



Universidade de Brasília- UnB
Faculdade de Medicina
Pós-Graduação em Patologia Molecular
Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas



ESTUDO GENÉTICO, IMUNOLÓGICO E PARASITOLÓGICO DAS INFECÇÕES PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* EM FAMÍLIAS DO ESTADO DO PARÁ, BRASIL

Aluna: Perla Fabíola de Araújo

Orientador: Prof. Dr. Antônio Teixeira

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nadjar Nitz

Brasília – DF
2012

Perla Fabíola de Araújo

**Estudo Genético, Imunológico e Parasitológico das
Infecções pelo *Trypanosoma cruzi* em Famílias
do Estado do Pará, Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Brasília, 2012

Trabalho produzido no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas junto ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Financiamento: CAPES e CNPq.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos pelo amor, apoio e o grande incentivo em realizar os meus sonhos. Eu amo vocês.

Ao meu amor Carlos Thompson, que sempre esteve no meu coração. Você faz os meus dias mais felizes. Muito obrigada pela sensatez, paciência e carinho, durante a finalização deste trabalho. Amo muito você.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus que com apenas quatro letrinhas (A, C, G, T), criou uma diversidade de seres, nunca iguais, mas semelhantes ao ponto de serem identificados como obras de um mesmo criador.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Teixeira, especialmente pela confiança em meu trabalho. Seus ensinamentos SEMPRE estarão presentes em minha memória.

À Professora Nadjar Nitz pela co-orientação, pelo fundamental apoio durante a aplicação das ferramentas moleculares e, sobretudo pela amizade.

À Dra. Adriana Almeida, profissional médica dedicada e competente que com um trabalho diligente, metucioso e responsável, nos favoreceu trabalhar com as quatro famílias apresentados nesta tese. Tornou-se grande amiga.

Aos colegas, Doutores Aldo Valente e Vera da Costa Valente do Instituto Evando Chagas, Belém do Pará, pelo diagnóstico parasitológico das infecções agudas pelo *Trypanosoma cruzi* e pela solidariedade em relação ao nosso trabalho em parceria.

Às populações ribeirinhas amazônicas, que generosamente aceitaram participar deste projeto, com a única intenção de fazer o bem ao próximo.

Aos amigos pesquisadores do LMPDC: Adriano Rios, Ana Carolina Bussacos, Carla Nunes, Carlos Fernando Pimentel, Ciro Cordeiro, Eduardo Leonardecz, Ester Rose, Maria Carolina, Mariana Hecht, Rafael Andrade, Rozeneide Magalhães e Tamires Vital. A todos muito obrigada, pela amizade e agradável convivência de muitos anos.

Em especial sou grata aos amigos, Alessandro de Sousa e Manuela Britto, que nos momentos difíceis da conclusão deste trabalho, estiveram “firmemente” comigo sem hesitar. Muito obrigada pela ajuda nas análises de bioinformática.

À amiga Dra. Ana de Cássia, admito que foi difícil expressar minha gratidão por você. Conselheira nos momentos difíceis. Obrigada pelas palavras sábias e pelos cafés.

Aos amigos, Killarney Soares (UnB) e Liliane Siriano (UFG) pela amizade recente, mas verdadeira.

Agradeço também as estagiárias: Jaqueline Bidin, Marcelle Ribeiro e Renata Freitas pelo auxílio na bancada e pela amizade.

As minhas amigas: Adriana de Sá, Amira Mandrani, Dominique, Francilene, Helena, Ideni, Nilma Basílio e Renata Silva. Mesmo longe, vocês me ajudaram a chegar aqui.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu trabalho e minha formação profissional.

“Não são as espécies mais fortes que sobrevivem, nem as mais inteligentes, e sim as que respondem melhor à mudança”.

Charles Darwin

RESUMO

A primeira microepidemia pelo *Trypanosoma cruzi* na Amazônia brasileira foi publicada em 1969 e, desde então, outras têm sido observadas em famílias residentes em vários municípios dos Estados daquela região. Em 2007 e 2009 foram identificados casos clínicos de doença de Chagas aguda (DCA) em famílias dos municípios de Barcarena e Breves, Estado do Pará. Este estudo mostrou anticorpos da classe IgG contra antígenos do *T. cruzi* em 35,7% (39/109) das pessoas, sendo 29,5% (13/44), 26,6% (4/15), 20,6% (6/29), respectivamente, das famílias A, B, e C residentes no município de Barcarena, e em 76,1% (16/21) da família D do município de Breves; em 66,6% (14/21) dos casos dessa família foram identificados anticorpos IgM anti-*T. cruzi*. Os resultados de PCR com iniciadores de nDNA do parasito foram positivos em 76,1% (83/109) dos casos: Família A, 77,2%; B, 100%; C, 75,8% e D, 57,1%. De grande interesse, em 21 casos de DCA o exame parasitológico positivo foi convalidado pela PCR com iniciadores de nDNA de *T. cruzi*. Ademais, nas células germinativas do sêmen foi confirmada infecção ativa pelo *T. cruzi*, também presente nas células somáticas do sangue, pela PCR com iniciadores específicos de nDNA e kDNA. Adicionalmente, 16,5% (18/109) casos positivos apenas para kDNA, sem a infecção ativa, retiveram seqüências de minicírculos integradas no genoma. Nesses 18 casos as mutações de kDNA foram transferidas para as progênies pela reprodução sexuada. Com esse respeito, a diferença de 53% (44/83) entre os resultados obtidos pela PCR para nDNA e aqueles dos testes imunológicos contra antígenos de *T. cruzi* tem importância epidemiológica ainda não apreciada em outra investigação. Pois, a presença de nDNA e kDNA foi encontrada na ausência de anticorpos contra antígenos de *T. cruzi* nos hospedeiros tolerantes aos antígenos do parasito. Ademais, em todos esses casos de infecção ativa também ocorreu transferência vertical de seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* pela reprodução sexuada e as mutações foram prontamente identificadas no genoma humano. Então, a larga diferença entre os resultados de testes imunológicos e de PCR pode ser explicada pela aquisição da infecção via sexual ou transplacentária, durante a fecundação ou na fase inicial da gestação, antes do desenvolvimento do sistema imune do embrião, e o indivíduo nasce tolerante aos antígenos de *T. cruzi*. As mutações de kDNA foram identificadas nos cromossomos, e o principal sítio de integração foi retrotransposon LINE-1 em

70% (301/430) das quimeras identificadas. Em 83,3% (50/60) dos casos as mutações ocorreram no gene do receptor olfatório OR1-17, e em apenas 16,6% (10/60) foram encontradas em genes com outras funções reconhecidas. O achado mais relevante neste estudo foi a documentação de transmissão do kDNA e do nDNA do *T. cruzi* pela reprodução sexuada.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*; transmissão sexual; doença de Chagas; diagnóstico: anticorpos e PCR; integração de kDNA; retrotransposons; ruptura de genes.

ABSTRACT

By 1969, a microepidemic of *Trypanosoma cruzi* was recognized in the Brazilian Amazonia, and lately they have been constantly reported in families from several counties in the region. By 2007 and 2009, clinical cases of acute Chagas disease were identified in families living in counties of Barcarena and Breves, Estado do Pará. The exams revealed IgG antibodies against *T. cruzi* antigens in 35,7% (39/109) cases of the study population: Family A, 29,5% (13/44); B, 26,6% (4/15); C, 20,6% (6/29) of Barcarena county, and Family D, 76,1% (16/21) of Breves; Anti-*T. cruzi* IgM antibody was identified in 66,6% (14/21) of family D cases. The PCR assays with specific nDNA primer sets yielded positive results in 76,1% (83/109) cases: Family A, 77,2%; B, 100%; C, 75,8%; and D, 57,1%. Of interest, 21 cases showing symptoms of acute Chagas disease had parasitologic demonstration of *T. cruzi* and these were convalidated by the PCR assays with nDNA primer sets. Moreover, germline cells from male gametes showed *T. cruzi* nDNA and kDNA as well as somatic mononuclear cells from blood. Additionally, 16,5% (18/109) of kDNA positive cases in absence of active infection retained the minicircle sequences in the genome. In these cases the kDNA mutations were vertically transferred to progenie by sexual reproduction. With this respect, the reported differences 53% (44/83) between results of antibody assays and those obtained by PCR with primer sets to *T. cruzi* nDNA have broad epidemiologic importance not yet reported by previous investigation. The presence of nDNA and kDNA was documented in the absence of antibody against *T. cruzi* antigens in hosts' immune tolerant to the parasite antigens. Furthermore, vertical transfer of *T. cruzi* minicircle occurs by sexual reproduction in every case nDNA and kDNA are present in the course of an active infection. Insofar, the reported differences herein can be explained by the acquisition of the infection during fecundation or in the early gestational period, via sexual transmission or transplacenta from mother to offspring before embryo immune system development; and the newborn becomes tolerant to *T. cruzi* antigens. The kDNA mutations were identified in several chromosomes, and the main integration hotspot was LINE-1 in 70% (301/430) cases. The mutations entered at the olfactory ORI-17 gene in (50/60) cases (83,3%) and in (10/60) cases (16,6%) they were found in genes with annotated functions. A highly relevant finding in this study was the documentation of

transmission of kDNA, and of nDNA from *T. cruzi* active infection by sexual reproduction.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; sexual transmission; Chagas disease; diagnosis: antibodies and PCR assays; kDNA mutations; retrotransposons; vertical transfer; gene rupture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais espécies de palmeiras no Estado do Pará.....	14
Figura 2: Ciclos de vida silvestre e peridomiciliar do <i>T. cruzi</i>	20
Figura 3: Ultraestrutura do <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
Figura 4: Estrutura dos elementos retrotransponíveis.....	30
Figura 5: Estrutura do minicírculo de kDNA de <i>Leishmania braziliensis</i>	52
Figura 6: Esquema mostrando as regiões de obtenção dos <i>primers</i> utilizados na <i>tpTAIL</i> -PCR.....	53
Figura 7: Distribuição da população de indivíduos nas quatro famílias do estudo de acordo com idade e gênero.....	61
Figura 8: Testes imunológicos IFI e/ou ELISA positivos para infecções pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> na população do estudo.....	63
Figura 9: Resultados positivos dos testes PCR para nDNA e IFI e/ou ELISA para detecção de infecções pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
Figura 10: Resultados dos testes IFI e/ou ELISA e PCR com <i>primers</i> de nDNA e kDNA indicativos de infecções pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> na família A.....	65
Figura 11: Resultados dos testes IFI e/ou ELISA e PCR com <i>primers</i> de nDNA e kDNA indicativos de infecções pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> na família B.....	66
Figura 12: Resultados dos testes IFI e/ou ELISA e PCR com <i>primers</i> de nDNA e kDNA indicativos de infecções pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> na família C.....	67
Figura 13: Resultados dos testes IFI e/ou ELISA e PCR com <i>primers</i> de nDNA e kDNA indicativos de infecções pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> na família D.....	67
Figura 14: Diagnóstico pela PCR com <i>primers</i> de nDNA e kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> em 109 pessoas de quatro famílias do Estado do Pará, Brasil.....	68
Figura 15: Frequência de casos com anticorpos e/ou marcadores genéticos de nDNA e kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> na amostragem do estudo.....	69
Figura 16: Identificação de anticorpos contra antígenos de <i>L. braziliensis</i> pelos testes IFI e/ou ELISA nas quatro famílias do estudo.....	71
Figura 17: Evidência de infecções mistas: Identificação de anticorpos contra antígenos de <i>T. cruzi</i> e de <i>L. braziliensis</i> pelos testes IFI e/ou ELISA na população do estudo.....	71

Figura 18: Comparação entre os resultados moleculares e imunológicos para a identificação das infecções causadas por <i>L. braziliensis</i>	72
Figura 19: Retenção de kDNA e nDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma de pessoas das quatro famílias do estudo.....	75
Figura 20: Heredograma da Família A com resultados de testes sorológicos e de PCR com <i>primers</i> específicos de kDNA e nDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
Figura 21: Heredograma da Família B com resultados de testes sorológicos e de PCR com <i>primers</i> específicos de kDNA e nDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	78
Figura 22: Heredograma da Família C com resultados de testes sorológicos e de PCR com <i>primers</i> específicos de kDNA e nDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	78
Figura 23: Heredograma da Família D com resultados de testes sorológicos e de PCR com <i>primers</i> específicos de kDNA e nDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	79
Figura 24: <i>Southern blot</i> dos produtos da <i>tpTAIL</i> -PCR3 proveniente do indivíduo chagásico 76 (Família D).....	80
Figura 25: Freqüência das integrações de seqüências de minicírculos de kDNA do <i>Trypanosoma cruzi</i> m cromossomos humano.....	81
Figura 26: Evento de integração de seqüência de minicírculos de kDNA de <i>T. cruzi</i> no <i>locus</i> AL732374.14 do cromossomo X.....	82
Figura 27: Quimera formada pela integração de seqüência de minicírculos de kDNA de <i>T. cruzi</i> no genoma de um indivíduo chagásico.....	83
Figura 28: Integração de seqüências de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> em elementos repetitivos no genoma humano.....	84
Figura 29: Mapeamento das famílias de elementos LINE-1 associados às seqüências de kDNA de <i>T. cruzi</i> integradas no genoma humano.....	85
Figura 30: Remodelamento do genoma de chagásico em sítio de mutação de kDNA sugestivo de <i>hitchhiking</i> e recombinação de três cromossomos.....	86
Figura 31: Identificação de ORF quimérica putativa do clone PA871 do indivíduo chagásico 22 (Família B).....	87
Figura 32: Identificação de banda de kDNA de <i>T. cruzi</i> no genoma humano pelo <i>Southern blot</i>	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Casos de infecções pelo <i>T. cruzi</i> identificados no FHCGV	41
Tabela 2: <i>Primers</i> utilizados nas reações de <i>tpTAIL</i> -PCR.....	54
Tabela 3: Resultados dos testes imunológicos (IFI e/ou ELISA) para detecção de infecções contra antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i> nas famílias estudadas.....	62
Tabela 4: Diagnóstico molecular das Infecções pelo <i>T. cruzi</i> com <i>primers</i> de nDNA e kDNA em 109 indivíduos das quatro famílias em estudo.....	65
Tabela 5: Resultados dos testes imunológicos (IFI e/ou ELISA) para detecção de infecções contra antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i> nas famílias estudadas.....	70
Tabela 6: Frequência das infecções diagnosticadas pela PCR com <i>primers</i> de minicírculo de kDNA de <i>L. braziliensis</i> em 109 indivíduos das quatro famílias.....	72
Tabela 7: Resultados dos exames parasitológicos em 21 casos diagnosticados com infecção aguda pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	74
Tabela 8: Rendimento das <i>tpTAIL</i> -PCR's.....	80

ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
³² P	Isótopo radioativo fósforo-32
A	Adenina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citosina
Ca ²⁺	Cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
ColS	Colaboradores
DC	Doença de Chagas
DCA	Doença de Chagas Aguda
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídio trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERV	<i>Endogenous retrovirus</i>
EPI	Epimastigota
FHCGV	Fundação Estadual Hospital de Clínicas Gaspar Vianna
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G	Força centrífuga
g	Gramma
gRNAs	RNA guia
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HEMO	Hemocultura
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-12	Interleucina 12
kb	Quilobase
KCl	Cloreto de Potássio

kDNA	DNA do cinetoplasto
kg	Quilograma
LGT	<i>Lateral Gene Transfer</i>
LMPDC	Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas
LINE(L1)	<i>Long Interspersed Nucleotide Element</i>
LkDT	<i>Lateral kDNA Transfer</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
M	Molar
Mb	Megabases
Meio LB	Meio Luria-Broth
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mRNAs	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nDNA	DNA de origem nuclear
ng	Nanograma
nts	Nucleotídeos
O ₂	Oxigênio
OD	Densidade Óptica
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
ORF2	<i>Open Reading Frame 2</i>
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polietileno Glicol
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
poli-A	Poli-adenina
RNA	Ácido Ribonucléico
rRNA	RNA ribossômico
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SINE	<i>Short Interspersed Nucleotide Element</i>
SSC	Tampão Salino Citrato de Sódio

SSPE	Tampão Salino Fosfato de Sódio - EDTA
<i>TAIL-PCR</i>	<i>Thermal Asymmetric Interlaced PCR</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
TE's	Elementos Transponíveis
TGH	Transferência Gênica Horizontal
TGV	Transmissão Gênica Vertical
Th1	<i>T helper - 1</i>
Tm	Temperatura média de anelamento em °C.
<i>tpTAIL-PCR</i>	<i>targeting primer Thermal Asymmetric Interlaced-PCR</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
U	Unidade Internacional
UTR	<i>Untranslated Region</i>
v/v	Volume/volume
WHO	<i>World Health Organization</i>
μCi	Microcurie
μl	Microlitro
μm	Micrometro
μg	Micrograma
%	Por cento

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Tripanossomíase Americana e Doença de Chagas	2
1.2. Transmissão oral do <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas aguda experimental	3
1.3. A transmissão oral do <i>Trypanosoma cruzi</i> em humanos	5
1.4. Aspectos da epidemiologia da transmissão oral do <i>Trypanosoma cruzi</i> no Brasil	7
1.5. A transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> na Amazônia Brasileira	9
1.6. Reservatórios e Vetores do <i>Trypanosoma cruzi</i> na Amazônia Brasileira	11
1.7. Aspectos clínicos da doença de Chagas	15
1.8. Métodos de diagnóstico da infecção chagásica	17
2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
2.1. Ciclo de vida e interação parasito-célula	20
2.2. O DNA mitocondrial (kDNA)	22
3. Patogênese	24
3.1. Resposta imune à infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
3.2. Doença de Chagas e Autoimunidade	26
4. DNA repetitivo	27
4.1. Estrutura e Classificação de Elementos Transponíveis	28
4.2. Impactos dos Elementos Transponíveis no Genoma Hospedeiro	31
4.2.1. Retrovírus Endógenos: HERV's	31
4.2.2. Retrotransposons autônomos: LINE's	32
4.2.3. Retrotransposons não-autônomos: SINE's	32
4.2.4. Retrotransposons não-autônomos: Pseudogenes	33
4.2.5. Transposons de DNA	34
5. Integração de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma do hospedeiro	35
2. OBJETIVOS	39
2.1. Objetivo geral	39
2.2. Objetivos específicos	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Dados epidemiológicos gerais	40
3.2. População estudada	40
4. Diagnósticos laboratoriais	42
4.1. Exames Parasitológicos	42

4.1.1. Pesquisa direta do <i>T. cruzi</i> pela gota espessa e/ou pelo QBC®	42
4.1.2. Hemocultura e/ou xenodiagnóstico no IEC/PA	42
4.1.3. Hemocultura na UnB/DF	44
4.2. Testes imunológicos e moleculares.....	45
4.2.1. Crescimento de <i>T. cruzi</i> e <i>L. braziliensis</i> para obtenção de antígenos.....	45
4.2.2. Preparo do antígeno para imunofluorescência indireta (IFI)	45
4.2.3. Reação de imunofluorescência indireta	46
4.3. Preparo do antígeno para ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>).....	46
4.3.1. Sensibilização das placas de ELISA com os antígenos.....	47
4.3.2. Incubação com o primeiro anticorpo	47
4.3.3. Incubação com o segundo anticorpo e revelação de imunocomplexos.....	47
4.4. Extração de DNA de células sanguíneas	48
4.5. Extração de DNA total de <i>T. cruzi</i> e <i>L. braziliensis</i>	49
4.6. Extração de kDNA de <i>T. cruzi</i>	49
5. Análise e quantificação do DNA extraído.....	50
6. Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	50
6.1. Amplificação de nDNA de <i>T. cruzi</i>	50
6.2. Amplificação de kDNA de <i>T. cruzi</i>	51
6.3. Amplificação de kDNA de <i>L. braziliensis</i>	52
7. Amplificação das regiões flangeadoras do kDNA de <i>T. cruzi</i> integrado no genoma humano.	53
8. Análise eletroforética dos produtos de PCR.....	55
9. <i>Southern Blot</i> dos produtos de PCR.....	55
10. <i>Southern blot</i> de DNA genômico.....	56
11. Marcação de sondas radioativas e hibridização	56
11.1. Purificação das sondas radioativas	57
12. Pré-hibridação e hibridação.....	57
13. Radioautografia.....	58
14. Clonagem e transformação em <i>E. coli</i> competente	58
14.1. Ligação do inserto ao vetor	58
14.2. Preparo de células competentes	58
14.3. Transformação dos produtos da ligação em células <i>E. coli</i> competentes.....	59
14.4. Seleção dos clones recombinantes de <i>E. coli</i>	59
14.5. Extração do DNA plasmidial	60
15. Análise das seqüências	60

4. RESULTADOS	61
4.1. Aspectos epidemiológicos	61
4.2. Testes imunológicos para detecção de anticorpos contra antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
4.3. Diagnóstico molecular das infecções causadas pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
4.4. Diagnóstico diferencial das infecções mistas causadas por <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania sp.</i>	69
4.5. Testes imunológicos para detecção de anticorpos contra antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i>	70
4.6. Diagnóstico molecular das infecções causadas por <i>Leishmania braziliensis</i>	72
4.7. Validação dos resultados de PCR com <i>primers</i> de nDNA e kDNA pela demonstração do <i>Trypanosoma cruzi</i> no sangue dos pacientes	73
4.8. Resultados dos exames de PCR com <i>primers</i> específicos de nDNA e kDNA nas quatro famílias do estudo.....	74
4.9. Heredogramas com resultados dos exames imunológicos e de PCR para infecções pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> nas quatro famílias estudadas	76
5. Análise da integração de seqüências de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma humano.....	79
5.1. Características das seqüências flanqueadoras do kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> no genoma humano.....	84
5.2. Identificação de ORFs quimeras nas mutações	87
6. <i>Southern Blot</i> genômico.....	88
5. DISCUSSÃO	89
5.1. Características das microepidemias de infecções pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> na Amazônia	89
5.2. Estudos epidemiológicos baseados na pesquisa de anticorpos contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	92
5.3. Identificação de infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> por marcadores genéticos do nDNA do parasito em indivíduos com sorologia negativa.....	93
5.4. Os indivíduos 'tolerizados' ao <i>Trypanosoma cruzi</i> não produzem anticorpos contra antígenos do parasito	94
5.5. A teoria da tolerância imunológica explica que pessoas com DNA nuclear de <i>T. cruzi</i> , mas sem anticorpo específico, podem ter adquirido as infecções via placenta ou sexual, antes da maturação do sistema imune.....	95
5.6. Mapeamento das mutações de kDNA no genoma das pessoas nas quatro famílias da Amazônia.....	96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tripanossomíase Americana e Doença de Chagas

Após 100 anos da descrição do *Trypanosoma cruzi*, a moléstia de Chagas permanece como um grande desafio à saúde pública nos países da América Latina. Estima-se que 18 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo *T. cruzi* e cerca de 100 milhões de indivíduos vivem expostos ao risco de infecção, nos 21 países onde a doença é endêmica (WHO, 2002). Ainda que tenha sido constatada uma redução significativa na transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, não existem dados quantitativos substitutivos da estimativa de 18 milhões de chagásicos na América Latina (Dias e cols, 2008).

