy CM, Elias CG, Vermelho AB, Branquinha MH. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. Mic Infect. 2007 Jul; 9(8): 915-21

Santos JC, Sena ALS, Homna AKO, Agência Embrapa de informação tecnológica árvore do conhecimento [Internet]. Brasília: Embrapa; [atualizado em 2011; citado em Jan de 2015]. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/acai/arvore>

Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. Exp Parasitol. 1999 Mar;91(3):268-79.

Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1991; 33:351–7.

Shikanai-Yasuda, MA., Carvalho, NB. Oral Transmission of Chagas Disease. Emerging Infections. 2012.

Souto, R.P.; Fernandes, O.; Macedo, A.M.; Campbell, D.A.; Zingales, B.; Souto, R.P. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 1996; 83: 141-152.

Strasen J, Williams T, Ertl G, Zoller T, Stich A, Ritter O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. Clin Res Cardiol. 2014 Jan; 103(1):1-10.

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: Use in diagnosis of Chagas disease. Mol Biochem Parasitol. 1989; 33:205-14

Teixeira ARL, Monteiro PS, Rebelo JM, Argañaraz ER, Vieira D, Lauria-Pires L et al. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. Emerging Infect Dis. 2001;7(1):100-12.

Titto E, Braun M, Segura EL. Density gradient purification of human lymphocytes from contaminating trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J Immunol Methods. 1982;50(3):281-7.

Toso MA, Vial UF, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev. méd. Chile 2011 Feb ; 139(2): 258-266.

Umezawa ES, Shikanai-Yasuda MA, Stolf AM. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease. J Clin Lab Anal, 1996; 10:407–13.

WHO. Seventeenth program report progress. Making health research work for poor people 2003-2004. Geneva: WHO; 2005.

Weising K, Nybom H., Pfenninger M., Wolff K, Meyer W. DNA fingerprinting in plants and fungi. 1^a edition. Flórida: CRC press. Boca Raton; 1995.

Xavier SC, Roque ALR, Bilac D, de Araújo VAL, Neto SF. Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. PLoS Negl Trop Dis May 2014; 8(5): 2878.

YOSHIDA,N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun, v.40, n. 2, p.836-9, May 1983. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567(Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

Zulantay I, apt W, Valencia C, Torres A , Saavedra M, Rodriguez J, Sandoval L, Martinez G, Thieme P, Sepulveda E. Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. J Antimicrob Chemother, 2011; 66: 2224–2226