Segundo Coura (2007), a enzootia e a antropozoonose são expandidas com o desmatamento e o avanço da agricultura e da pecuária. Essas práticas e o aumento da densidade demográfica em regiões endêmicas fizeram com que algumas espécies de triatomíneos de hábitos silvestres gradativamente se adaptassem ao peridomicílio e domicílio humano. Dessa forma, a zoonose transformou-se em antroponose e a prevalência da infecção em humanos aumentou consistentemente nos últimos três séculos.

A Amazônia brasileira é hoje considerada região endêmica para doença de Chagas. As infecções em humanos tornaram-se evidentes à medida que houve investigação sistemática em regiões onde a densidade demográfica e a modificação do ecossistema criaram as condições adequadas à manutenção do ciclo de transmissão do *T. cruzi*, sustentado pelas mais de 1250 espécies de mamíferos e mais de 40 espécies de triatomíneos (Gurgel-Gonçalves, 2008). A doença de Chagas aguda (DCA) tem sido encontrada nessa região como uma enfermidade emergente, com ocorrência de microepidemias em agrupamentos de famílias, sugerindo que a transmissão fosse, possivelmente, relacionada à ingestão de alimentos contaminados com o *T. cruzi*. Até o momento não se encontrou outra evidência satisfatória para explicar tais microepidemias (Valente, 2008). A presença de muitas espécies de triatomíneos contaminados com *T. cruzi* na região amazônica também favorece a rota de transmissão oral da infecção. Existem poucos estudos sobre a morbidade da DCA com acometimento cardíaco na Amazônia, mas suspeita-se que a severidade da

forma aguda da doença tenha relação com a transmissão do *T. cruzi* pela via oral (Ianni e Mady, 2005).

Atualmente têm ocorrido microepidemias de infecções agudas na Amazônia onde existe aproximação entre *T. cruzi*, reservatórios invertebrados e vertebrados, e o homem (Coura e cols, 2002; Valente, 2008). A obtenção de conhecimento sobre a ecoepidemiologia, a dinâmica da transmissão, e o perfil clínico da DCA é fundamental nas estratégias para intervenção (Pinto e cols, 2008). A colonização rápida dessa região, com desmatamento ou ocupação desordenada de áreas florestais, gera dificuldades que não são resolvidas mediante estratégia convencional de combate ao inseto-vetor (Aguilar e cols, 2007). O combate ao triatomíneo na floresta é tarefa complexa, requerendo emprego de novos modelos de gerenciamento das ações antrópicas na região e promoção da educação ambiental, visando ao combate dos triatomíneos (Gomes e cols, 2008).

1.2. Transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas aguda experimental

A ingestão de formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* não afeta a viabilidade do protozoário que sobrevive no suco gástrico (Camandaroba e cols, 2002). A transmissão oral do *T. cruzi* pode ser rota freqüente em marsupiais e outros mamíferos insetívoros susceptíveis à aquisição da infecção pela ingestão do alimento contaminado (Pereira e cols, 2009). Logo após a descoberta da tripanossomíase, Carlos Chagas e Oswaldo Cruz descreveram o primeiro caso de transmissão oral da doença, quando sagüis (*Callitrix penicillata*), colocados em jaula juntamente com triatomíneos infectados pelo protozoário, adquiriram a infecção, e a explicação encontrada foi a contaminação mediante ingestão dos insetos pelos sagüis (Dias, 2006).

Na década de 1930, Mazza e cols. relataram a infecção de ratos sadios que devoraram um roedor silvestre infectado, e a infecção experimental também foi descrita em cães que ingeriram moscas domésticas alimentadas com fezes de triatomíneos portadores de *T. cruzi*. Observações sobre a possibilidade de transmissão de *T. cruzi* pela via oral foram referidas inicialmente por Natan-Larrier (1921), depois por Brumpt (1931), Kofoid e Donat, (1933) e Cardoso (1933), que testaram a capacidade de mamíferos se

infectarem ao ingerir fezes de triatomíneos, até a descrição dos primeiros casos humanos por Mazza (1936). Nos estudos experimentais sobre a viabilidade do parasito ingerido pela via oral, Torrico (1950) e Wood (1960) observaram a sobrevivência do parasita por longo tempo nos intestinos de triatomíneos, moscas (Vergani, 1952) e até em baratas (Diaz Ungría, 1968), possibilitando a transmissão do *T. cruzi* para coelhos, gatos, e cães. Mayer (1961) demonstrou a infecção de animais experimentais alimentados com leite contaminado com excrementos de *T. infestans*, mantido durante 24 horas à temperatura ambiente.

Yaeger (1971), na Louisiana Estados Unidos, demonstrou que gambás adquiriram infecção experimental pelo *T. cruzi* mediante ingestão de dois triatomíneos (*Rhodnius prolixus*). De acordo com o autor, a infecção pelo *T. cruzi* pode ser freqüente em mamíferos e roedores devido a seus hábitos alimentares insetívoros ou pela predação de outros mamíferos infectados. Também nos Estados Unidos (Roellig e cols, 2009), foi demonstrada a transmissão oral de *T. cruzi* em guaxinim (*Procyon lotor*), reservatório natural do *T. cruzi* naquele país, mediante ingestão de tripomastigotas em hemípteros infectados.

Lainson e cols (1980) misturaram suspensão de epimastigotas de *T. cruzi* com leite pasteurizado, feijão cozido, peixe, carne bovina, arroz, suco de manga, queijo e farinha de mandioca. Os autores observaram que o *T. cruzi* sobreviveu durante 3 horas nos alimentos mantidos a temperaturas entre 26°C e 28°C. Esses alimentos foram usados como ração e 100% dos camundongos adquiriram a infecção pela via oral.

Jansen e Deane (1985) ressaltaram a importância do gambá (*Didelphis marsupialis*) como reservatório e transmissor do *T. cruzi*, quando constataram a infecção de camundongos que ingeriram alimentos contaminados com excrementos do marsupial. Nos anos seguintes, diversos trabalhos confirmaram a viabilidade da transmissão por via oral, utilizando diferentes vias, hospedeiros e vetores expostos à contaminação pelo *T. cruzi* (Storino e Jorg, 1994). Calvo-Méndez e cols (1994) demonstraram a infecção chagásica por via oral em camundongos pela administração de água potável, leite pasteurizado, carne moída crua ou cozida, queijo fresco e arroz cozido contaminados com fezes de *Triatoma pallidipennis*. Os autores observaram

existir variação na eficiência da infecção de acordo com o tipo de alimento ingerido e demonstraram que o leite foi o veículo mais efetivo para a transmissão do protozoário. Em 1987, Soares e cols demonstraram a viabilidade do parasito no caldo de cana por até 24 horas e, Castanho e cols (2002) relataram a infecção chagásica em camundongos que ingeriram garapa contaminada com *T. cruzi* de fezes de *Rhodnius neglectus*.

Em 2010, Barbosa mostrou que o *T. cruzi* sobrevive na polpa de açaí durante longos períodos de incubação em diferentes temperaturas, preservando a virulência testada em camundongos. Essa observação tem importância epidemiológica à medida que mostra que os processos de congelamento e descongelamento podem não ser suficientes para matar o *T. cruzi* e impedir a sua transmissão para o homem.

1.3. A transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* em humanos

O primeiro caso humano de transmissão do *T. cruzi* pelo leite materno foi relatado na Argentina por Mazza e cols (1936). Após esse fato, diversos outros autores evidenciaram a presença de *T. cruzi* em leite de animais infectados experimentalmente com o parasito (Ferreira e cols, 2001). No Equador, Amúnarriz e cols (1991) e Aguilar e Yépez (1996) publicaram resultados de estudos sorológicos realizados por Guderian e cols (dados não publicados) em 1011 quíchuas da Amazônia equatoriana, Província de Secumbios. Os relatos mostraram índice de infecção de 6,03%, e sugeriram que as infecções poderiam ter sido adquiridas pela transmissão vetorial ou pela via oral, mediante ingestão de carne de animais silvestres. Portanto, a transmissão do *T. cruzi* pela via oral pode ser freqüente entre índios da Amazônia equatoriana.

Microepidemia com grande número de casos de infecções agudas pelo *T. cruzi* ocorreu na Escola Municipal Andrés Bello, na cidade de Chacao, região metropolitana de Caracas, Venezuela, em dezembro de 2007. Dos 128 casos confirmados, 75% eram de jovens menores de 18 anos que apresentaram sintomatologia característica de fase aguda da doença de Chagas. Do total, 12 pacientes foram hospitalizados, e, entre eles, houve um óbito. Os estudos epidemiológicos concluíram que a fonte de infecção teria sido suco de goiaba produzido sem condições adequadas de higiene. Insetos vetores infectados foram coletados próximos ao local de processamento do suco. Uma mulher que

preparava o suco de goiaba na escola teve soro-positividade para anticorpos IgM e IgG anti *T. cruzi* (Villalobos, 2007; Rodriguez-Morales, 2008; Miles, 2010; Noya e cols, 2010). Também na Venezuela, no município de Chichiriviche de la Costa, estado de Vargas, em abril de 2009, 47 estudantes e três professores adquiriram a infecção aguda e a fonte de contaminação mais provável também teria sido suco de goiaba contaminado (ISID, 2009). Nesta microepidemia foram registrados três óbitos em consequência da DCA.

Na Colômbia, habitantes de Tibu, Norte de Santander, foram observados sinais e sintomas clínicos de distúrbios cardíacos que levaram à suspeita de DCA talvez, adquirida pela via oral (Rodriguez e cols, 1992). Naquela localidade, seis soldados de um grupamento militar desenvolveram manifestações clínicas (sem óbito) e o diagnóstico foi confirmado pelos exames imunológicos. Os achados epidemiológicos revelaram que aquelas pessoas ingeriam carne de animais silvestres durante as jornadas na selva. No povoado de Guamal, estado de Magdalena, Carceres e cols. (1999) registraram doença cardíaca em 13 pessoas, entre as quais três faleceram. Exemplos de *Panstrongylus geniculatus* infectados foram coletados em palmeiras próximas das residências, suspeitando-se que o *viño de palma*, bebida preparada e consumida na região, poderia ser o veículo de transmissão do *T. cruzi* contaminante nas fezes de triatomíneos (Hernández e cols, 2009). Também na Colômbia (2008), dez pessoas de Bucaramanga tiveram a infecção aguda e a ingestão de suco de tangerina teria sido o veículo de contaminação, pois foi o elemento em comum da microepidemia que disseminou para nove pacientes sintomáticos, inclusive três trabalhadores do aeroporto Palonegro de Lebrija, um dos quais faleceu (Hernández e cols, 2009).

De acordo com Rodriguez-Morales e cols (2009), atualmente, muitos estudos estão voltados para a ocorrência da doença de Chagas em países europeus como Espanha, Suíça, França, Itália, Alemanha e Inglaterra. Também, existe interesse econômico e demanda de mais estudos desses casos com a finalidade de descartar qualquer possibilidade de veiculação do *T. cruzi* pelos alimentos exportados.

1.4. Aspectos da epidemiologia da transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* no Brasil

Existem poucos estudos sistematizados e randomizados sobre transmissão oral do *T. cruzi* em humanos. As observações na literatura que têm valor conclusivo são aquelas que resultam de estudos em animais de laboratório, citados nos parágrafos anteriores. Em humanos, os estudos existentes se referem à transmissão oral via leite materno, de leite cru ou de sucos de frutas e verduras contaminados por vetores silvestres e reservatórios vertebrados de *T. cruzi* (Camandaroba e cols, 2002). Mas, os dados são apenas sugestivos e geralmente as análises epidemiológicas não excluem todas as possibilidades, apenas apontando uma ou mais rotas de contaminação, por não terem sido excluídas.

A primeira microepidemia de infecção humana pelo *T. cruzi* com suspeição de transmissão oral do parasito via alimentos foi descrita por Silva e cols (1968). Os autores relataram que no ano de 1965, no distrito de Teutônia, Município de Estrela (RS) 17 pessoas, adquiriram a infecção pelo *T. cruzi*, e que seis delas faleceram. Naquela microepidemia, as pessoas adoeceram praticamente no mesmo dia e apresentaram quadro clínico de miocardite aguda. Os pacientes (funcionários, alunos e professores) tinham participado de festa e feito refeições na Escola Agrícola Municipal. O estudo sorológico e entomológico sugeriu a contaminação da horta por excretas e secreções provenientes das glândulas anais de marsupiais infectados pelo *T. cruzi*, encontrados nas proximidades da escola. Porém, não houve demonstração do parasito nas hortaliças, nem tampouco foi provado que esse teria sido o veículo de contaminação. A microepidemia descrita em Belém do Pará por Shaw e cols (1969), envolvendo quatro pessoas de uma família, também sugeriu a hipótese de transmissão por alimento contaminado com fezes de triatomíneo silvestre, e a viabilidade dessa hipótese foi demonstrada experimentalmente (Lainson e cols, 1980). Uma microepidemia de maior proporção foi registrada em Catolé do Rocha, Paraíba. Na ocasião, 26 pessoas adoeceram entre 7 e 22 dias após participar de uma festividade na fazenda Aroeira. Uma delas faleceu de insuficiência cardíaca congestiva (Shikanay-Yasuda, 1987). Todas aquelas pessoas tinham feito refeição de churrasco de boi e carneiro, buchada de carneiro, carne de porco cozida, salada e caldo de cana moído no local. Os

estudos epidemiológicos preliminares sugeriram a possibilidade de contaminação da comida e/ou dos utensílios por excretas de *Didelphis albiventris* (denominado popularmente como gambá-de-orelha-branca, saruê, ou mucura), freqüente nas proximidades do domicílio (Marcondes e cols, 1987). Posteriormente, evidências relacionadas à sobrevivência de *T. cruzi* em caldo de cana, associadas ao fato de a máquina de moer ter abrigado triatomíneos, sugeriram a possibilidade de esse alimento ser o veículo de transmissão da infecção pelo *T. cruzi* na Paraíba (Lewinsohn, 2005a; 2005b). Em 1996, houve uma microepidemia no Município Mazagão, no Amapá, envolvendo 17 pessoas de três famílias diferentes. Nesse episódio, também foi considerada a possibilidade de transmissão da infecção pelo suco de açaí contaminado com fezes de triatomíneos. O suco fora preparado à noite, quando, então, os insetos atraídos pela luz, que poderiam ter caído dentro da máquina de moer, teriam sido triturados juntamente com o fruto (Valente e cols, 1999). Como se compreende pela descrição, não existe comprovação, mas existiram elementos que possibilitaram a especulação.

Em 2005, foi dado destaque pela mídia internacional à microepidemia que ocorreu em Navegantes, Santa Catarina. Na ocasião, a Secretaria de Saúde do Estado registrou infecções em 24 pessoas e ocorreram três óbitos (SVS, 2007a). O estudo epidemiológico mostrou triatomíneos contaminados com *T. cruzi* em palmeiras próximas do quiosque onde era moída a cana de açúcar vendida aos turistas que adquiriram as infecções (OPS, 2006). A hipótese de contaminação do caldo de cana pelo *T. cruzi* foi possível em vista de: a) presença de triatomíneos em palmeira próxima ao local; b) ter sido encontrado no quiosque um triatomíneo infectado; e, c) uma gambá fêmea com quatro filhotes capturados estavam todos infectados (Ianni e Mady, 2005).

Em 2006, a Secretaria da Saúde do Estado do Ceará registrou microepidemia envolvendo oito pessoas de duas famílias de Redenção (CE). Duas pessoas eram do sexo masculino e seis do sexo feminino, com idades entre 2 e 35 anos (SESA, 2006). Estudos epidemiológicos sugeriram o veículo de transmissão do *T. cruzi* pela via oral, através de uma sopa preparada com água de reservatório em condições precárias de higiene (Oliveira e cols, 2007). Não houve tentativa de demonstrar o parasito na água contaminada.

Ainda em 2006, ocorreram microepidemias no Município de Ibipitanga (6 casos), e outro no Município de Macaúbas, ambos no Estado da Bahia. Neste último, sete pessoas de uma família (pai, mãe e cinco filhos) tinham adquirido a infecção pelo *T. cruzi*, e dois deles foram a óbito. Nesses casos, também foi sugerida a ingestão de água contaminada com fezes de triatomíneos (Dias e cols, 2008), mas não foi feita comprovação parasitológica.

1.5. A transmissão do *Trypanosoma cruzi* na Amazônia Brasileira

Até recentemente, as infecções agudas pelo *T. cruzi* na Amazônia eram invariavelmente casos isolados tidos como resultantes de transmissão vetorial peridomiciliar, visto que os triatomíneos silvestres eram frequentemente encontrados próximos das residências. Microepidemias envolvendo várias pessoas estavam limitadas ao primeiro relato ocorrido em Belém (Shaw e cols, 1969). Assim, os pesquisadores alertavam para a importância do ciclo silvestre funcionando como filtro naquela região, prevenindo os casos de doença humana. Mas a raridade também poderia ser explicada pela inexistência de insetos-vetores domiciliados. Entretanto, o fato de transmissores eficazes como o *T. infestans* e o *Panstrongylus megistus* já terem invadido o Maranhão e conseguirem sobreviver e colonizar em ambiente de laboratório, em Belém, sugeria que essas espécies teriam grande potencial de adaptação ao clima quente e úmido da região. Em vista disto, o potencial de transmissão das infecções pelo *T. cruzi*, mesmo sem evidência de domiciliação de insetos-vetores, precisava ser considerado atentamente (Miles e cols, 1978; Fraiha, 1983).

Passados 20 anos, após a primeira microepidemia com abrangência familiar, Rodrigues e cols (1988) relataram a segunda microepidemia de infecções pelo *T. cruzi* em famílias, bem como a DCA na região Amazônica. A doença aguda foi descrita em oito indivíduos pertencentes a duas famílias originárias de Macapá (AP), em outubro de 1984. Na primeira família, procedente do bairro de Santa Rita, seis pessoas apresentaram febre e sintomas clínicos simultaneamente, entre as quais três crianças desenvolveram dispnéia e miocardite. A segunda família, procedente do bairro Pacoval, incluía uma criança de dois anos de idade, com síndrome febril aguda e diarreia e sua

mãe que era assintomática, ambas com exame parasitológico positivo para *T. cruzi*.

No Estado do Maranhão, a doença era considerada inexistente. Porém, os primeiros casos autóctones de DCA ocorreram em 1975. Tratava-se de três casos da ilha de São Luis e um do povoado de Bacurituba, Município de Cajapió, região da baixada maranhense (Silva e cols, 1985). As infecções demonstradas pelos testes sorológicos foram encontradas em paralelo com o crescimento demográfico (Teixeira e cols, 2001).

No Estado do Acre, Viana e cols (1994) registraram três casos agudos de uma mesma família de Boa Vista, município de Plácido de Castro, a 90 km de Rio Branco. As infecções tiveram evolução rápida e grave, com febre alta, edema generalizado, miocardiopatia, resultando em óbito de um menor de idade. Os autores encontraram triatomíneos silvestres infectados com *T. cruzi* no peridomicílio. No quintal da residência foram identificados vários exemplares de palmeiras de urucuri (*Attalea phalerata*). Segundo relato da mãe, as crianças eram alimentadas com frutos que caíam do pé de urucurizeiro. Esses frutos se dispõem em cachos junto à coroa das palmeiras, onde foram coletadas dezenas de triatomíneos (*R. pictipes*) infectados com *T. cruzi*. Existe a possibilidade de que o fruto contaminado com fezes frescas de triatomíneos tenha transmitido o protozoário para as crianças, mas isso não foi comprovado.

No Estado do Amazonas (2004), no município de Tefé, um grupo de 9 pessoas foi identificado com febre alta, edema de membros inferiores e da face, e uma dessas pessoas teve meningoencefalite (Lacerda e cols, 2005). Na ausência de vetores nos domicílios dos pacientes, a transmissão pela via oral foi sugerida, sem definição do alimento ingerido (Borborema e cols, 2005). Em 2007, houve microepidemia envolvendo 25 pessoas no município de Coari (AM) e o estudo epidemiológico sugeriu contaminação pelo suco de açaí comprado em um ponto de venda, sem controle de qualidade. A Agência Brasil (2010), difundiu amplamente a ocorrência de microepidemia de infecções pelo *T. cruzi* no Município de Santa Isabel do Rio Negro (AM), envolvendo 12 pessoas, oito adultos e quatro crianças, que teriam sido infectadas após a ingestão de polpa de açaí produzida em condições sanitárias inadequadas. Mas, não há confirmação sobre o veículo de contaminação, ainda que o açaí seja o alimento mais presente na possível rota de contaminação.

Dados divulgados pelo Laboratório de Doença de Chagas do Instituto Evandro Chagas (PA) e pela Secretaria de Vigilância em Saúde contabilizaram 592 casos agudos de doença de Chagas na Amazônia brasileira, entre 1968 e 2007. Entre esses casos, 587 tiveram confirmação parasitológica, sendo 440 (74,9%) associados à microepidemias em famílias. Até 2006, cerca de 430 casos de DCA foram imputados ao consumo de alimentos contaminados somente na região Amazônica brasileira (SVS, 2007b).

Com o estabelecimento do Programa Estadual de Controle de Chagas no Pará (PDCh-PA), entre os anos de 2006 a 2011, foram notificados somente no Estado do Pará, 634 casos de DCA (com 12 óbitos) distribuídos em 53 municípios. Todos esses casos eram associados à hipótese de transmissão pela via oral e a polpa de açaí foi considerada veículo de contaminação. Essa é a posição oficial sobre aspectos relacionados à transmissão das infecções pelo *T. cruzi* na Amazônia, onde a transmissão oral veiculada por alimentos contaminados pode ter maior relevância epidemiológica. Mas a literatura citada e os fatos relatados aqui mostram que há necessidade de mais investigação para esclarecer vários aspectos relacionados com a ecologia de vetores e reservatórios, epidemiologia, clínica e importância médico-social da doença de Chagas na Amazônia brasileira.

1.6. Reservatórios e Vetores do *Trypanosoma cruzi* na Amazônia Brasileira

Nos últimos anos, a possibilidade de emergência e dispersão das infecções pelo *T. cruzi* e casos de doença de Chagas humana na Amazônia brasileira tem chamado atenção de alguns autores, pois, nesta região, são encontradas algumas espécies de triatomíneos em focos silvestres, bem como uma considerável circulação do *T. cruzi* entre os vetores e reservatórios (Valente e Valente, 1993; Coura e cols, 1999, 2002; Dias e cols, 2002).

Alguns fatores são considerados pelos pesquisadores que trabalham nesta região como importantes desencadeadores de uma alteração no quadro atual da doença de Chagas humana, que atualmente, ainda é considerada uma enzootia silvestre na região amazônica. Entre esses fatores, estão migrações humanas e o crescente desmatamento da região. A doença apresenta um quadro difuso com casos esporádicos e ainda poucos relatos de triatomíneos encontrados em domicílios (Coura e cols, 1999; Dias e cols, 2002).

Atualmente, são conhecidas 22 espécies de triatomíneos silvestres cohabitando com hospedeiros em vários ecótopos arbóreos e terrestres na Amazônia (Galvão e cols, 2003). Treze espécies estão associadas à transmissão de casos de DCA e sua distribuição se estende na região. *Rhodnius milesi* foi a última espécie descrita em palmeiras de *Maximiliana regia* (inajá) no Estado do Pará, cohabitando com *Rhodnius pictipes* e alimentando-se em marsupiais (*Didelphis marsupialis*), todos infectados com *T. cruzi* (Valente e cols, 2001).

Dentre as espécies relatadas, *R. brethesi* merece uma atenção especial pela possibilidade de estar envolvido em um foco de transmissão silvestre da doença de Chagas em coletores de piaçaba no Alto Rio Negro, Amazonas (Dias e cols, 2002). Em estudos realizados por Coura e cols (1999), indivíduos soropositivos para anticorpos de *T. cruzi*, relataram a presença de triatomíneos em seus locais de trabalho (piaçabais), mencionando também a ocorrência de pessoas picadas nas cabanas utilizadas como abrigo nestas áreas. Entretanto, não houve nenhum relato sobre o encontro de triatomíneos pelos trabalhadores em suas residências na cidade de Barcelos, Amazonas.

Com exceção do *Triatoma rubrofasciata*, os triatomíneos da Amazônia têm hábitos silvestres restritos. Todavia, três gêneros possuem maior importância epidemiológica, podendo-se citar *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. As espécies *R. pictipes*, *Rhodnius robustus* e *P. geniculatus* já foram registradas anteriormente no município de Manaus (Magalhães e cols, 2009). Estas espécies são freqüentemente encontradas com altas taxas de infecção natural pelo *T. cruzi* em diversos ecótopos naturais na Amazônia brasileira, onde esporadicamente invadem as residências (Aguilar e cols, 2007).

R. pictipes é um triatomíneo silvestre de ampla distribuição na América do Sul. Tem sido encontrado no Brasil nos Estados do Acre, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Piauí e Tocantins (Silveira e cols, 1984). Esta espécie foi encontrada naturalmente infectada pelo *T. cruzi*, pelo *Trypanosoma rangeli* e com infecção mista (Otero e cols, 1976). Prevalece em fragmentos florestais da área urbana, com baixa freqüência nos domicílios. No município de São Paulo de Olivença, na região do Alto Solimões, onde foi registrado o primeiro caso de doença de Chagas do Estado do Amazonas, *R. pictipes* foi a espécie predominante no intradomicílio (Fé e cols, 2009).

A espécie *R. robustus* é considerada de importância secundária na transmissão do *T. cruzi* (Fé e cols, 2009). Porém, apresentou a maior taxa de infecção por flagelados, apesar da baixa frequência nos domicílios. Na Venezuela, demonstrou-se que *R. robustus* invade residências e se alimenta em humanos (Feliciangeli e cols, 2002). A baixa taxa de infestação domiciliar por esta espécie sugere que os exemplares abandonam as casas depois da hematofagia ou morrem sem se reproduzir no interior das mesmas (Feliciangeli e cols, 2002).

P. geniculatus foi encontrada apenas no ambiente artificial, mais especificamente no intradomicílio. Esta espécie é um importante vetor silvestre, que invade esporadicamente as residências (Valente e cols, 1998) atraídas pela luz (Miles e cols, 1981) e coloniza abrigos de suínos construídos na proximidade ou contíguos com as habitações humanas no Estado do Pará (Valente e cols, 1998). Nesse contexto, pode contribuir na transmissão domiciliar da doença de Chagas, já que em algumas áreas têm se apresentado com elevadas taxas de infecção natural (Carrasco e cols, 2005).

Triatoma maculata tem sido considerado um vetor potencial de *T. cruzi* na Amazônia, uma vez que apresenta uma capacidade de colonizar ecótopos naturais no peridomicílio (Abad-Franch e Monteiro, 2007). Os padrões ecológicos, de distribuição e preferências de cada espécie necessitam de mais estudos. Os principais mecanismos de adaptação do inseto a ecótopos naturais ainda continuam mal compreendidos (Abad-Franch e Cols, 2009).

O predomínio dos triatomíneos na zona urbana sugere que os fragmentos florestais que persistem em algumas localidades permitem a manutenção do ciclo enzoótico de *T. cruzi*, evidenciando risco de infecção para a população que vive na proximidade destas áreas. Nestes locais, são freqüentes palmeiras das espécies *Orbignya phalerata* (A), *Euterpe oleracea* (B), *Maximiliana maripa* (C), *Oenocarpus* (D), *Mauritia flexuosa* (E) e *Bactris gasipaes* (F) nas áreas de vegetação secundária e áreas desmatadas nos terrenos baixos não inundáveis, inclusive nos quintais das casas, onde se refugiam roedores e marsupiais como *D. marsupialis* e outros hospedeiros de *T. cruzi* (Figura 1).

A presença do *T. cruzi* em animais silvestres da Amazônia brasileira, entre eles marsupiais, quirópteros, roedores, edentados e primatas foi relatada por Barretto (1964) e Deane (1964). As outras classes de vertebrados - aves, répteis, anfíbios e peixes - são refratárias ao *T. cruzi*, no entanto, esses também servem como fonte alimentar para os triatomíneos (Noireau e cols, 2009).

Sob o ponto de vista epidemiológico, os marsupiais têm grande importância, pois apresentam altas taxas de infecção e alta sinantropia, estabelecendo uma ponte entre os ciclos silvestre e domiciliar da infecção. O mesmo se pode dizer em relação aos roedores, pois algumas espécies são também sinantrópicas (Lemos e D'Andrea, 2006).



Figura 1: Principais espécies de palmeiras no Estado do Pará. As palmeiras na mata primária e no peridomicílio têm importância na economia local. Fotos: Perla Fabíola, 2009 (Arquivo Pessoal).

Para que haja transmissão do *T. cruzi* pela via oral é necessária a presença de um vetor infectado em proximidade com o homem (Pinto e cols, 2008). A localização das residências nas proximidades dos ecótopos naturais dos triatomíneos possibilita a invasão esporádica dos domicílios por exemplares adultos, como citada anteriormente por Magalhães e cols (2009). O desmatamento, a redução dos reservatórios silvestres, a proliferação de mamíferos oportunistas (roedores e marsupiais) nos ambientes degradados e a introdução da luz elétrica também são fatores potencialmente relacionados com a ocorrência da doença nesta região (Aguilar e cols, 2007). Destaca-se que não existe nenhum programa sistemático de vigilância entomológica instituído nas localidades estudadas. Porém, pouca ênfase tem sido dada ao aumento exponencial da densidade demográfica na região amazônica, particularmente nas últimas cinco décadas, e sua importância na endemicidade das infecções pelo *T. cruzi* (Teixeira e cols, 2001).

1.7. Aspectos clínicos da doença de Chagas

A doença de Chagas pode ser classificada em fases aguda e crônica. Esta última pode se apresentar em diferentes formas clínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva, mista ou neurológica (Rey, 2002). A fase aguda que segue a entrada do *T. cruzi* no corpo humano requer um período de incubação de 72 horas para que o parasito passe por ciclos de multiplicação na célula hospedeira antes que o sistema imune desencadeie reações inflamatórias na pele (chagoma) ou na conjuntiva dos olhos (lesão endurecida unilateral, bipalpebral conhecida como sinal de Romaña). Essas lesões são vistas em menos de 5% dos indivíduos infectados. A maioria dos casos agudos tem um prognóstico benigno, com remissão completa comumente descrita em um período entre 60 e 90 dias, com ou sem intervenção medicamentosa (Teixeira, 2007). Na Amazônia, são poucos os casos agudos que apresentam sinais de porta de entrada. Às vezes encontram-se lesões cutâneas exantemáticas, em forma de placas pruriginosas, ou nódulos subcutâneos. Esses achados são raramente observados em outras regiões (Valente e Valente, 1993).

A fase aguda pode ser assintomática em 95% dos casos. Nos casos sintomáticos, as manifestações clínicas, tais como astenia, mialgias, calafrios, diarreia, vômitos, cefaléia, dispnéia, edema de face e de membros inferiores

são os achados principais. Com exceção desses dois últimos, os demais sinais e sintomas são inespecíficos e podem dificultar o diagnóstico diferencial entre a doença de Chagas e outras endemias prevalentes na região Amazônica, especialmente malária, febre tifóide e dengue. Em todos esses casos o sinal mais freqüente é a febre (Pinto e cols, 2001).

O comprometimento cardíaco está entre as mais sérias e freqüentes manifestações da doença de Chagas aguda, sendo importante causa de morte (Rossi e cols, 2003). Na Amazônia, o único relato de meningoencefalite ocorreu no município de Tefé, Estado do Amazonas, obtendo evolução favorável, após a terapêutica específica associada à corticosteróides (Lacerda e cols, 2005).

Na forma indeterminada, não há lesão macroscópica significativa no coração ou no tubo digestivo. Esta forma pode durar décadas, os indivíduos apresentam evidências sorológicas e é caracterizada pela baixa parasitemia, pela presença de formas amastigotas quiescentes do parasito no tecido muscular e pela dificuldade na detecção do agente infeccioso. Os fatores responsáveis pela transição da forma indeterminada para formas sintomatológicas na fase crônica ainda não foram elucidados (Teixeira, 1987; Cunha-Neto e cols, 2006).

Após o estabelecimento do equilíbrio dinâmico entre o parasito e as defesas do hospedeiro, pode se desenvolver a fase crônica da doença. Durante esta fase, vários mecanismos têm sido propostos para explicar o desenvolvimento da patologia, pois a presença escassa do parasita é desproporcional ao dano tecidual. Um aspecto marcante no curso da doença de Chagas crônica é a variabilidade de suas manifestações clínicas e eletrocardiográficas. Em 94,5% dos casos os sintomas são cardíacos e, em 4,5% dos casos, ocorrem mega-síndromes do aparelho digestório, ambas relacionadas a lesões no sistema nervoso simpático e parassimpático (Teixeira, 2007). A cardiopatia crônica foi descrita em Barcelos e na região do Rio Negro, Estado do Amazonas, onde havia relatos de pessoas picadas por triatomíneos em piaçabais (Albajar e cols, 2003). Os fatores que influenciam na diversidade clínica ainda não foram esclarecidos, mas é provável que a variabilidade genética do parasita e do hospedeiro sejam importantes (Teixeira, 2007).

1.8. Métodos de diagnóstico da infecção chagásica

Na fase aguda, recomenda-se a pesquisa direta do parasito, devido à alta parasitemia típica desta fase. Porém, a desvantagem principal destes métodos é a baixa sensibilidade, quando a quantidade de parasitos circulantes é decrescente (Gomes, 1996). Os métodos parasitológicos diretos baseiam-se na verificação da presença de formas tripomastigotas do *T. cruzi* em amostras de sangue. Um dos mais simples é o método a fresco, onde uma gota do sangue é examinada entre lâmina e lamínula. Essa preparação permite a detecção do parasito mais facilmente, em virtude de sua motilidade entre as hemácias (Luquetti e Rassi, 2000). O esfregaço do sangue não oferece vantagens devido a sua baixa sensibilidade, e atualmente prefere-se o exame a fresco (Rassi, 1992). O exame do sangue na gota espessa tem sensibilidade maior que seu exame a fresco ou no esfregaço. As técnicas de coloração permitem diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli* nas regiões onde as infecções coexistem (Luquetti e Rassi, 2000).

Métodos de concentração do parasito aumentam a sensibilidade do diagnóstico parasitológico. Os mais utilizados são o microhematócrito e o método de Strout. O microhematócrito aumenta a sensibilidade da pesquisa do *T. cruzi*, mas as medidas de biossegurança precisam ser observadas (MS, 1997). O método de Strout (1962) apresenta resultados de até 96,2% de positividade em casos agudos recentes (Camargo e Takeda, 1979).

Na fase aguda, xenodiagnóstico e hemocultura têm grandes chances de positividade. O xenodiagnóstico foi descrito por Brumpt (1914) e revisto por Dias (1940) e Schenone (1968). O procedimento consiste na detecção de parasitos nas fezes e/ou conteúdo intestinal de insetos vetores (hemípteros da subfamília Triatominae) sabidamente negativo. A sensibilidade do xenodiagnóstico é de 100% para os casos agudos e de 20-50% para os crônicos (WHO, 1991). No entanto, estudos mostraram que a sensibilidade pode variar de 9 a 87,5% (Barbosa e cols, 1983). Devido à hipersensibilidade causada pela picada dos insetos, foi desenvolvido o xenodiagnóstico artificial. Neste exame, o sangue do indivíduo é colocado no interior de uma película de borracha (luva cirúrgica ou similar) e os insetos fazem seu repasto (Barbosa e cols, 1983).

Na hemocultura, as taxas de positividade ficam entre 0 e 94% (Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda, 2003). Apresenta baixa sensibilidade, cerca de 50% dos casos crônicos, porém a especificidade é alta e inquestionável. Aprimorada por Chiari e cols (1989), a hemocultura é mais aceita que o xenodiagnóstico por parte do paciente, mas também é demorada, devendo ser colhida uma quantidade mínima de 30 mL de sangue para se obter êxito maior. Se o pesquisador repete o exame no paciente, maiores serão as chances de se obter um resultado positivo (Chiari, 1999).

Na fase aguda e nas formas crônicas da doença de Chagas, os métodos sorológicos de diagnóstico são a hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*- ELISA).

Na fase crônica da doença, o diagnóstico parasitológico pode não ser obtido devido à baixa parasitemia. Sendo assim, o diagnóstico indireto é feito pela demonstração do anticorpo específico. A primeira pesquisa de anticorpos fixadores do complemento foi realizada em 1913, por Guerreiro e Machado. O teste ficou conhecido como reação de Machado-Guerreiro. Este método foi o único teste sorológico para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* durante 50 anos (Fiocruz, 2009). Apesar de Almeida e Fife (1976) terem realizado padronizações nesta técnica, hoje ela caiu no desuso. Atualmente, o teste ELISA, com antígeno total ou frações parcialmente purificadas, ou antígenos recombinantes do parasito e a IFI sobre o parasito fixado em formol são recomendados (Gadelha, 2003; MS, 2005).

A HAI proposta por Cerisola e cols (1962), mesmo apresentando alto índice de sensibilidade em soros de pacientes na fase crônica, apresenta reatividade cruzada com soros de indivíduos com leishmanioses (Camargo e Hoshino-Shimizu, 1974). Ademais, a utilização do 2-mercaptol-etanol (2ME) para eliminar anticorpos inespecíficos de classe IgM que podem induzir resultados falso positivos é outra desvantagem da técnica, devido à sua toxicidade (Ferreira e Ávila, 2001).

A IFI tem sido usada desde a década de 1960 (Fife e Muschel, 1959) como a técnica de maior sensibilidade em comparação com a reação de Machado-Guerreiro (Cerisola e cols, 1971), muito embora reações cruzadas com anticorpos contra hanseníase, tuberculose, *T. rangeli*, sobretudo leishmanioses, tenham sido verificadas na região do rio Negro, Amazonas (Coura e cols, 1999).

A técnica imunoenzimática (ELISA), descrita por Voller e cols (1975), tem mostrado uma sensibilidade de 97,7 a 100% e especificidade de 93,3 a 100%, mas também apresenta reação cruzada com leishmanioses (Gomes e cols, 2001). Em virtude da necessidade de melhorar o desempenho concomitante da sensibilidade e especificidade, através do ELISA para a doença de Chagas, diferentes antígenos têm sido testados, entre eles os antígenos não-purificados (Cannova e cols, 2002), purificados (Schechter e cols, 1985), secretados-excretados (Umezawa e cols, 2001) e recombinantes (Umezawa e cols, 2003) mostrando excelente desempenho (Franco da Silveira e cols, 2001).

Se por um lado o emprego de apenas um antígeno recombinante deixaria de diagnosticar alguns indivíduos portadores da infecção chagásica, por outro, alguns trabalhos mostraram a melhoria da sensibilidade quando antígenos recombinantes foram associados (Krieger e cols, 1992). Dentre os purificados imunodominantes, se destaca uma glicosilfosfatidilinositol ancorada do tipo mucina que, quando isolada a partir de formas tripomastigotas do *T. cruzi* propicia altos índices de sensibilidade e especificidade, através da técnica de quimioluminescência-ELISA (CL-ELISA), quando comparada aos resultados qualificados como inconclusivos, pela divergência entre negatividade e positividade da HAI, IFI e ELISA convencionais (Almeida e cols, 1997).

A técnica de *Western blotting* (WB) ou *immunoblotting* utiliza antígenos secretados e excretados (Umezawa e cols, 1996) de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TESA- Blot). O TESA- Blot foi definido como um método sensível nos casos de doença de Chagas aguda e congênita, apresentando 100% de sensibilidade e 96% de especificidade (Gadelha, 2003). A desvantagem é o custo elevado e a necessidade de manipulação de formas tripomastigotas para a obtenção do antígeno TESA.

Descrita por Mullis e Faloona (1987), a PCR (*Polymerase Chain Reaction-PCR*) acoplada à hibridação com sondas moleculares poderá ser utilizada como teste confirmatório, tanto na fase aguda como nas formas crônicas da doença de Chagas (MS, 2005). Caso ocorra inespecificidades nos diagnósticos sorológicos, a PCR pode ser empregada como diagnóstico laboratorial complementar, entretanto esta técnica exige uma maior atenção e cuidado na interpretação dos resultados com base em seqüências aneladoras (*primers*) provenientes do DNA mitocondrial do *T. cruzi* (Teixeira e cols, 2006).

2. *Trypanosoma cruzi*

2.1. Ciclo de vida e interação parasito-célula

O *T. cruzi* agente etiológico da doença de Chagas é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, que parasita mamíferos e tem como hospedeiros invertebrados várias espécies de hemípteros hematófagos da família Reduviidae (Chagas, 1909) e subfamília Triatominae (Figura 2). Os mecanismos de invasão da célula hospedeira, multiplicação intracelular e disseminação são fundamentais no ciclo de vida do parasito. A maneira como o parasito se comporta em cada uma destas fases é fator determinante para o curso da infecção (Teixeira e cols, 2006).

O ciclo evolutivo do parasita tem início quando um inseto vetor, ao se alimentar, elimina nas fezes formas tripomastigotas metacíclicas que entram na pele ou na mucosa lesada pela picada. A forma tripomastigota é capaz de invadir todos os tipos de células, com exceção das hemácias (Zingales e cols, 1985).

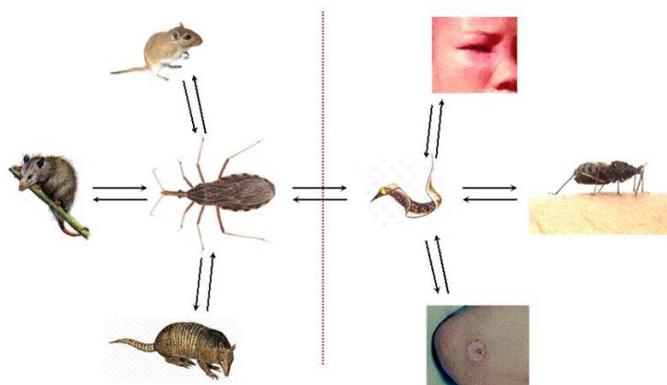


Figura 2: Ciclos de vida silvestre e peridomiciliar do *T. cruzi* (Teixeira e cols, 2006).

Diversas moléculas da célula hospedeira e do parasito, que diferem de acordo com a linhagem do *T. cruzi*, estão envolvidas no processo de adesão e invasão de *T. cruzi* (Yoshida, 2006; Yoshida e Cortez, 2008). Duas vias de invasão são descritas *in vitro*, dependente e independente de lisossomas. Na primeira, o parasita invade a célula utilizando-se do mecanismo natural de reparo da membrana plasmática e de vias de sinalização de cálcio para a fusão de lisossomas. A segunda via envolve a invaginação da membrana plasmática formando um vacúolo e subsequente fusão com os lisossomas, sem a polimerização de actina da célula hospedeira. Um evento fundamental nessas vias de invasão é a mobilização de Ca^{2+} da célula hospedeira pelas formas tripomastigotas, essencial no rearranjo do citoesqueleto e recrutamento de lisossomos (Andrade e Andrews, 2005; Yoshida, 2006; Mott e Burleigh, 2008).

Após a entrada do parasita na célula, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas e escapam do vacúolo, começam o processo de multiplicação e após diversas divisões, as formas amastigotas se diferenciam em um estágio intermediário, o epimastigota intracelular (Almeida-de-Faria e cols, 1999) e depois em tripomastigotas, quando ocorre a lise celular liberando-os para o meio extracelular, podendo então invadir células vizinhas, ir para a corrente sanguínea e atingir outros tecidos, ou ainda, infectar um inseto vetor durante o processo de hematofagia, recomeçando o ciclo no hospedeiro invertebrado.

Já foi identificada a presença de formas epimastigotas na glândula anal de gambás e formas amastigotas foram encontradas no trato intestinal do hospedeiro invertebrado (De Souza, 2002). No hospedeiro invertebrado, as formas tripomastigotas ao chegarem ao tubo digestivo, se diferenciam em epimastigotas e migram para o intestino onde ocorre a divisão binária. Ao atingirem a porção terminal do tubo digestivo, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados juntamente com as fezes e urina do triatomíneo (De Souza, 2002).

2.2. O DNA mitocondrial (kDNA)

Os tripanossomas têm estrutura característica em forma de disco em sua única mitocôndria localizada numa região especializada, adjacente ao corpúsculo basal do flagelo. Esta organela, designada de cinetoplasto, é constituída por um intrincado arranjo de DNA, único entre os eucariotos (Figura 3), que concentra entre 20 e 25% do conteúdo total de DNA da célula (Simpson e cols, 2006). A arquitetura singular de moléculas circulares de DNA do cinetoplasto (kDNA) é composta por maxicírculos e minicírculos, organizados em rede concatenada e altamente condensada (Thomas e cols, 2007).

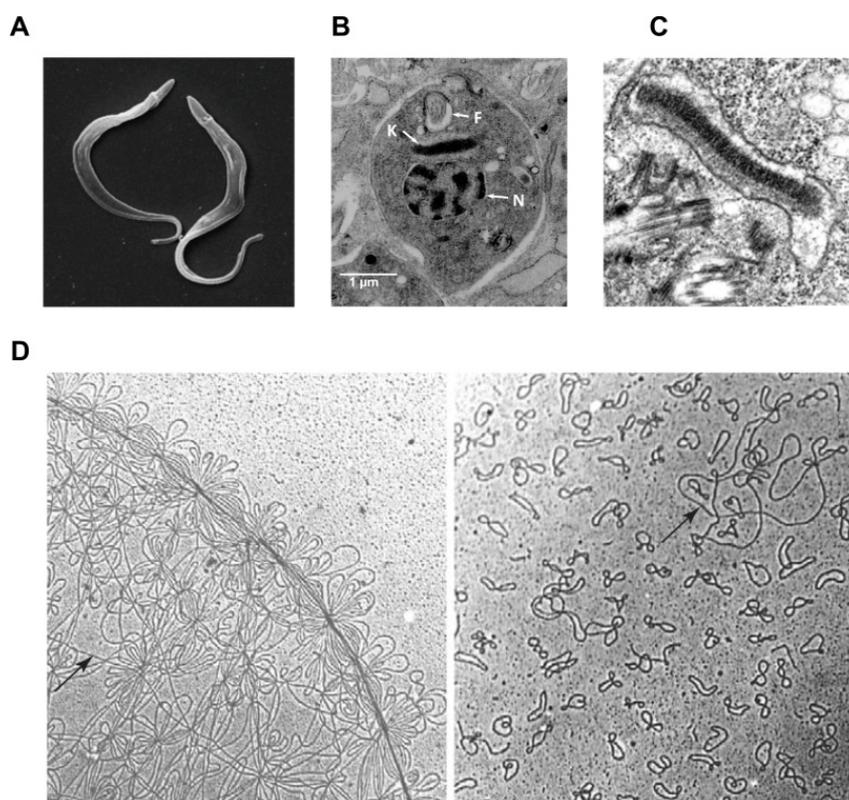


Figura 3: Ultraestrutura do *Trypanosoma cruzi*. **A**: Microscopia de varredura de tripomastigotas de *T. cruzi* (Menna-Barreto e cols, 2009). **B**: Microscopia eletrônica de amastigota de *T. cruzi* dentro de uma célula muscular (Teixeira e cols, 2011a). **C**: Cinetoplasto e base do flagelo de uma forma tripomastigota de *Trypanosoma brucei* (Liu e cols, 2005). **D**: À esquerda, rede de kDNA de *Crithidia fasciculata* contendo maxicírculos (seta) e minicírculos. À direita, kDNA tratado com topoisomerase II (Liu e cols., 2005). K, cinetoplasto; N, núcleo; F, flagelo.

Os maxicírculos são macromoléculas com tamanho variando entre 21 a 39 kb, presentes em algumas dúzias de cópias por parasita (Westenberger e cols, 2006). Além disso, suas seqüências apresentam consideráveis variações tanto entre diferentes espécies de tripanossomatídeos como entre cada linhagem (Westenberger e cols, 2006). A expressão dos genes codificadores das proteínas de maxicírculos é bastante complexa, sendo os RNAs transcritos dependentes de um processamento denominado edição de RNA (RNA editing). Este mecanismo é responsável pela formação de mRNAs mitocondriais com códons de iniciação e de terminação corretos e com fases de leitura aberta (Roy e cols, 2007).

Os minicírculos do *T. cruzi* existem em milhares de cópias que possuem aproximadamente 1,4 kb de tamanho. Cada minicírculo tem quatro regiões com seqüência conservada de 122 pb, intercaladas por quatro seqüências variáveis de aproximadamente 238 pb. As regiões variáveis têm altíssima dissimilaridade num mesmo ou em minicírculos diferentes. Cada região variável transcreve, potencialmente, uma molécula de RNA guia (gRNA). Esses gRNAs estão envolvidos na editoração dos mRNAs dos maxicírculos, única função conhecida dos minicírculos (Rogers e cols, 2007).

A replicação do minicírculo é um processo já bem estudado. O minicírculo não se replica quando está ligado a rede, sendo necessária a liberação por uma topoisomerase II para a replicação livre. A replicação da fita contínua do minicírculo utiliza o DNA polimerase mitocondrial, enquanto que a replicação da fita complementar é iniciada por múltiplos *primers* de RNA sintetizados pela DNA primase. Um grande número de proteínas adicionais está envolvido na replicação do minicírculo. A proteína universal (UMSBP) abundante liga-se especificamente à origem de replicação do minicírculo. O monômero da USBP, junto com a DNA primase, a DNA polimerase e a RNA polimerase agrega-se à origem de replicação, iniciando este processo. Após a replicação, os minicírculos são reintegrados à rede por uma reação também mediada pela topoisomerase II (Lukes e cols, 2005). As informações sobre a replicação dos maxicírculos são escassas. Sabe-se que maxicírculos e minicírculos iniciam a replicação unidirecional em região não-codante. Porém, ao contrário dos minicírculos, os maxicírculos não se separam da rede durante a replicação (Liu e cols, 2005).

3. Patogênese

3.1. Resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

A resposta imunológica que se segue à infecção pelo *T. cruzi* é bastante complexa, envolvendo o reconhecimento de antígenos do parasito por uma série de receptores de membrana e a ativação de diferentes tipos celulares (Tarleton, 2007). Ao primeiro sinal de infecção, moléculas derivadas do parasito, tais como as GPI-mucinas, são capazes de estimular a síntese de citocinas pró-inflamatórias, bem como de quimiocinas por macrófagos do hospedeiro (Teixeira e cols, 2002).

A resposta imune inata é considerada muito importante na indução da resistência ao parasito nas fases iniciais da infecção. Nesta fase, as células *natural killer* (NK) são primordiais no controle do parasito através da secreção de INF- γ , citocina esta que irá estimular a síntese de IL-12 por macrófagos e a diferenciação celular para o perfil Th1. Desta forma, as células NK são a primeira fonte de INF- γ , antes mesmo do desenvolvimento de uma resposta mediada por células (Brener e Gazzinelli, 1997).

Os macrófagos são células do sistema fagocitário mononuclear que agem como células efectoras, através da produção de óxido nítrico e de intermediários reativos de oxigênio; além disso, produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e TNF- α , relevantes na ativação celular (Brener e Gazzinelli, 1997; Dutra e cols, 2005). A atividade dos macrófagos na eliminação do *T. cruzi* é potencializada por algumas citocinas, tais como INF- γ e TNF- α , as quais agem sinergicamente sobre estas células, estimulando os mecanismos citotóxicos, capazes de reduzir significativamente a replicação do parasito, estabelecendo desta forma, um perfil de resposta Th1 (Brener e Gazzinelli, 1997; Teixeira e cols, 2002).

O INF- γ desempenha um papel relevante durante a infecção pelo *T. cruzi*, estando associado tanto ao controle do parasito quanto aos mecanismos que desencadeiam os fenômenos imunopatológicos da doença de Chagas. A produção exacerbada desta citocina poderá desencadear uma inflamação excessiva resultando em danos teciduais para o hospedeiro (Brener e Gazzinelli, 1997; Bahia-Oliveira e cols, 2000; Soares e cols, 2001; Dutra e cols, 2005).

Diante do papel dual do INF- γ , as citocinas do tipo Th2, irão contribuir para regulação da resposta imune frente à infecção, reduzindo desta forma, os danos teciduais induzidos pelo processo inflamatório. As citocinas IL-10 e IL-4 são moléculas reguladoras que possuem funções imunossupressoras, agindo através da inibição da ativação de macrófagos e da síntese de óxido nítrico (Dutra e cols, 2005). Abrahamsohn e Coffman (1996) demonstraram que camundongos *Knock-out* (KO) para IL-10, quando infectados pelo *T. cruzi*, apresentavam baixa parasitemia nas fases iniciais da infecção; provavelmente devido à ação de citocinas inflamatórias, como INF- γ , IL-12 e TNF- α , demonstrando desta forma o papel regulador da IL-10.

Portanto, é possível que o balanço entre as respostas Th1 e Th2 seja necessário para determinar o curso da infecção pelo *T. cruzi*, de forma que uma alteração neste equilíbrio poderá contribuir para o desenvolvimento dos fenômenos imunopatológicos da doença de Chagas. Muitos estudos têm sido realizados para verificar a importância da resposta celular na doença de Chagas. As células T têm sido associadas à reatividade imune contra o parasito, compreendendo a maioria das células do infiltrado inflamatório no coração de chagásicos (Dutra e cols, 2005). As células T CD4⁺ Th1, são responsáveis pela produção de citocinas que irão auxiliar os macrófagos na destruição do parasito (DosReis, 1997). Estas células podem contribuir como a maior fonte de INF- γ para a ativação de macrófagos e linfócitos T CD8⁺, o qual exerce um papel importante nos mecanismos de citotoxicidade (Brenner e Gazzinelli, 1997).

As células T CD8⁺, além de exercerem um papel citotóxico contra células do hospedeiro, têm sido consideradas importantes em mecanismos protetores, principalmente na fase aguda da infecção, na qual, juntamente com macrófagos e INF- γ , têm sido apresentadas como elementos no controle da proliferação do parasito (Brenner e Gazzinelli, 1997). Os linfócitos T CD8⁺ têm sido associados à imunopatologia da doença de Chagas, já que representam a maioria das células do infiltrado inflamatório cardíaco, observada nos estágios tardios da doença (Teixeira e cols, 2011a).

3.2. Doença de Chagas e Autoimunidade

Muitos esforços têm sido empregados na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos na gênese e perpetuação da miocardite chagásica. Nas últimas décadas, vários questionamentos sobre o papel do parasito e seus antígenos na patogênese da cardiopatia chagásica têm sido colocados num segundo plano porque uma teoria genética da origem autoimune explica a maioria dos fatores associados com a miocardite chagásica crônica (Kalil e Cunha-Neto, 1996).

Um dos aspectos mais intrigantes da doença de Chagas crônica são os processos inflamatórios intensos e a ausência do parasito nas lesões, (Andrade, 1983 e 1991; Andrade e cols, 1994). Por um lado, a teoria da persistência do parasito não explica por que os chagásicos não morrem quando o parasitismo é intenso na fase aguda da infecção e, também, por que mais de dois terços dos chagásicos crônicos sequer têm lesões com manifestações clínicas. Por outro lado, a rejeição acelerada de células cardíacas alogênicas pelos linfócitos imunes de coelhos chagásicos sustenta a teoria autoimune (Santos-Buch e Teixeira, 1974; Teixeira e cols, 1975). Os dados experimentais mostraram que células embrionárias de coração de coelhos eram rapidamente destruídas pelos linfócitos imunes em uma hora, enquanto os linfócitos de coelhos controle, não infectados, não as destruíam (Teixeira, 2007).

Cunha-Neto e cols (1986) contribuíram com dados que confirmam a autoimunidade na doença de Chagas. Eles relataram que a miosina cardíaca induzia a proliferação de clones de células T CD4⁺, derivados de infiltrados nas lesões cardíacas em pacientes chagásicos crônicos. Ribeiro dos Santos e cols (1992) mostraram que o enxerto de coração de feto de camundongo em receptor chagásico isogênico pode ser destruído pelas células do sistema imune, enquanto que camundongos sadios não rejeitam o enxerto histocompatível.

Seguindo outra vertente, a autoimunidade da doença de Chagas seria desencadeada pelos antígenos do *T. cruzi* via epítomos de reação cruzada ou mimetismo molecular. Resposta cruzada entre epítomos do hospedeiro e antígenos do parasito levaria a resposta imune a reagir contra proteínas do próprio tecido. A discussão sobre as teorias da patogênese da doença de

Chagas é encontrada em extensos trabalhos de revisão da literatura (Leon e Engman, 2003; Tarleton, 2003). Em resumo, a teoria da persistência do parasito sugere que as lesões chagásicas são produzidas pelo parasito e a inflamação é secundária a destruição mecânica das fibras parasitadas. Em contraposição, a teoria autoimune sugere que a rejeição do coração é um fenômeno que ocorre independentemente da fibra cardíaca estar ou não parasitada. Contudo, a persistência do parasito pode ser importante na indução de alterações genótípicas essenciais na patogênese da doença de Chagas (Teixeira, 2007).

4. DNA repetitivo

Na maioria dos organismos, uma grande porção do genoma é composta de múltiplas cópias de DNA, conhecidas como DNA repetitivo. Em humanos, apenas 3% do genoma é composto por genes que codificam cadeias polipeptídicas; 50% do genoma não-codificador são representados por seqüências repetitivas de DNA (Han e cols, 2007). Enquanto algumas seqüências repetidas possuem uma função clara, tais como DNAs ribossomais, centroméricos e teloméricos, ainda não se sabe ao certo qual o papel de grande parte do DNA repetitivo, até pouco tempo considerado como “DNA lixo” (Schmidt e Heslop-Harrison, 1998). Entretanto, evidências recentes sugerem que o DNA repetitivo tem suma importância para a manutenção e estrutura do genoma cuja abundância deve-se a um processo ancestral prévio à divergência das primeiras linhagens de eucariotos (Jurka e cols, 2005). Diferentes estudos têm sugerido o envolvimento de seqüências repetitivas no processo de replicação do DNA, recombinação, expressão gênica e diferenciação de cromossomos sexuais (Pokorna e cols, 2011), ou seja, na organização estrutural e funcional do genoma em geral (Biémont e Vieira, 2006). Essas seqüências repetidas podem também estar envolvidas em rearranjos cromossômicos, tais como deleções, duplicações, inversões e translocações, sendo responsáveis por proporções significativas das variações genômicas observadas (Kidwell, 2002).

No genoma de eucariotos existem, de modo geral, dois diferentes tipos de segmentos de DNA repetitivo: seqüências altamente repetitivas (fração do DNA constituída por seqüências que se renaturam rapidamente; compreendem até 10^5 cópias/genoma) e seqüências moderadamente repetitivas (compreendem 10 a 100 cópias/genoma) (Britten e Kohne, 1968). Estes segmentos de DNA repetitivo são também freqüentemente classificados em duas principais classes: (1) repetições em *tandem*, como os satélites, minissatélites, microssatélites e os genes de histonas que se agrupam em famílias multigênicas e (2) elementos dispersos, como SINE's (*Short Interspersed Elements*) e LINE's (*Long Interspersed Elements*) (Jurka e cols, 2005).

Inseridos no grupo de seqüências repetitivas curtas e longas, encontram-se os elementos transponíveis (TEs), que correspondem a elementos móveis, ou seja, que possuem habilidade de se mover no genoma, sem qualquer obrigatoriedade reconhecida de homologia relacionada com o sítio-alvo de posicionamento novo (Burns e Boeke, 2012). A identificação e caracterização destes elementos se tornaram de grande importância para melhor compreensão de seu papel na organização e evolução do genoma (Böhne e cols, 2008).

4.1. Estrutura e Classificação de Elementos Transponíveis

Os elementos transponíveis são classificados de acordo com sua organização estrutural e mecanismo de transposição. Os elementos da classe I, ou retrotransposons, se transpõem via um intermediário de RNA e utilizam a transcriptase reversa. Já na classe II, ou transposons, utilizam uma transposase para transpor um DNA intermediário (Wicker e cols, 2007).

Os retrotransposons são divididos em duas subclasses, os que possuem LTR (*Long Terminal Repeats*) e os que não contêm LTR (Figura 4). Os retrotransposons LTR são elementos estruturalmente similares aos retrovírus. Possuem longas repetições nucleotídicas nas extremidades 5' e 3' que flanqueiam uma região central conhecida por ORF (*Open Reading Frame*). A ORF denominada *gag*, produz uma poliproteína integrante do capsídeo dos retrovírus. A outra ORF constitui-se do gene *pol* que codifica as enzimas necessárias à transposição do elemento: protease, transcriptase reversa,

RNAse H e integrase. A última ORF presente em algumas famílias desta classe, podendo ou não produzir uma proteína funcional, corresponde ao gene *env*, que codifica a proteína do envelope viral nos retrovírus. As LTR's são necessárias para a transcrição e incorporação do elemento no outro local (Böhne e cols, 2008).

Os retrotransposons não-LTR podem ser divididos em duas superfamílias. Estes incluem os LINE's, que codificam as proteínas necessárias para a transcrição reversa e os SINE's, que não codificam as proteínas necessárias para a transcrição reversa, precisando de outros elementos móveis para sua transposição (Böhne e cols, 2008). Estes elementos também podem ser chamados, respectivamente, de autônomos e não autônomos.

Os elementos LINE-1 ou L1 de humano possuem ~6 kb e sua estrutura contém uma região 5' não traduzida (UTR), duas fases de leitura aberta (ORF's) e uma região 3' UTR que se continua na cauda poli-A (Figura 4). A ORF1 codifica uma proteína de ~40 kDa (ORF1p), que tem afinidade por RNA e que é essencial para retrotransposição de L1 (Martin, 2006). A ORF1p tem domínio amino terminal enovelado "*coiled-coil*", uma região de reconhecimento localizado centralmente no RNA, e um domínio básico carboxi terminal (Moran e cols, 1996). A ORF1p está ligada aos ácidos nucléicos com atividade chaperona, a qual pode ser importante para a integração de L1 (Martin e Bushman, 2001). A ORF2 codifica uma proteína de ~150 kDa (ORF2p), que tem atividade de endonuclease e transcriptase reversa (Martin, 2006). A ORF2p contém também um domínio rico em cisteína de função desconhecida próximo da sua porção carboxi terminal, que é necessária para retrotransposição (Moran e cols, 1996).

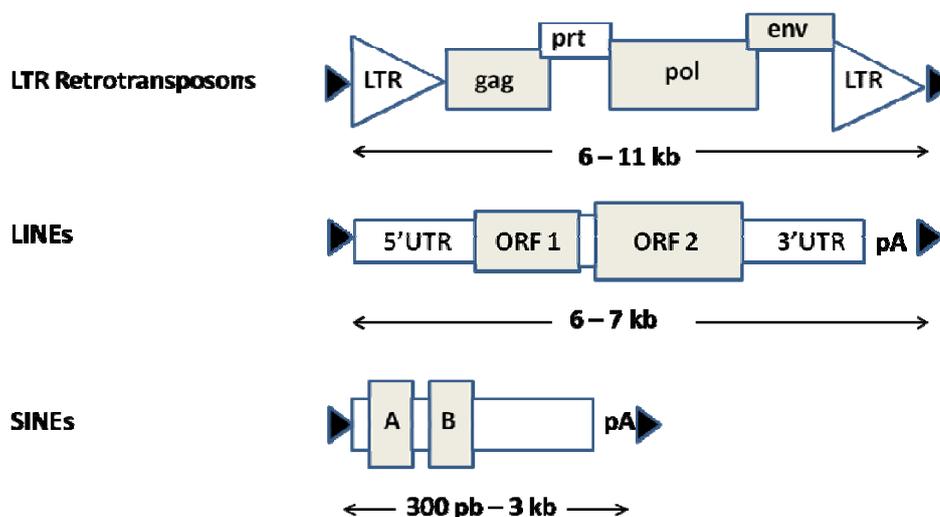


Figura 4: Estrutura dos elementos retrotransponíveis. Retrotransposons LTR: genes *gag* (group-specific antígeno), *pol* (polimerase) e *env* (envelope). Retrotransposons não-LTR: LINE's e SINE's. Elementos SINE's são constituídos de monômeros semelhantes (A e B) com cauda poli-A (adaptado por Babushok e Kazazian, 2007).

Em geral, os SINE's possuem tamanho entre 100 a 500 pb. Dentre os SINE's as seqüências do tipo *Alu* são os mais presentes no genoma primata. A família *Alu* é composta de seqüências curtas com 300 pb. Tem sido estimado que haja em torno de 1.000.000 cópias da família *Alu* no genoma humano (Biémont e Vieira, 2006).

Os elementos *Alu* possuem duas seqüências monoméricas derivadas de SRP (*signal recognition particle*) 7SL RNA (Batzer e Deininger, 2002). Os *Alus* ativos tem ~280 pb e são ricos em adenosina (A) na porção final da cauda. O monômero esquerdo contém um promotor interno para a RNA polimerase III e é separado do monômero direito por uma seqüência rica em A (Figura 4). Entretanto, flanqueando seqüências genômicas, eles também podem influenciar iniciação e término da transcrição de *Alu*. As caudas poli-A flanqueando elementos *Alu*, podem servir como uma fonte geradora de seqüências microssatélites no DNA humano (Comeaux e cols, 2009).

4.2. Impactos dos Elementos Transponíveis no Genoma Hospedeiro

4.2.1. Retrovírus Endógenos: HERV's

Os elementos contendo LTR's, como por exemplo, retrovírus endógenos humano (HERV's), assemelham-se a retrovírus tanto na sua estrutura como nos mecanismos de mobilidade. Os HERV's e seus derivados não-autônomos compreendem ~ 8% do genoma humano (Lander e cols, 2001).

Embora existam vários LTR's no genoma dos eucariotas, apenas quatro classes se encontram representadas no genoma humano: HERV I, II, III, e MalR. Todos os HERV's, específicos do genoma humano, pertencem à subfamília HML-2 (família HERV-K). Este é um dos maiores grupos de HERVs encontrado no genoma humano, e é representado por cerca de 170 provírus completos e 2000 LTR's (Khodosevich e cols, 2002). Atualmente considera-se que a superfamília HERV-K representa um dos HERV's mais ativos, sendo mesmo capaz de produzir partículas virais (Nelson e cols, 2004). A expressão de HERV's, bem como a regulação de genes do hospedeiro por promotores provirais, é muito mais freqüente em células germinativas, testículos e placenta (Cohen e cols, 2009).

Transcritos de HERV-K, foram relacionados a patologias de diferentes tipos de células tumorais (Serafino e cols, 2009), em desordens neurológicas, como esquizofrenia e transtorno bipolar (Frank e cols, 2005), diabetes tipo I (Marguerat e cols, 2004), doenças autoimunes (Christensen, 2005) e em infecções por vírus exógenos (Kwun e cols, 2008). Uma real associação entre expressão de HERV com o desenvolvimento ou progressão dessas doenças nunca foi estabelecida, permanecendo a questão se a superexpressão de HERV's é causa ou simplesmente consequência da alteração da malha gênica celular, que ocorre pelo estresse das patologias (Moyes e cols, 2007).

Por outro lado, existe o argumento de que a superexpressão, ou expressão diferencial de retrovírus endógenos talvez não traga apenas consequências deletérias para o hospedeiro, em diversas situações: LTR's provirais funcionando como promotor alternativo de genes do hospedeiro (Landry e Mager, 2003), epítomos de HERV's recrutando células T CD8⁺ em situações de infecções exógenas (Garrinson e cols, 2007) e em proteínas provirais participando de diferenciação de tecido placentário (Ono e cols, 2006).

4.2.2. Retrotransposons autônomos: LINE's

Os elementos LINE's são os únicos retrotransposons autônomos e compreendem 17% do DNA humano (Lander e cols, 2001). As estimativas para inserções de L1 sugerem a frequência de 1:20 a 1:200 nascimentos, dependendo do método usado na análise (Xing e cols, 2009). Desde a sua descoberta, cerca de 70 mutações mediadas por eventos de retrotransposição relacionados a doenças em humanos foram atribuídas a L1 (Goodier e Kazazian, 2008). Os elementos L1 podem ser estratificados em várias subfamílias (pre-Ta, Ta-0, Ta-1, Ta1-d, Ta1-nd). As doenças relacionadas com L1 das subfamílias Ta (Goodier e Kazazian, 2008) incluem hemofilia A, distrofia muscular de Duchenne, tumores de esôfago e câncer de mama (Biémont e Vieira, 2006). Além disso, elementos L1 agem como moduladores da expressão de genes e contribuem para a inativação do cromossomo X (Volf, 2006).

Além de atuar como agente mutagênico da linhagem germinativa, estudos têm revelado que a retrotransposição de L1 também ocorre em certas células somáticas. A inserção de L1 mutagênico no gene da APC (*Adenomatous polyposis coli*) foi visto em tumor coloretal, sem comprometimento de tecidos não tumorais adjacentes (Miki e cols, 1992). Foram descritos 9 eventos de retrotransposição de L1 em células somáticas em 6 de 20 casos de câncer de pulmão (Iskow e cols, 2010). Células tumorais com eventos de retrotransposição de L1 exibiam hipometilação, sugerindo correlação entre mudanças epigenéticas e retrotransposição de L1 em tumores. A hipometilação de L1 na região 5' UTR observada em células malignas e tecidos cancerígenos tem relação com o aumento de mRNA L1 e/ ou expressão de ORF1p (Belancio e cols, 2010).

4.2.3. Retrotransposons não-autônomos: SINE's

O SINE mais abundante em humanos é chamado de *Alu* porque contém um sítio alvo para a enzima de restrição *Alu*. A família *Alu* compreende 10% do genoma diplóide (Lander e cols, 2001). As estimativas sugerem que os elementos *Alu* são os retrotransposons mais ativos no genoma humano, visto que novas inserções ocorram de 1 a cada 20 nascimentos (Xing e cols, 2009).

Assim como os LINE's, os *Alu* podem ser divididos em subfamílias. Estas são classificadas de acordo com a idade em “velhas, intermediárias e jovens”, sendo que as duas mais velhas (Jo e Jb) surgiram de eventos de retrotransposição independentes em único *Alu* ancestral, ~81 milhões de anos atrás (Kapitonov e Jurka, 1996). Alguns elementos *Alu* da subfamília jovem (~1.200 elementos) teria se inserido no genoma humano recentemente e são dimórficos pela presença ou ausência de inserção (Batzler e Deininger, 2002).

Os elementos *AluY*, principalmente os membros das subfamílias Ya5 e Yb8, contribuem para a grande maioria das inserções responsáveis por doença em humanos (Carroll e cols, 2001). Dois mecanismos principais podem causar doenças genéticas humanas: inserções de elementos *Alu* dentro de genes (0,1%) e eventos de recombinação homóloga desigual entre repetições *Alu* (0,3%) (Carroll e cols, 2001). Os *Alu* são utilizados também na prática forense (Mamedov e cols, 2010) e tem influência multifatorial no câncer (Zhang e cols, 2010).

4.2.4. Retrotransposons não-autônomos: Pseudogenes

RNAs mensageiros celulares podem ocasionalmente usar as proteínas codificadas por L1 para transposição no genoma, gerando pseudogenes processados (Wei e cols, 2001). Existe ~8.000-15.000 cópias de pseudogenes processados no genoma humano, a maioria derivada de genes expressos em célula germinativa, tais como genes *housekeeping* e genes de proteínas ribossomal (Zhang e cols, 2002). Curiosamente, alguns pseudogenes ribossomais processados, como por exemplo RPL21, ocorrem em um número de cópias relativamente elevada, sugerindo que alguma propriedade destes mRNAs permite o recrutamento de proteínas L1 codificadas mais eficazmente do que outros mRNAs (Zhang e cols, 2002).

A maioria dos pseudogenes processados são “inoperantes” porque lhes falta um promotor funcional (Tam e cols, 2008). Por isso, eles podem ser utilizados como relógios moleculares que sugerem as taxas de mutações nas espécies. Alguns pseudogenes humanos processados são expressos, e um pequeno número deles pode codificar genes funcionais ou servir como fonte de RNAs de interferência (iRNAs) com funções reguladoras (Tam e cols, 2008).

Até o momento, não há exemplo de doença humana causada por retrotransposição de pseudogenes processados, exceto a distrofia muscular facioescapulohumeral (Lemmers e cols, 2010). Foi visto que a expressão de um pseudogene processado (FGF4) está associada com a condrodisplasia em 19 raças de cães, e esse achado é consistente com o pensamento de que a “criação seletiva” pode contribuir para aumento da mutagenicidade mediada por L1 (Parker e cols, 2009).

4.2.5. Transposons de DNA

Até recentemente os transposons eram vistos como "DNA lixo" sem qualquer função importante. Porém, hoje se sabe que os transposons de DNA, compreendendo 3% do genoma humano (Lander e cols, 2001), estão envolvidos em funções de recombinação tipo V(D)J feita pelos genes RAG1 e RAG2 para a síntese das imunoglobulinas (Kapitonov e Jurka, 2005).

Os transposons podem ser classificados em três subclasses. Na primeira subclasse estão aqueles que se movimentam pelo mecanismo de "*copy and paste*". Estes são transposons propriamente ditos classificados em dez famílias: *Tc1/mariner*, *haT*, elemento *P*, *MuDR/Fokdback*, *Cacta*, *PiggyBac*, *Pif/Harbinger*, *Merlin*, *Transib* e *Banshee*. Na segunda subclasse estão os chamados *Helitrons* e o mecanismo pelo qual eles são transpostos é chamado de círculo rolante; esses elementos não possuem repetições terminais invertidas, mas possuem motivos terminais curtos conservados e cópias autônomas que codificam uma proteína chamada helicase. Os *Mavericks*, também conhecidos como "*Polintrons*" constituem a terceira subclasse, mas seu mecanismo de transposição é desconhecido. Os *Maveriks* possuem longas repetições terminais, e têm a capacidade de codificar proteínas (Feschotte e Prithman, 2007). Todas essas subclasses e famílias são encontradas nos eucariotos e também nos procariotos, portanto os transposons de DNA divergiram muito cedo na evolução dos organismos (Feschotte e Prithman, 2007).

Durante a transposição esses elementos podem causar mutações afetando a expressão ou alterando a estrutura de genes, e, portanto pode levar a uma perda de função (Kapitonov e Jurka, 2007). Embora a maioria das mutações seja prejudicial, algumas vezes os transposons contribuem para aumentar a diversidade alélica e criação de novos genes (Feschotte e Prithman, 2007). A principal função dos elementos móveis de DNA é a evolução genômica dos organismos (Böhne e cols, 2008).

5. Integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma do hospedeiro

A observação de que coelhos chagásicos tratados com droga anti-tripanosossoma não diminuam a intensidade das lesões no coração e morriam de doença de Chagas com as mesmas características descritas nos coelhos chagásicos não tratados (Teixeira e cols, 1999; Teixeira e cols, 2006; Teixeira e cols, 2011a) sugeriu a hipótese de que o DNA do parasito ficasse retido no genoma do hospedeiro. Na tentativa de demonstrar o DNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro, foram conduzidos experimentos em cultura de células e em modelos experimentais (Teixeira e cols, 1991; Teixeira e cols, 1994; Simões-Barbosa e cols, 1999). Esses estudos mostraram que minicírculos de kDNA de *T. cruzi* se inseriam em diversos cromossomos de macrófagos humanos (Argañaraz, 1996), de camundongos (Simões-Barbosa, 2000), e de coelhos (Nitz, 2001). A demonstração de transferência de DNA do parasito para o chagásico jogou luz sobre a origem da autoimunidade na doença de Chagas. De fato, as investigações mostraram que fragmentos de minicírculos de kDNA integravam principalmente em retrotransposon LINE-1 em hospedeiros mamíferos. Os estudos conduzidos em coelhos chagásicos crônicos (Nitz, 2001) documentou que seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* integram em LINE-1. O seqüenciamento dos sítios de integração foram obtidos mediante adaptação da técnica 5' RACE, usando *primers* de kDNA combinados com *primers* degenerados que anelam inespecificamente ao longo do genoma. Em humanos, a técnica 5' RACE produziu fragmentos de seqüências curtas que tinham homologia com elementos repetitivos de várias espécies seguidos de DNA humano. O tamanho curto das seqüências e as características repetições não permitiam obtenção de escores altos ($p > 0.05$),

resultantes de homologias significativas. Entretanto, os clones eram de DNA humano e as buscas de homologias indicavam quimeras de dois tipos de DNAs. No sentido de excluir a possibilidade de contaminação, foram conduzidos experimentos em aves refratárias ao *T. cruzi*. A investigação mostrou que pintos nascidos de ovos inoculados com tripomastigotas do protozoário nasciam livres da infecção, mas tinham as seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma. Foram identificadas integrações de kDNA em elementos CR-1 (equivalentes a LINE-1 de humanos) e os escores obtidos mostravam homologias com valor estatístico significativo ($p < 0.0001$). Tendo mostrado transferência de kDNA em mamíferos e em aves, a próxima etapa foi verificar a possibilidade de transferência vertical do kDNA em descendentes de chagásicos. As análises demonstraram a transferência de kDNA de coelhos para os descendentes e de galinhas para as progênes de duas gerações. Esses resultados afastaram a possibilidade de contaminação, pois, o encontro de kDNA em aves da segunda geração não podia ter outra origem senão a transferência via reprodução sexuada. De fato, os gametas dos galos e galinhas tinham o kDNA integrado no genoma haplóide. Esse trabalho foi publicado na revista *Cell* (Nitz e cols, 118: 175-186, 2004). Depois de ter gerado manifestação favorável em todos os continentes, o trabalho foi desautorizado unilateralmente pela Editora-Chefe da *Cell* (Marcus, 2005). Seis anos depois da atitude inadequada da revista *Cell*, jamais foi apresentado um só dado experimental contradizendo os achados originais na publicação de Nitz e cols, 2004.

No interesse do conhecimento científico produzido no Brasil os pesquisadores do LMPDC/UnB deram a resposta merecida à revista *Cell*, ou seja, ao invés de desistir da pesquisa, os autores daquela publicação e os jovens alunos de mestrado e doutorado continuaram a produzir dados e informação em estudos conduzidos em aves e em humanos. Em ambas as abordagens, os estudos confirmaram e expandiram o trabalho da *Cell* 118: 175-186, 2004. A análise de cinco famílias, cujos parentais eram chagásicos, mostrou a transferência vertical de seqüências de minicírculos de kDNA para as progênes, em três gerações (Hecht e cols, 2010). A análise mostrou que nas famílias de chagásicos existem três perfis distintos: a) sem a infecção e sem integração de kDNA; b) com marcadores da infecção confirmada pela

presença de nDNA e kDNA do *T. cruzi*; c) Com apenas o kDNA retido no genoma. Mediante clonagem e seqüenciamento foi possível identificar as integrações de kDNA com emprego de técnica *tpTAIL-PCR* (*targeted primer Thermal Assymetric Interlaced-PCR*), na qual foram usados *primers* específicos de LINE-1 combinados com *primers* de kDNA. Mais uma vez, ficou evidente que o progresso do conhecimento acompanha o desenvolvimento de novos instrumentos e, assim, foi possível mostrar integrações em quase todos os cromossomos, com frequência mais alta, particularmente, nos cromossomos 1, 3, 7 e X. As seqüências quimeras com regiões variáveis e conservadas de minicírculos de kDNA tinham extensão de até 2000 nts, e os escores obtidos com a busca de homologias em bancos de dados eram altamente significativos ($p < 0.0001$). Os sítios de integração eram LINE-1 em 65% do DNA das células somáticas e em 75% do DNA dos gametas. De grande interesse, foi a observação de transposição das mutações de kDNA de retrotransposons para regiões codificadoras do genoma. Assim, foi possível observar a ruptura de vários genes associados com crescimento e diferenciação celular, regulação de respostas imunes, etc (Hecht e cols, 2010).

Por último, a informação sobre as aves também progrediu com o estudo de quatro gerações (progênies) de aves com kDNA integrado no genoma. A estratégia empregada para identificar os sítios de integração resultou do aproveitamento do conhecimento publicado por Nitz e cols, na *Cell* 118: 175-186, 2004. Ou seja, empregando *primers* obtidos das seqüências de CR-1 foi possível programar a *tpTAIL-PCR*, mediante combinação dos *primers* específicos da galinha com *primers* de kDNA do *T. cruzi*. Esta estratégia permitiu a identificação das mutações nas aves parentais e nas progênies, em três gerações de descendentes. Os sítios de integração das seqüências de minicírculos de kDNA foram encontrados em regiões codificadoras do genoma, particularmente dos macrocromossomos 1, 2, 3 e 4, mas também houveram integrações em cromossomos de tamanho intermediário e em alguns minicromossomos.

De grande interesse, foi a demonstração de cardiomiopatia chagásica em humanos e em aves com as mutações de kDNA. Esse achado sugere que a transferência lateral e vertical de kDNA para o genoma hospedeiro, em aves e em mamíferos, pode explicar a patogênese da doença de Chagas humana (Teixeira e cols, 2011b). Porém, muitos chagásicos crônicos e seus descendentes não tinham doença clínica manifesta. Diante dos achados de sítios de integração das mutações de kDNA em regiões codificadoras de cromossomos diferentes, e, também, a variação do número de mutações em cada chagásico, surgiu a curiosidade de identificar aquelas mutações que estariam associadas com as manifestações clínicas e patológicas da doença de Chagas. Esse desdobramento da pesquisa demandou o emprego de nova estratégia de trabalho visando ao estudo genético-epidemiológico e clínico-patológico da doença de Chagas em maior número de famílias para investigar a possibilidade de associação entre uma mutação ou grupo de mutações com a patogênese da doença de Chagas. Explicando-se a patogênese seria possível avançar na compreensão do quadro clínico-epidemiológico das infecções e da doença endêmica.

Esta Tese de Doutorado é parte da estratégia geral iniciada no LMPDC para associar mutações com o quadro clínico-patológico da doença de Chagas. A parte clínica epidemiológica do estudo é objeto de Tese de Doutorado da Dra. Adriana Almeida, e, portanto, os protocolos com dados clínico-epidemiológicos não serão apresentados aqui. A parte do estudo que foi designada para esta Tese apresenta a identificação das infecções pelo *T. cruzi* e análise molecular para caracterização das mutações, particularmente, referente às transferências lateral e vertical de seqüências de minicírculos de kDNA e do nDNA em famílias de chagásicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Foi definido como objetivo principal do trabalho verificar a ocorrência de possíveis variações entre os resultados dos testes imunológicos e de PCR empregados para o diagnóstico das infecções pelo *T. cruzi*. O estudo visou analisar os resultados discrepantes entre os testes ELISA e IFI, e PCR com iniciadores de nDNA e kDNA do parasito. Além disso, outro objeto do estudo visou o mapeamento das mutações de kDNA de *T. cruzi* no genoma de indivíduos de quatro famílias com pessoas identificadas pelas manifestações clínicas sugestivas de DCA.

2.2. Objetivos específicos

- * Comparar resultados obtidos nos testes sorológicos e de PCRs usados no diagnóstico das infecções pelo *Trypanosoma cruzi*;
- * Analisar as discrepâncias entre os resultados de testes imunológicos e de PCR usados no diagnóstico das infecções pelo *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis*;
- * Mapear as mutações de kDNA no genoma de indivíduos de quatro famílias residentes em municípios do Estado do Pará;
- * Identificar a transferência vertical do nDNA do parasito em células somáticas de descendentes de chagásicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Dados epidemiológicos gerais

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/UnB (CEP-FM nº 25000.167567/2004-28) e pela Fundação Pública Estadual Hospital de Clínicas Gaspar Vianna (CEP-FHCGV nº 054/2009). Os indivíduos incluídos neste projeto foram esclarecidos quanto aos objetivos, e dele participaram somente aqueles que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para colheita e processamento do sangue.

Três famílias A, B e C do estudo são do Município de Barcarena, com 80.280 habitantes, situado a 150 km da cidade Belém do Pará. Os indivíduos da família D residem no município de Breves, com 99.223 habitantes, ilha do arquipélago de Marajó. Essas quatro famílias foram selecionadas para o estudo porque procuraram assistência médica no Programa de Chagas do FHCGV com queixas clínicas sugestivas de doença de Chagas aguda (DCA). A história epidemiológica das famílias sugeria microepidemia de infecções pelo *T. cruzi*, inicialmente atribuídas à transmissão pela via oral. O veículo de suspeição foi a polpa de açaí, hábito alimentar secular na cultura regional. Esses casos foram notificados pela Secretaria de Estado da Saúde Pública do Pará (SESPA) após diagnóstico parasitológico e/ou teste imunológico positivo para IgM anti-*T. cruzi* (LACEN/Secretaria de Saúde do Pará).

3.2. População estudada

O estudo foi conduzido nos Municípios de Barcarena e de Breves, Estado do Pará, onde foram identificadas microepidemias da DCA entre os anos de 2007 e 2009. Os casos agudos foram atendidos na Fundação Pública Estadual Hospital de Clínicas Gaspar Vianna (FHCGV) por equipe de profissionais de saúde. Na equipe achava-se a médica cardiologista Dra. Adriana Almeida, que faz Tese de Doutorado sob Orientação do Dr. Antonio Teixeira.

O trabalho da Dra. Adriana Almeida com as famílias que tinham casos clínicos sugestivos de DCA chegou ao conhecimento dos pesquisadores do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (LMPDC), na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, e foi iniciado o estudo molecular, clínico e epidemiológico visando aos objetivos definidos. A análise molecular que é parte desta Tese de Doutorado inclui 109 indivíduos agrupados em quatro famílias. As amostras de sangue das famílias A, B e C foram colhidas em maio de 2009, dois anos após a suspeição de contaminação oral, e os casos com diagnóstico de DCA foram tratados com Benzonidazol. Os casos da família D foram atendidos na fase aguda da doença, em março de 2010, e o sangue dos pacientes foi colhido na vigência do tratamento com Benzonidazol (Rochagan®). A Tabela 1 relaciona os indivíduos das quatro famílias estudadas que foram notificados como portadores de DCA. Todas as amostras de sangue dos 109 indivíduos incluídos na pesquisa foram processadas no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília-DF.

Tabela 1: Casos de infecções pelo *T. cruzi* identificados no FHCGV

Famílias	Ano da Infecção	Infecções pelo <i>T. cruzi</i> *
A	2007	18,1% (8/44)
B	2007	20% (3/15)
C	2007	13,7% (4/29)
D	2009	66,6% (14/21)
Total		26,6% (29/109)

* Número de casos / Número de indivíduos por família. Os casos foram identificados por testes parasitológicos e/ou sorológicos e epidemiológicos consistentes com *T. cruzi*.

4. Diagnósticos laboratoriais

4.1. Exames Parasitológicos

4.1.1. Pesquisa direta do *T. cruzi* pela gota espessa e/ou pelo QBC®

A Pesquisa direta do *T. cruzi* foi feita no Instituto Evandro Chagas (IEC/PA), pelos Pesquisadores Doutores Aldo Valente e Vera da Costa Valente, quando os indivíduos com sintomas sugestivos de DCA foram examinados no FHGV da Secretaria de Saúde do Estado do Pará. O teste pela gota espessa e/ou pelo esfregaço de sangue foi feito sobre lâmina corada pelo Giemsa seguido de exame ao microscópio ótico com objetiva de 40X. Para o teste de QBC® (*Quantitative Buffy Coat*) foram utilizados 4 capilares por paciente seguindo os procedimentos apresentados pelo fabricante (Siste) na faixa de leitura recomendada. Nos testes do sangue a fresco um mínimo de 500 campos microscópios foi varrido por três examinadores.

4.1.2. Hemocultura e/ou xenodiagnóstico no IEC/PA

A hemocultura e/ou xenodiagnóstico artificial, também foram feitos no Instituto Evandro Chagas (IEC/PA), pelos Pesquisadores Doutores Aldo Valente e Vera da Costa Valente. O isolamento de *T. cruzi* foi obtido após colheita de sangue por punção venosa, seguindo os procedimentos adotados por Miles (1993). O sangue foi diluído em salina fisiológica estéril, examinado ao microscópio para detecção do tripanossoma. O volume de 0,1 ml foi semeado nos meios citados em capela de fluxo laminar e a cultura foi examinada após três semanas.

Os meios utilizados foram: 1) Bifásico de Hoff's (4 tubos por paciente) com semeio de 500 µl de sangue por tubo. Após duas semanas, alíquotas do material semeado, tendo parasitos em crescimento, eram transferidos para o meio líquido RPMI 1640 e/ou meio LIT para crescimento exponencial. O exame do material semeado era feito três semanas depois e os tubos negativos eram examinados aos 90 dias e descartados. 2) Xenodiagnóstico artificial: Para preparo do meio usou-se 10 a 15 ml de sangue com heparina sódica anticoagulante distribuído em um cilindro de vidro revestido com membrana de borracha permeável à probóscida e permitindo a alimentação de ninfas de triatomíneos. O cilindro era aquecido em banho-maria a temperatura entre 37°C e 39°C, para estimular a alimentação dos triatomíneos. Em cada paciente

foram usadas vinte ninfas de 5º estágio das espécies *R. prolixus*, *T. infestans* e *P. megistus* quando em jejum de 60 dias. As espécies foram mantidas no insetário do IEC e o exame do conteúdo intestinal dos triatomíneos foi feito aos 30 e 60 dias após a alimentação. Composição dos meios:

a) Meio bifásico (DIFCO)

O meio ágar-sangue bifásico usado no isolamento primário e cultivo de *T. cruzi* tiveram a seguinte composição: 14g Difco bacto ágar-sangue base, 5g BBL tripticase peptona, 3g Oxoid L 28 ágar purificado, 6g Cloreto de sódio (ANALAR), 1.000 ml água destilada e 0,5 ml (por tubo) de sangue inativado de coelho. Visando evitar a contaminação de culturas para isolamento primário de *T. cruzi* durante os trabalhos de campo, foram utilizados tubos a vácuo (BDH) e a inoculação era feita pela injeção através da tampa.

b) Meio monofásico – RPMI 1640 (GIBCO)

O meio RPMI 1640 (Gibco, BRL, Paisley, Scotland) foi suplementado com 0,5% (w/v) tripticase (BBL), 0,5% (w/v) HEPES, 0,03 M hemin, 10% (v/v) SBF inativado, 2 mM de glutamato de sódio, 2 mM de piruvato de sódio e antibióticos. Preparadas como segue: solução de tripticase estéril concentrada 100 X (0,175 g/ml autoclavada), HEPES (1 M, esterilizado em filtro) e HEMIN (2,5 mg/ml em 0,01M NaOH, autoclavada). Adicionava-se 2,8 ml de tripticase, 2 ml de HEPES e 0,8 ml para cada 100 ml de solução estoque de RPMI 1640, junto com 10 ml de SBF, 1 ml de 200 mM de glutamato de sódio, 200 mM de piruvato de sódio (com penicilina, estreptomicina, na concentração final 250 UI/ml e 250 µg/ml, respectivamente). As soluções de glutamina, piruvato e antibióticos eram esterilizadas em filtro antes da adição. O meio preparado era aliquotado em tubo Falcon de 50 ml. Para evitar o crescimento de fungos e bactérias, 5-fluorocytosine (100 µg/ml) e gentamicina (100 µg/ml) eram adicionadas aos tubos (Miles, 1993).

c) Meio monofásico de LIT (*Liver Infusion Tryptose*)

A solução 1 (Infusão de Fígado, *Liver infusion broth*-DIFCO) a 10% era preparada em água bidestilada e autoclavada a 120°C por 20 min. Alíquotas eram armazenadas a 4°C.

A solução 2 (Sais 4X): A hemina era preparada 5 ml de água bidestilada em tubo Falcon de 50 ml. Após adição de 5 ml de trietanolamina (Sigma 1377) a solução era homogeneizada com pipeta, observando a trietanolamina ser removida. Então, adicionava-se 250 mg de hemina (Sigma H2250), e o tubo era agitado em vortex até a completa dissolução. Em um Becker com 2 L de água destilada eram adicionados: 40 g NaCl, 4g KCl, 80 g Na₂HPO₄ anidro, 50 g triptose e 10 ml de hemina solubilizada. A solução de hemina era adicionada e a mistura agitada em vortex com aquecimento a 30°C. A solução de hemina tinha o pH 7,4 ajustado com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio. Evitar a utilização de ácido clorídrico. O volume da solução de hemina era completado para 2,5 L, mantida em agitação. Alíquotas em garrafas de 500 ml eram autoclavadas a 120°C por 20 min e mantidas a 4°C.

A solução 3 (glucose 40%) em água bidestilada era autoclavada a 120°C por 20 min e armazenadas a 4°C. O meio LIT era composto de 25 ml (solução 1), 125 ml (solução 2), 5 ml (solução 3), e 50 ml (SBF). Em seguida acrescentava-se 100 u/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 10 mg/L gentamicina. O volume de 500 ml era completado com água bidestilada estéril.

4.1.3. Hemocultura na UnB/DF

A hemocultura também foi feita no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, na Universidade de Brasília (UnB/DF), em duas ocasiões: 2 e 5 anos após sintomas clínicos de DCA. A primeira colheita de sangue foi feita na veia do antebraço dos 109 indivíduos das quatro famílias. Os tubos de 1.5 x 12 cm, contendo *slant* ágar sangue receberam 4 ml de sangue e permaneceram a temperatura entre 28°C a 32°C. Uma semana depois se adicionou 3 ml de LIT a cada um dos tubos. As culturas foram examinadas 30, 60, 90 e 120 dias depois da semeadura. A segunda colheita foi repetida em 76 dos 109 indivíduos e os tubos foram examinados nos períodos pós-semeadura indicados para o primeiro exame. Nos experimentos controle, tubos com ágar sangue foram inoculados com 10⁴ tripomastigotas de sangue de camundongos previamente infectados com *T. cruzi* ou com igual número de epimastigotas crescidos em LIT. Os resultados dos testes parasitológicos foram conhecidos após os resultados dos exames que identificaram anticorpos anti-*T. cruzi* e produtos de PCR específicos para kDNA e nDNA do protozoário.

4.2. Testes imunológicos e moleculares

Para confirmar a presença de anticorpos contra antígenos de *T. cruzi* e de *L. braziliensis*, foram empregados os testes de imunofluorescência indireta- IFI anti-IgM e anti-IgG, e o ELISA anti-IgG, de acordo com técnicas padronizadas (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000). Foram feitos testes de PCR com *primers* específicos de kDNA e nDNA de *T. cruzi*. O diagnóstico molecular de *L. braziliensis* foi feito empregando *primers* específicos de kDNA. Como controles negativos e positivos, foram utilizados alíquotas de soro/DNA do banco de material biológico mantido no LMPDC (UnB). Todos os testes foram feitos em duplo-cego.

4.2.1. Crescimento de *T. cruzi* e *L. braziliensis* para obtenção de antígenos

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (estoque Berenice) e promastigotas de *L. braziliensis* (M5176) cultivadas em meio LIT e DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), respectivamente, foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas- BR) e 40 µg/mL de gentamicina. O primeiro foi cultivado a 28°C e o segundo a 24°C. A colheita dos flagelados foi feita na fase exponencial de crescimento.

4.2.2. Preparo do antígeno para imunofluorescência indireta (IFI)

Formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. braziliensis*, foram colhidas por centrifugação a 3.000 rpm por 15 min a 4°C, lavadas três vezes com PBS, pH 7,4, por igual período e ressuspensas em 2 mL de paraformaldeído (3,7%). Após repetir o procedimento de lavagem, os parasitos foram ressuspensos em PBS, pH 7,4, de modo a obter uma concentração de aproximadamente 30 parasitos por campo. Essa quantidade de parasitos em suspensão foi depositada nas lâminas de microscopia convenientemente demarcadas e desengorduradas. Depois de secas ao ar livre, as lâminas foram embrulhadas com papel alumínio e guardadas a -20°C até o momento do uso (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

4.2.3. Reação de imunofluorescência indireta

A reação de IFI foi utilizada no diagnóstico diferencial das infecções causadas pelos protozoários da Ordem Kinetoplastida. Os soros dos indivíduos participantes foi obtido de 4 mL de sangue, armazenado no glicerol (1/1) e estocados a -20°C até serem usados para exames. 10 µL das diluições seriadas (1: 20 a 1: 1.280) dos soros em PBS, pH 7,4 foram colocados sobre os parasitos fixados na lâmina. Após incubação por 40 min a 37°C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e as lâminas foram lavadas três vezes com PBS, pH 7,4. Depois das lâminas secas a temperatura ambiente, separadamente, adicionou-se o conjugado anti-IgM ou anti-IgG humano marcado com fluoresceína (BioMérieux), diluído 1:200 (previamente titulado) em PBS, pH 7,4 e Azul de Evans 0,01% (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

Após incubação por mais 40 min a 37°C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e mais uma vez as lâminas foram lavadas três vezes com PBS, pH 7,4. Depois de secas a temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com lamínulas, sobre glicerina tamponada, pH 9,0. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência (*Olympus*® BX51), cuja luz ultravioleta ativa o isotiocianato de fluoresceína presente apenas nos parasitos com anticorpos ligados na membrana. Uma amostra era considerada positiva pela fluorescência verde brilhante obtida em títulos \geq 1: 40 nas infecções pelo *T. cruzi* e por *L. braziliensis*.

4.3. Preparo do antígeno para ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

As formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. braziliensis*, foram colhidas por centrifugação a 3.000 rpm por 15 min a 4°C, lavadas três vezes com PBS, pH 7,4 por igual período e ressuspensas em 2 mL de água Milli-Q. Em seguida, os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento (-20°C)/ descongelamento a 37°C. Para ajudar no rompimento dos parasitos, as formas promastigotas de *L. braziliensis* foram lisadas de forma mecânica com auxílio de um triturador a 4°C. O lisado foi recentrifugado a 5.000 rpm por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi colhido, ultracentrifugado a 14.000 rpm por 10 min e ressuspensão em 2 mL de água destilada. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) e alíquotas dos extratos foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

4.3.1. Sensibilização das placas de ELISA com os antígenos

Microplacas de fundo chato com 96 cavidades foram sensibilizadas separadamente com 50 μL /poço de cada um dos antígenos brutos (antígenos não purificados) dos parasitos, diluídos em PBS, pH 7,4 de forma a conter (0,2 μg /poço do antígeno de *T. cruzi* e 0,1 μg /poço do antígeno de *L. braziliensis*). Após incubação por 18 h a 4°C, em câmara úmida “*overnight*”, o excesso do antígeno foi retirado e as placas foram lavadas três vezes com PBS, pH 7,4 contendo 0,05% de *Tween-20* (PBS-T). Para bloquear os sítios de adesão livres das proteínas, que ainda existiam na superfície dos poços, foram adicionados (100 μL /poço) de PBS/leite desnatado 5% (Molico, Nestlé). Após incubação por mais 2 h a 37°C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e mais uma vez as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. As placas sensibilizadas foram imediatamente envolvidas em papel alumínio e armazenadas a -20°C até o momento do uso (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

4.3.2. Incubação com o primeiro anticorpo

Visando a detecção de anticorpos específicos, os soros dos indivíduos participantes foram diluídos 1: 100 em PBS/leite desnatado 2% e adicionados à placa (50 μL /poço, em triplicata). Após incubação por 2 h a 37°C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Em cada placa, os soros controles positivos e negativos, foram incluídos nas mesmas condições. Para controle dos reagentes, foram colocados apenas PBS/leite desnatado 2% (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

4.3.3. Incubação com o segundo anticorpo e revelação de imunocomplexos

O conjugado previamente testado e titulado, composto por anticorpos anti-IgG humano marcada com peroxidase (Invitrogen-ZyMaxTM) foi diluído 1: 5000 em PBS/leite desnatado 2% e adicionado à placa (50 μL /poço). Após incubação por mais 2 h a 37°C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e novamente as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

A revelação dos imunocomplexos foi feita pela adição (50 μL /poço) do substrato H_2O_2 -Peróxido de hidrogênio-Merke (2 μl) em (5 ml) de tampão citrato de sódio/ácido cítrico, pH 5,0 contendo o cromógeno OPD- *o-Phenylenediamine dihydrochloride*-Sigma (2 mg). Após o desenvolvimento da reação cromógena por 5 min, à temperatura ambiente, na ausência de luz, a reação foi interrompida pelo acréscimo (50 μL /poço) de H_2SO_4 - ácido sulfúrico. A leitura foi feita em espectrofotômetro (*BioTeK-Synergy HT*) a 490 nm, sendo consideradas positivas as amostras que possuíam densidade óptica (DO) maior que o ponto de corte (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

4.4. Extração de DNA de células sanguíneas

A colheita de sangue (15 a 16 mL) foi feita pela punção venosa, em quatro tubos *vacutainer*[®] com EDTA. A extração de DNA de células sanguíneas foi realizada segundo metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001). Para validar a qualidade da extração do DNA genômico, os procedimentos foram feitos em duplicata. A etapa inicial consistia na separação das células nucleadas pela centrifugação (5.000 rpm por 30 min) em gradiente de Ficoll-Paque[™] Plus (GE *Healthcare*). As células nucleadas no anel de interfase do tubo eram colhidas e o sedimento foi lavado uma vez com PBS 1X, pH 7,4 e ressuspenso em tampão de lise (Tris-HCl 1mM pH 8,0; EDTA 0,1M pH 8,0; SDS 0,5%) com proteinase K (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ficando incubado a 37°C por 12 h. O DNA foi purificado com duas extrações com clorofane, (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, proporção 25:24:1) e uma extração de clorofil, (clorofórmio: álcool isoamílico, proporção 24:1) todas em volumes iguais. Finalmente, o DNA foi precipitado em 3 v de etanol absoluto gelado e colocado por 12 h a -80°C. Depois desse período, o DNA foi sedimentado por centrifugação (14.000 por 1 min) e o sobrenadante foi descartado. O DNA assim extraído, depois de lavado duas vezes com etanol a 70% gelado, foi secado à temperatura ambiente e ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). A esta solução foram acrescentados RNase (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ficando incubado a 37°C por 12 h. Os DNA's foram diluídos na concentração final de 100 ng/ μL e armazenados a -4°C e os DNA's concentrados foram guardados a -20°C até o momento do uso.

4.5. Extração de DNA total de *T. cruzi* e *L. braziliensis*

Com o intuito de obter DNA total do *T. cruzi* e *L. braziliensis*, para uso como controle positivo na reação de PCR, as formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. braziliensis*, foram sedimentados por centrifugação a 3.000 rpm por 15 min a 4°C, lavados duas vezes com TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,2; 0,5 NaCl) nas mesmas condições de centrifugação e o sedimento ressuspenso em tampão de lise (Tris-HCl 1mM pH 8,0; EDTA 0,1M pH 8,0; SDS 0,5%). A esta solução foram acrescentados Proteinase K (100 µg/mL), ficando incubado a 37°C por 12 h. Após a incubação, o DNA foi purificado com duas extrações com clorofane e uma extração de clorofil, todas em volumes iguais. Finalmente, o DNA foi precipitado com 2,5 v de etanol absoluto gelado e 1/10 v de acetato de sódio 3,0 M, pH 4.7. O DNA foi lavado duas vezes com etanol a 70% gelado, secado à temperatura ambiente e ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). O DNA foi guardado a -20°C até o momento do uso (Perez-Morga e cols, 1993).

4.6. Extração de kDNA de *T. cruzi*

A extração de kDNA, foi feita segundo metodologia descrita por Perez-Morga e cols (1993) para ser utilizado na produção de sonda radioativa. Uma quantidade 5×10^7 formas epimastigotas foram colhidas por centrifugação a 3.000 rpm por 15 min a 4°C, lavados duas vezes com PBS, pH 7,4 nas mesmas condições de centrifugação e o sedimento ressuspenso foi lisado com tampão NET-100 (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 100mM pH 8.0, NaCl 100mM) e 10% de SDS. A esta solução foram acrescentados Proteinase K (100 µg/mL), ficando incubado a 37°C por 12 h. Após a incubação, o lisado foi gentilmente homogeneizado com auxílio de uma pipeta P1000 e foi acrescentado tampão NET-100 com sacarose a 20%. A mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 min. O sobrenadante obtido foi removido cuidadosamente com uma pipeta e novamente, adicionou-se tampão NET-100 com sacarose a 20%, repetindo-se a centrifugação. Após a centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em 1000 µl de água Milli-Q. O DNA foi purificado com duas extrações com clorofane e uma extração de clorofil, todas em volumes iguais. Finalmente, o DNA foi precipitado com 2,5 v de etanol absoluto gelado e 1/10 v de acetato de sódio 3,0 M, pH 4.7. O DNA assim extraído, depois de lavado duas vezes com etanol

a 70% gelado, foi secado à temperatura ambiente e ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). O kDNA foi guardado a -20°C até o momento do uso.

5. Análise e quantificação do DNA extraído

A análise do DNA total em gel de agarose teve como objetivo avaliar a qualidade das amostras sendo excluídas aquelas que mostravam degradação. As amostras de DNA foram quantificadas pela espectrofotometria no aparelho Nanovue (GE life science). A qualidade do DNA extraído foi testada através de PCR utilizando *primers* para o gene da β -actina e a visualização dos produtos amplificados foi feita pela eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) 0,8% corado com brometo de etídio 0,5 μ g/ml, em tampão TAE (Tris acetato 90 mM pH 8,0; EDTA 25 mM).

6. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

6.1. Amplificação de nDNA de *T. cruzi*

A amplificação do DNA nuclear (nDNA) de *T. cruzi* foi obtida com os *primers* TcZ1/TcZ2 proposto por Moser e cols (1989). Estes iniciadores geram uma banda de 188pb, que equivale à amplificação de uma seqüência de 195 pb de DNA genômico repetitivo do *T. cruzi*. Esses elementos repetitivos de 195 pb constituem aproximadamente 9% do DNA nuclear deste parasito (Virreira e cols, 2003). A banda apresenta 7pb a menos, pois a parte da seqüência AATTTTCG nas posições 189 a 195 foi excluída dos *primers* para reduzir o potencial de um anelamento não específico com regiões ricas em A-T do DNA de outros parasitos, insetos e mamíferos (Moser e cols, 1989).

* TcZ1: 5'- CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT -3'

* TcZ2: 5'- CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG -3'

A amplificação de nDNA de *T. cruzi* com os *primers* TcZ1/ TcZ2 foi feita em triplicata conforme padronização: 200ng de DNA genômico, tampão de reação da Invitrogen 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl); 3 mM MgCl₂; 0,1 μM de cada *primer*; 0,2 mM dNTPs (illustra™ GE) e 2 U *Taq* DNA polimerase, incluídos no volume final de 25 μL. As reações foram realizadas no termociclador BIO-RAD *MyCycler*™, como segue:

- * 95°C/5min; 30 ciclos de 95°C/30seg; 68°C/1min; 72°C/1min; 72°C/5min; refrigeração a 4°C.

6. 2. Amplificação de kDNA de *T. cruzi*

A amplificação do DNA mitocondrial (kDNA) de *T. cruzi* foi obtida com os *primers* S35/S36 (Sturm e cols, 1989). Estes *primers* geram uma banda de 330 pb, que equivale a duas extremidades de regiões conservadas de kDNA e uma região variável inteira entre estas (Figura 6A), o que corresponde a 25% do DNA total do parasita.

- * S35: 5'- ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC -3'
- * S36: 5'- GGT TCG ATT GGG GTT GGT G -3'

A amplificação de kDNA de *T. cruzi* com os *primers* S35/S36, foi feita em triplicata e a padronização foi a seguinte: 200ng de DNA genômico, tampão de reação da Invitrogen 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl); 2 mM MgCl₂; 0,2 μM de cada *primer*; 0,2 mM dNTPs (illustra™ GE) e 2 U *Taq* DNA polimerase, incluídos no volume final de 25 μL. As reações foram realizadas no termociclador BIO-RAD *MyCycler*™, como segue:

- * 95°C/5min; 35 ciclos de 95°C/30seg; 62°C/1min; 72°C/1min; 72°C/5min; refrigeração a 4°C.

6.3. Amplificação de kDNA de *L. braziliensis*

Para amplificação do DNA mitocondrial (kDNA) da *L. braziliensis* foi utilizado os *primers* B1/B2 proposto por deBruijn e Barker (1992). Ao anelar em regiões conservadas dos minicírculos, amplificam um fragmento de 750 pb (Figura 5).

* B1: 5'- GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG -3'

* B2: 5'- CTA ATT GTG CAC GGG GAG G -3'

A amplificação de kDNA de *L. braziliensis* com os *primers* B1/B2, foram feitas em triplicata e previamente padronizadas nas seguintes condições: 200 ng de DNA genômico, tampão de reação da Invitrogen 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl); 2 mM MgCl₂; 0,2 μM de cada *primer*; 0,2 mM dNTPs (illustra™ GE) e 2 U *Taq* DNA polimerase, incluídos no volume final de 25 μL. As reações foram realizadas no termociclador BIO-RAD *MyCycler*[™], como segue:

* 95°C/5min; 30 ciclos de 95°C/30seg; 62°C/1min; 72°C/1min; 72°C/5min; refrigeração a 4°C.

Em todas as reações, foram incluídos dois controles negativos e positivos, que consistiam em DNA de indivíduos não infectados, DNA de indivíduo infectado, 100 pg de DNA de *T. cruzi* e DNA purificado de cultura de *L. braziliensis*.

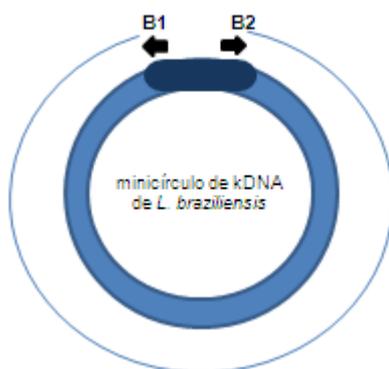


Figura 5: Estrutura do minicírculo de kDNA de *Leishmania braziliensis*. Em destaque, regiões dos *primers* fitas *sense* e *anti-sense*.

7. Amplificação das regiões flanqueadoras do kDNA de *T. cruzi* integrado no genoma humano

A inovação da técnica *targeting primer Thermal Asymmetric Interlaced-PCR (tpTAIL-PCR)* foi empregada para mapear mutações de kDNA no genoma de chagásicos. A modificação da técnica (Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011b) inicialmente descrita por Liu e Whittier (1995), consiste numa combinação de *primers* específicos para as seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*, com os *primers* obtidos de seqüências de LINE-1 humano (Figura 6B e Tabela 2). As reações alternam ciclos de alta estringência com ciclos de baixa estringência. Dessa forma, enquanto as altas temperaturas favorecem o anelamento apenas dos *primers* específicos, as baixas temperaturas permitem o anelamento de ambos.

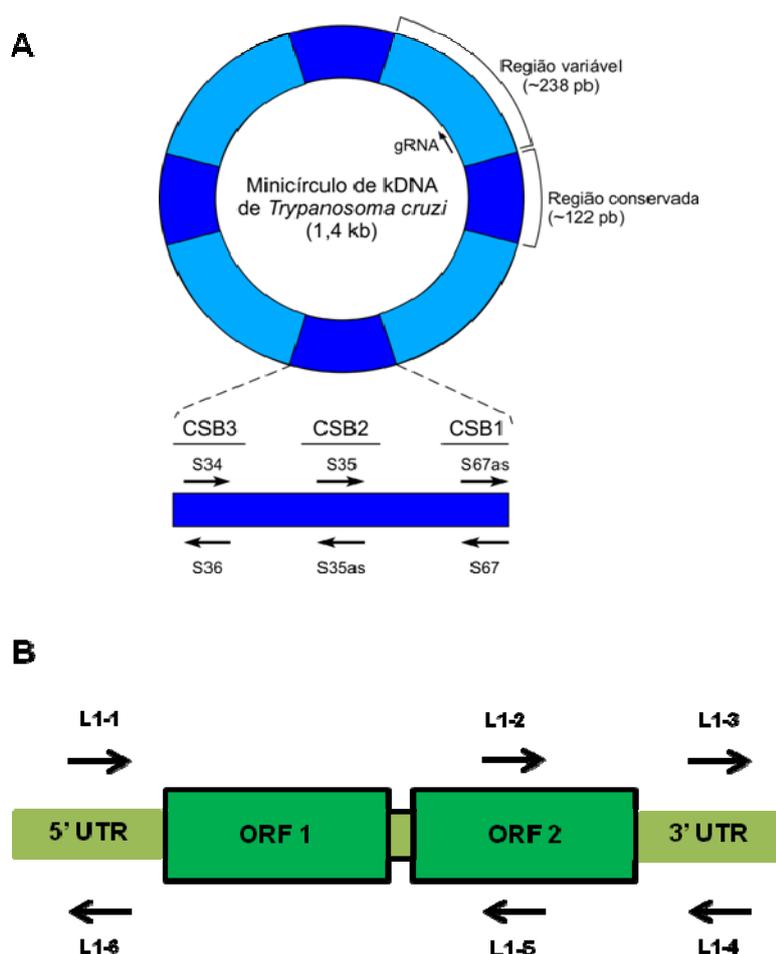


Figura 6: Esquema mostrando as regiões de obtenção dos *primers* utilizados na *tpTAIL-PCR*. **A)** Estrutura do minicírculo de kDNA com quatro regiões conservadas (azul escuro) separadas por regiões variáveis (azul claro). As setas mostram os *primers* obtidos das fitas *sense* e *anti-sense*. **B)** Elemento LINE-1: seqüências conservadas de L1 de humano possibilitam a construção de *primers* para as regiões 5'-UTR, 3'UTR e ORF2.

Tabela 2: *Primers* utilizados nas reações de *tpTAIL-PCR*

<i>Primers</i>	DNA molde	Seqüência (5' → 3')
S34	kDNA	5'- ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC- 3'
S67	kDNA	5'- GGT TTT GGG AGG GG(G/C) (G/C)(T/G)TC-3'
S35	kDNA	5'- ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC -3'
S36	kDNA	5'- GGT TCG ATT GGG GTT GGT G-3'
S35 reverso	kDNA	5'- GCA TCT CMC CCG TAC ATT AT -3'
S67 reverso	kDNA	5'- GAM (G/C)(G/C)C CCC TCC CAA AAC C- 3'
L1-1	LINE	5'- CTC CGG TCT ACA GTC CCC A- 3'
L1-2	LINE	5'- CTC CCA AGA CTA AAC CAG GA- 3'
L1-3	LINE	5'- ATC ACA CTC TGG GGA CTG TG- 3'
L1-4	LINE	5'- CAC AGT CCC CAG AGT GTG AT- 3'
L1-5	LINE	5'- TCC TGG TTT AGT CTT GGG AG- 3'
L1-6	LINE	5'- TGG GAG CTG TAG ACC GGA G- 3'

As reações *tpTAIL-PCR* foram realizadas com o kit da Invitrogen, como segue: pelo primeiro ciclo de amplificação conduzido com 200 ng de DNA genômico, tampão de reação 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl); 2,5 mM MgCl₂; 0,2 µM do *primer* (S34/S67); 0,2 mM dNTPs (illustra™ GE); 2 U *Taq Platinum* e 0,04 µM de cada um dos *primers* de L1 (Tabela 2).

Um segundo ciclo de amplificações foi obtido a partir da diluição (1:40) da *tpTAIL-PCR1*, em uma reação contendo tampão de reação 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl); 2,5 mM MgCl₂; 0,2 µM do *primer* (S35/S35R); 0,2 mM dNTPs (illustra™ GE); 2 U *Taq Platinum*, mantendo a mesma concentração dos *primers* de L1 utilizados na primeira amplificação.

As amplificações resultantes da *tpTAIL-PCR2* foram diluídos (1:10) e 2 µL das diluições serviram de placas moldes para *tpTAIL-PCR3*, em uma reação contendo tampão de reação 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl); 2,5 mM MgCl₂; 0,2 µM do *primer* (67R/S36); 0,2 mM dNTPs (illustra™ GE); 2 U *Taq Platinum* e 0,04 µM dos *primers* de L1. Os três ciclos foram realizados no termociclador BIO-RAD *MyCycler™*, como segue:

1º amplificação:

95°C/5min
5 ciclos { 95°C/30seg
64°C/1min
72°C/2min

1 ciclo { 94°C/30seg
25°C/2min
72°C/2min

12 ciclos { 94°C/30seg
64°C/1min
72°C/2min
94°C/30seg
64°C/1min
72°C/2min
94°C/30seg
44°C/1min
72°C/2min
72°C/7min
4°C

2º amplificação:

95°C/5min
12 ciclos { 94°C/30seg
64°C/1min
72°C/2min
94°C/30seg
64°C/1min
72°C/2min
94°C/30seg
45°C/1min
72°C/2min
72°C/7min
4°C

3º amplificação:

95°C/5min
20 ciclos { 94°C/30seg
45°C/1min
72°C/2min
72°C/7min
4°C

8. Análise eletroforética dos produtos de PCR

Os produtos das amplificações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen), a 1% corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml, submerso em tampão TAE 1X. A migração do DNA foi visualizada mediante a exposição do gel à radiação ultravioleta (Sambrook e cols, 1989).

9. Southern Blot dos produtos de PCR

Após separação por eletroforese, os amplicons presentes no gel foram transferidos por capilaridade para a membrana de *nylon* carregada positivamente (*HybondTM-N⁺*, Amersham GE Healthcare), pelo método de transferência alcalina (Sambrook e Russel, 2001). Resumidamente, o gel submetido a uma solução alcalina (NaOH 0,4 M) por 20 min, sob agitação, desnatura as fitas de DNA. A transferência ocorre quando a membrana de *nylon* positivamente carregada entra em contato com o gel e utiliza a mesma solução alcalina para a capilaridade. Após “*overnight*” de transferência, a membrana foi secada a temperatura ambiente e hibridizada com sondas radioativas específicas.

10. *Southern blot* de DNA genômico

Amostras de DNA dos indivíduos da progênie F₂ (Família D), foram analisadas por *Southern blot* para a demonstração do perfil de integração do kDNA no genoma humano. A enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen), foi utilizada no processo de digestão enzimática do DNA genômico. Esta enzima possui a capacidade de clivar o kDNA em um único sítio, gerando uma banda linearizada de aproximadamente 1,4 kb. Neste experimento foram utilizados 50 µg de DNA genômico, 3 U de enzima por micrograma de DNA e 1/10 v de tampão 10X específico para esta enzima. A digestão procedeu no banho-maria a 37°C por 12 h. O produto da digestão em 300 µL foi precipitado com 3 v de etanol absoluto gelado e 1/10 v de acetato de sódio 3M, pH 4,7, e deixado a -80°C por 2 h. Após centrifugação a 14.000 rpm por 45 min, o *pellet* obtido foi lavado duas vezes com etanol a 70% gelado, foi secado e ressuspenso em 30 µL com água Milli-Q.

Após confirmação da digestão, o DNA foi separado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml, em tampão TAE 1X. Após corrida por ~10 h (48 Volts) na câmara fria “*overnight*”, o gel foi submetido a uma solução de depurinação do DNA (HCl 0,125 M) por 10 min, seguido por duas lavagens de 5 min com água Milli-Ro, sob agitação. Para desnaturar o DNA, o gel foi submetido a uma solução de desnaturação (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) por 30 min, sob agitação. A transferência do DNA para a membrana de *nylon* carregada positivamente, foi idêntica à realizada com os produtos de PCR, porém utilizando a solução de desnaturação (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M). A transferência foi deixada pelo período de 24 h.

11. Marcação de sondas radioativas e hibridização

O *kit Random Primers DNA Labeling System* (Invitrogen) foi utilizado para marcar radioativamente fragmentos de DNA obtidos com a amplificação do nDNA do *T. cruzi* ou para marcar o kDNA deste parasito. De forma semelhante, foi utilizado para a marcação dos produtos amplificados pelos *primers* de *L. braziliensis*, o fragmento de kDNA específico obtido pela amplificação com os *primers* B1/B2. Essa técnica consiste em inserir um dATP radiomarcado [α -³²P] na seqüência da fita de DNA molde, sintetizada pela enzima *Klenow*, que apresenta atividade de polimerase, na presença de *primers* randômicos

(hexaméricos) que se ligam aleatoriamente na seqüência desejada iniciando a reação de polimerização. A reação foi feita conforme instruções do fabricante: 30 ng de DNA (volume final de 25 μ L) foram desnaturados a 100°C, por 10 min, e imediatamente incubado em gelo. Em outro *ependorf*, adicionaram-se 2 μ L de dCTP, 2 μ L de dGTP e 2 μ L de dTTP (0,5 mM); 15 μ L de tampão *Random Primer*, 5 μ L de [α -³²P] dATP (3000 μ Ci) e 1 μ L da enzima *Klenow* (5U). Após incubação de 3 h à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de 5 μ L do tampão de parada.

11.1. Purificação das sondas radioativas

Após a marcação, as sondas radiomarcadas foram purificadas em coluna Sephadex G-50 e lã de vidro, por centrifugação por 2 min, a 2000 rpm (Sambrook e cols, 1989), com a finalidade de remover os nucleotídeos radioativos livres não incorporados. Recolheu-se o DNA radioativo que passou pela coluna e o radioisótopo livre ficou retido nas malhas do Sephadex. A sonda foi então desnaturada a 100°C por 10 min, antes de ser adicionada à solução de hibridização.

12. Pré-hibridação e hibridação

As membranas contendo o DNA transferido foram bloqueadas por no mínimo 3h, a 65°C, com solução de pré- hidridização (PEG 800 10%, SSPE 1,5%, SDS 7% e 100 μ g/mL de DNA de salmão- Promega). Após este período, as sondas radiomarcadas foram desnaturadas (100°C por 10 min) e adicionadas à solução de pré-hibridização. O processo de hibridização ocorria “*overnight*” a 65°C. Após este período, as sondas foram guardadas (-20°C) e a remoção da sonda não ligada à membrana, foi feita pela lavagem com graus crescentes de estringência. Para isso, foram feitas duas lavagens por 15 min a 65°C com solução de SSC 2X/ 0,1% SDS e SSC 0,1X/ 0,1% SDS (Sambrook e cols, 1989). Todas estas etapas foram realizadas com a membrana dentro de um cilindro de vidro em constante movimento circulatório dentro de um forno de hibridização. As membranas úmidas foram revestidas em filme plástico de PVC e expostas em um cassete com filmes (KODAK T-MAT) sensível a raios-X a - 80°C. Em algumas ocasiões, as membranas foram dehibridadas, com três

sucessivas lavagens com água Milli-Q por 15 min a 65°C, envolvidas em filme plástico de PVC e guardadas -20°C até o momento da nova hibridização.

13. Radioautografia

As revelações das películas radioautográficas foram realizadas em câmara escura por imersão do filme em solução reveladora Kodak por 1 mim, parando a reação com água e fixando os filmes por imersão em solução fixadora por 5 mim. Em seguida, os filmes foram lavados extensivamente em água corrente e secados à temperatura ambiente.

14. Clonagem e transformação em *E. coli* competente

14.1. Ligação do inserto ao vetor

Os produtos da terceira reação da *tpTAIL*-PCR, com sinais de hibridização mais intensos com sonda de kDNA, foram selecionadas para clonagem. De cada indivíduo foram escolhidos dois produtos amplificados para a ligação do inserto ao vetor. A ligação do inserto ao vetor, foi feita em *pGEM T-easy* (Promega) pela ação da T4 ligase à 4°C por 12 h. Resumidamente, esse vetor comercial caracteriza-se pela presença de uma timina em ambas as extremidades 3'. Assim, a ligação dos produtos se faz possível, pois a *Taq* polimerase utilizada, adiciona uma adenina na extremidade 3' permitindo o pareamento.

14.2. Preparo de células competentes

Escherichia coli competente da linhagem XL10-Gold (Stratagene), tratada com cloreto de rubídio foi utilizada para transformação pelo método de choque térmico (Protocols and Applications Guide, Third Edition, 1996).

14.3. Transformação dos produtos da ligação em células *E. coli* competentes

A técnica de transformação seguiu o protocolo de Sambrook e cols (1989) com modificações. No geral, 3 μL do produto de cada reação de ligação foi adicionado a um *ependorf* contendo 100 μL de células *E. coli* competentes, que tinham sido previamente retiradas do -80°C e descongeladas imersas em gelo. As reações foram mantidas em gelo por 30 min, seguida do choque térmico a 42°C por 2 min, e imediatamente recolocadas no gelo por 5 min. Para crescer as bactérias, 1 mL de meio LB líquido foi adicionado ao *ependorf* e em seguida, foram incubadas à 37°C (250 rpm) por 1 h e 30 min. Após sedimentação por centrifugação (2 min a 14.000 rpm), as bactérias foram plaqueadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky, em placas de petri contendo 25 mL de meio LB Ágar, suplementado com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina (Comercial) e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de X-Gal (*Thermo Scientific*). Para a seleção dos transformantes, as placas foram incubadas à 37°C “overnight”.

14.4. Seleção dos clones recombinantes de *E. coli*

A seleção dos recombinantes se deu pela observação de colônias brancas resistentes a ampicilina. As colônias brancas são formadas quando o inserto é adicionado ao plasmídeo, havendo, assim, o rompimento do gene da β -galactosidase que, conseqüentemente, se torna incapaz de processar o substrato X-Gal. Quando o inserto não se insere, o gene da β -galactosidase codifica a enzima que age sobre X-Gal, formando a coloração azul das colônias. Além disso, o vetor *pGEM T-Easy* também possui o gene de resistência a ampicilina, o que garante que apenas as bactérias transformantes consigam crescer em meio contendo este antibiótico. As colônias brancas foram transferidas para crescimento sobre uma membrana de *nylon* carregada positivamente, e posteriormente tratadas para hibridização com sonda de kDNA. A seleção dos recombinantes foi feito com sinais de hibridização mais intensos com sonda de kDNA (Sambrook e Russel, 2001).

14.5. Extração do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído com uso do kit *illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit* (Healthcare) para análise dos insertos. Para liberação do inserto, utilizou-se a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen), por 12 h a 37°C, seguindo o protocolo do fabricante. Insertos com tamanhos variados e com fortes sinais de hibridização foram enviados para seqüenciamento comercial na Genomic Engenharia Molecular Ltda (São Paulo).

15. Análise das seqüências

A análise das seqüências obtidas foi realizada pelo algoritmo BLASTn disponível no site do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com posterior busca para a identificação de genes. Para a identificação e mapeamentos de *repeats* presentes nas seqüências, fez-se o uso do *repeat masker* Censor-GIRI (<http://www.girinst.org>). A presença de ORF's quimeras hipotéticas foi verificada com o programa UGENE 1.11.1. Alinhamentos usando Geneious 4.8.2 definiram a similaridade dos clones. Os valores utilizados nesse trabalho foram o de máxima identidade, similaridade e *E-value*.

4. RESULTADOS

4.1. Aspectos epidemiológicos

Em 2007 e em 2009 ocorreram microepidemias de infecções agudas pelo *T. cruzi* em alguns municípios do Estado do Pará. As infecções agudas ocorriam em indivíduos da mesma família, e este padrão epidemiológico se repetia em episódios sazonais. Neste estudo foram identificadas três famílias (A, B e C) no município Barcarena e uma em Breves (D) com casos de infecções agudas diagnosticadas como DCA. Do total de 109 indivíduos das quatro famílias, 26,6% (29/109) tinham sintomas clínicos sugestivos de DCA. Destes, 58,7% (17/29) eram do sexo feminino (variação etária de 2 a 73 e média de 28,9 anos) e 41,3% (12/29) do sexo masculino (variação etária de 6 a 71 anos e média de 21,9 anos). Os grupos etários foram assim distribuídos: 10,3% (3/29) entre 0-7 anos; 24,1% (7/29) entre 8-12; 17,2% (5/29) entre 13-18; 27,5% (8/29) entre 19-35; 6,8% (2/29) entre 36-59; e, 13,7% (4/29) acima de 60 anos. A distribuição de idade e gênero está na Figura 7.

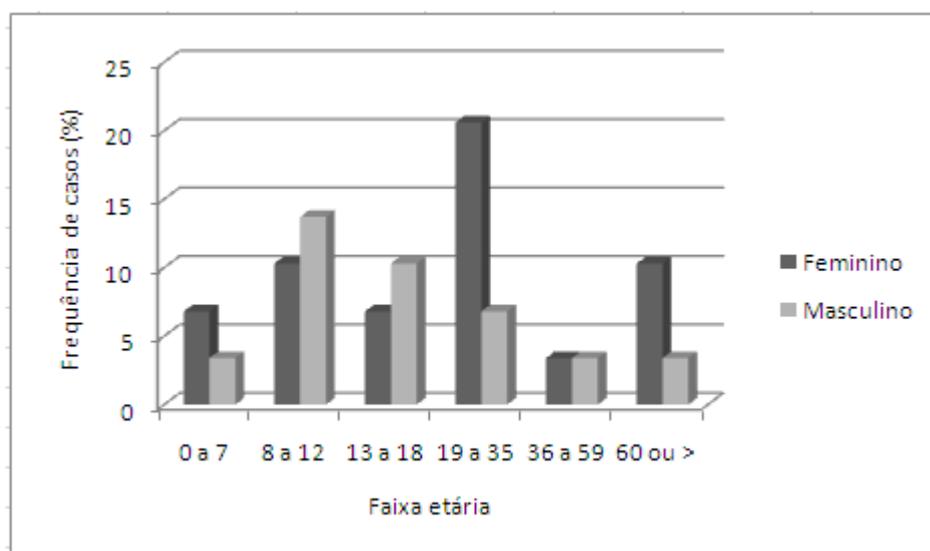


Figura 7: Distribuição da população de indivíduos nas quatro famílias do estudo de acordo com idade e gênero.

4.2. Testes imunológicos para detecção de anticorpos contra antígenos de *Trypanosoma cruzi*

Os resultados dos testes imunológicos para diagnóstico de infecções pelo *T. cruzi* estão apresentados na Tabela 3. Nas famílias A, B, e C, 17% (15/88) dos indivíduos foram notificados em 2007. Na família D, 66,6% (14/21) dos indivíduos foram notificados em 2009 e tiveram resultados positivos nos testes para identificação de anticorpos contra antígenos de *T. cruzi*. Os testes imunológicos de IFI e/ou ELISA mostraram que 35,7% (39/109) dos indivíduos tinham anticorpos da classe IgG para infecção pelo *T. cruzi*.

Tabela 3: Resultados dos testes imunológicos (IFI e/ou ELISA) para detecção de infecções contra antígenos de *Trypanosoma cruzi* nas famílias estudadas.

Famílias	Casos Positivos (%) *
A	29,5% (13/44)
B	26,6% (4/15)
C	20,6% (6/29)
D	76,1% (16/21)
Total	35,7% (39/109)

* Números em parêntesis representam casos positivos / total de indivíduos.

A Figura 8 mostra que 74,3% (29/39) dos casos tiveram exames positivos concordantes pelos testes de IFI e ELISA, outros 17,9% (7/39) foram positivos apenas pelo ELISA, e 7,6% (3/39) tiveram resultados positivos somente pelo teste IFI. Neste estudo, o teste de IFI foi considerado positivo quando houve reação na diluição do soro $\geq 1:40$. Alguns casos foram fortemente positivos até na diluição 1:640. Os índices de positividade para o teste ELISA alcançaram 76,1%, 25%, 20,6% e 20%, respectivamente, nas famílias D, A, C e B. A Figura 8 resume a distribuição dos resultados positivos dos testes IFI e/ou ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* nos 109 indivíduos das quatro famílias.

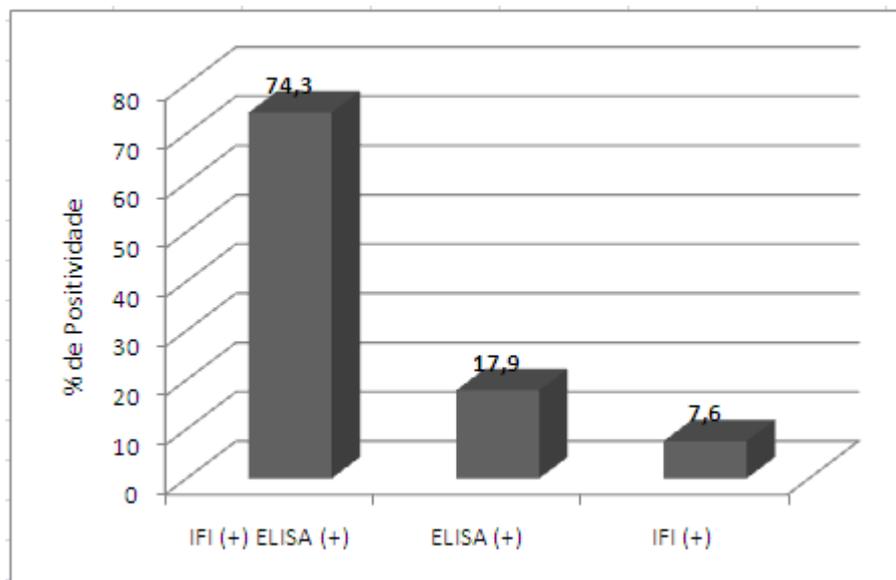


Figura 8: Testes imunológicos IFI e/ou ELISA positivos para infecções pelo *Trypanosoma cruzi* na população do estudo.

Na família A, 29,5% (13/44) dos indivíduos testados tinham anticorpos da classe IgG contra *T. cruzi*. Entretanto, apenas 53,8% (7/13) desses casos eram positivos concordantes por ELISA e IFI. Resultados sorológicos dissociados foram obtidos pelo ELISA em 30,7% (4/13), enquanto 15,3% (2/13) foram positivos apenas pelo exame IFI que detectou anticorpos IgG contra antígenos de *T. cruzi*. Todos os indivíduos da Família A foram negativos para anticorpos da classe IgM anti-*T. cruzi* pelo teste IFI.

Na família B, 26,6% (4/15) dos indivíduos testados tinham anticorpos da classe IgG contra *T. cruzi*. Entretanto, apenas dois casos foram positivos concordantes nos testes ELISA e IFI (50%). Mais dois casos foram positivos, independentemente, pelos testes ELISA (25%) ou IFI (25%) que detectaram anticorpos IgG contra antígenos de *T. cruzi*. Em todos esses casos os testes IFI para anticorpos IgM anti-*T. cruzi* foram negativos.

Na família C, 20,6% (6/29) dos indivíduos testados tinham anticorpos da classe IgG contra *T. cruzi*. Os testes imunológicos ELISA e IFI foram concordantes positivos em 66,6% (4/6) desses casos. Os 2 casos restantes (33,3%) foram positivos apenas pelo teste ELISA. Todos esses casos foram negativos para anticorpos IgM contra antígenos de *T. cruzi* pelo teste IFI.

Na família D, 76,1% (16/21) dos indivíduos testados tinham anticorpos da classe IgG contra *T. cruzi*. Os testes imunológicos ELISA e IFI foram concordantes positivos em todos os casos. Desses, 87,5% (14/16) tiveram testes IFI positivos para anticorpos IgM contra antígenos de *T. cruzi*.

4.3. Diagnóstico molecular das infecções causadas pelo *Trypanosoma cruzi*

Dos 109 indivíduos submetidos à detecção do nDNA do *T. cruzi*, 76,1% (83/109) formaram amplicons com os *primers* TcZ1/TcZ2. Este resultado contrasta marcadamente com aqueles obtidos com os testes imunológicos que detectaram anticorpos contra *T. cruzi* em 35,7% (39/109) dos casos nas quatro famílias do estudo (Figura 9). Os resultados revelam que 53% (44/83) dos casos não foram reconhecidos pelos anticorpos contra os antígenos de *T. cruzi*.

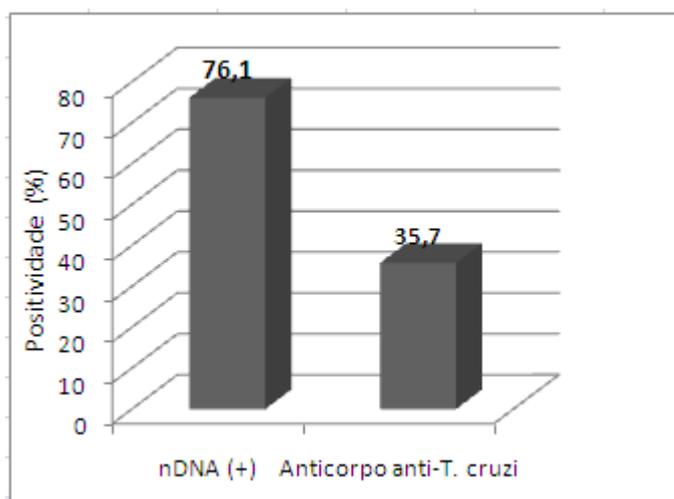


Figura 9: Resultados positivos dos testes PCR para nDNA e IFI e/ou ELISA para detecção de infecções pelo *Trypanosoma cruzi*.

Em 92,6% (101/109) dos indivíduos foram detectadas bandas de tamanho esperado utilizando os *primers* S35/S36 de kDNA de *T. cruzi*. Os resultados de PCR com *primers* de nDNA e kDNA de *T. cruzi* estão sumariados na Tabela 4.

Tabela 4: Diagnóstico molecular das Infecções pelo *T. cruzi* com *primers* de nDNA e kDNA em 109 indivíduos das quatro famílias em estudo.

Famílias	nDNA positivo*	kDNA positivo*
A	77,2% (34/44)	84% (37/44)
B	100% (15/15)	100% (15/15)
C	75,8% (22/29)	96,5% (28/29)
D	57,1% (12/21)	100% (21/21)
Total	76,1% (83/109)	92,6% (101/109)

* Número de amostras amplificadas pelos *primers* específicos/Número total de indivíduos.

Na família A, 29,5% (13/44) dos indivíduos tinham anticorpos específicos da infecção chagásica. Entretanto, o teste de PCR com *primers* específicos para nDNA e para kDNA *T. cruzi* foi positivo em 77,2% (34/44) desses casos. Interessantemente, 67,6% (23/34) dos casos que tiveram PCR positiva para nDNA e kDNA não tinham anticorpos contra antígenos de *T. cruzi*. A PCR com *primers* de kDNA foi positiva em 84% (37/44) dos indivíduos. Em 8,1%, (3/37) dos casos foram positivos apenas para o kDNA do parasito. A Figura 10 mostra os resultados dos testes imunológicos e de PCR com *primers* específicos de nDNA e kDNA de *T. cruzi* da família A.

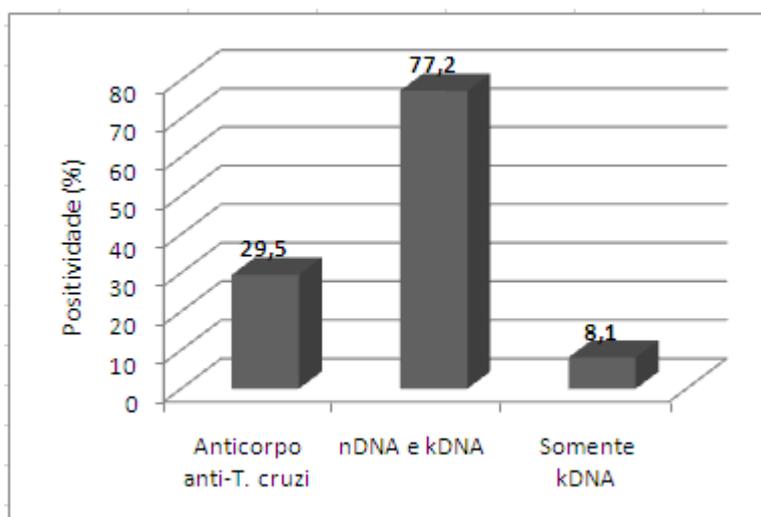


Figura 10: Resultados dos testes IFI e/ou ELISA e PCR com *primers* de nDNA e kDNA indicativos de infecções pelo *Trypanosoma cruzi* na família A.

Na família B, anticorpo IgG contra *T. cruzi* foi demonstrado em 26,6% (4/15) dos casos, porém, o teste de PCR mostrou nDNA e kDNA do parasito em todas as 15 pessoas. De interesse, 73,3% (11/15) dos indivíduos não tinham anticorpos IgG contra antígenos de *T. cruzi*, mas tinham nDNA e kDNA. A Figura 11 mostra os resultados dos testes imunológicos e de PCR com *primers* específicos de nDNA e kDNA de *T. cruzi* da família B.

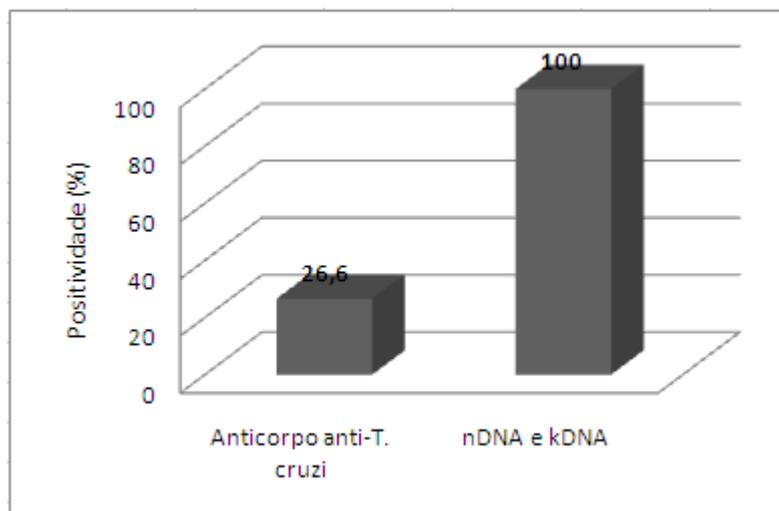


Figura 11: Resultados dos testes IFI e/ou ELISA e PCR com *primers* de nDNA e kDNA indicativos de infecções pelo *Trypanosoma cruzi* na família B.

Na família C, 20,6% (6/29) dos indivíduos tinham anticorpos contra *T. cruzi*, mas a PCR mostrou nDNA e kDNA do parasito em 75,8% (22/29) dos casos. De interesse, 77,2% (17/22) dos casos que tiveram PCR positiva para nDNA e kDNA não tinham anticorpo sérico contra antígeno de *T. cruzi*. A PCR com *primers* de kDNA foi positiva em 96,5% (28/29) dos indivíduos. Em 21,4%, (6/28) dos casos foram positivos apenas para kDNA. Interessantemente, uma pessoa com PCR negativa para nDNA, mas positiva para kDNA, tinham anticorpos contra antígeno de *T. cruzi*. Em resumo, apenas uma pessoa dessa família teve todos os testes negativos para o parasito. A Figura 12 mostra os resultados dos testes imunológicos e de PCR com *primers* específicos de nDNA e kDNA de *T. cruzi* da família C.

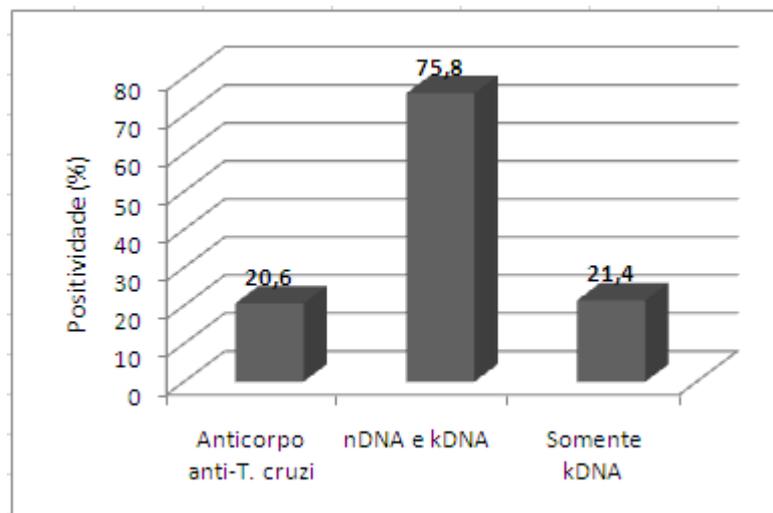


Figura 12: Resultados dos testes IFI e/ou ELISA e PCR com *primers* de nDNA e kDNA indicativos de infecções pelo *Trypanosoma cruzi* na família C.

Na família D, 76,1% (16/21) dos indivíduos tinham anticorpos contra antígenos de *T. cruzi*, mas o teste de PCR revelou resultados combinados positivos de nDNA e kDNA do parasito em apenas 57,1% (12/21) dos casos. A PCR com *primers* de kDNA foi positiva em 100% (21/21) dos indivíduos. Em 42,8%, (9/21) dos casos foram positivos apenas para kDNA. De Interesse, cinco pessoas com PCR negativa para nDNA, mas positivas para kDNA, tinham anticorpos contra antígeno de *T. cruzi*. A Figura 13 mostra os resultados dos testes imunológicos e de PCR com *primers* específicos de nDNA e kDNA de *T. cruzi* da família D.

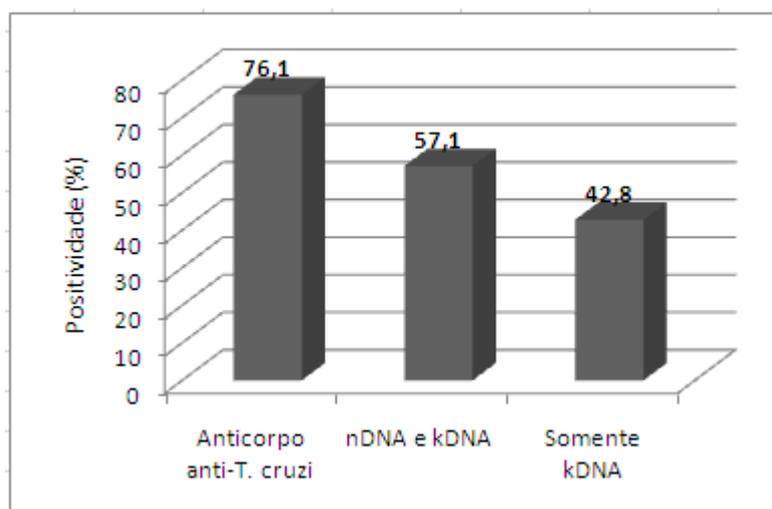


Figura 13: Resultados dos testes IFI e/ou ELISA e PCR com *primers* de nDNA e kDNA indicativos de infecções pelo *Trypanosoma cruzi* na família D.

Os resultados dos testes PCR com *primers* TcZ1/2 indicam que 76,1% (83/109) dos indivíduos das quatro famílias do estudo com nDNA positivo têm a infecção ativa pelo *T. cruzi*. Adicionalmente, 16,5% (18/109) tinham apenas o kDNA retido no genoma, e 7,3% (8/109) dos indivíduos foram negativos nesses testes e, portanto, não tinham tido experiência prévia com o parasito. Esses resultados estão resumidos na Figura 14.

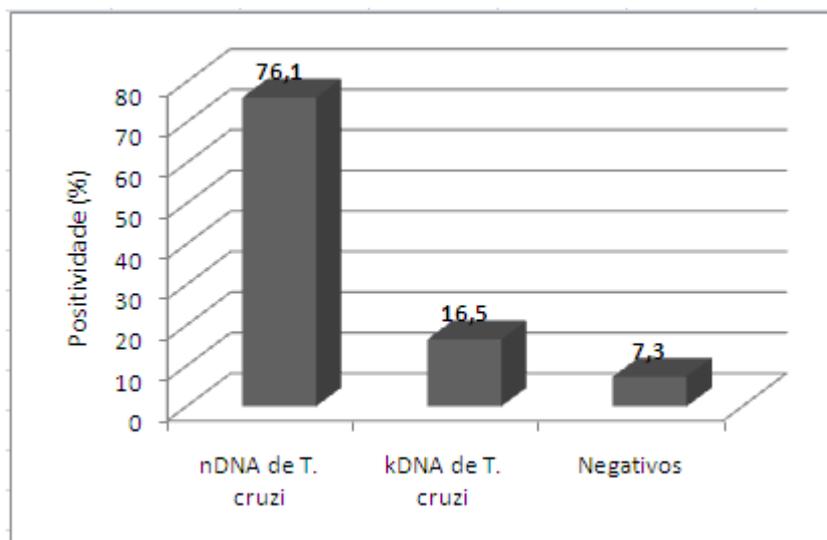


Figura 14: Diagnóstico pela PCR com *primers* de nDNA e kDNA de *Trypanosoma cruzi* em 109 pessoas de quatro famílias do Estado do Pará, Brasil.

No conjunto os testes que identificaram anticorpos anti-*T. cruzi* e marcadores genéticos de nDNA e kDNA do parasito mostram que mais da metade (53%) dos 83 casos positivos pela PCR para nDNA não tinham anticorpos. Apenas 39 casos (35,7%) tinham anticorpos específicos contra o *T. cruzi*. De grande interesse, todos os casos nDNA+ também tinham kDNA+. Porém, 18 casos (16,5%) tinham apenas o kDNA retido no genoma.

Os resultados sumariados na Figura 15 sugerem que as pessoas podem ter a infecção ativa sem suscitar produção de anticorpos contra antígenos do *T. cruzi*. A explicação para este achado pode ser encontrada no capítulo da tolerância imunológica. Por outro lado, a presença exclusiva do kDNA significa que seqüências de minicírculos no genoma de parentais são transferidas para as progênes pela reprodução sexuada (Nitz e cols, 2004; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011b).

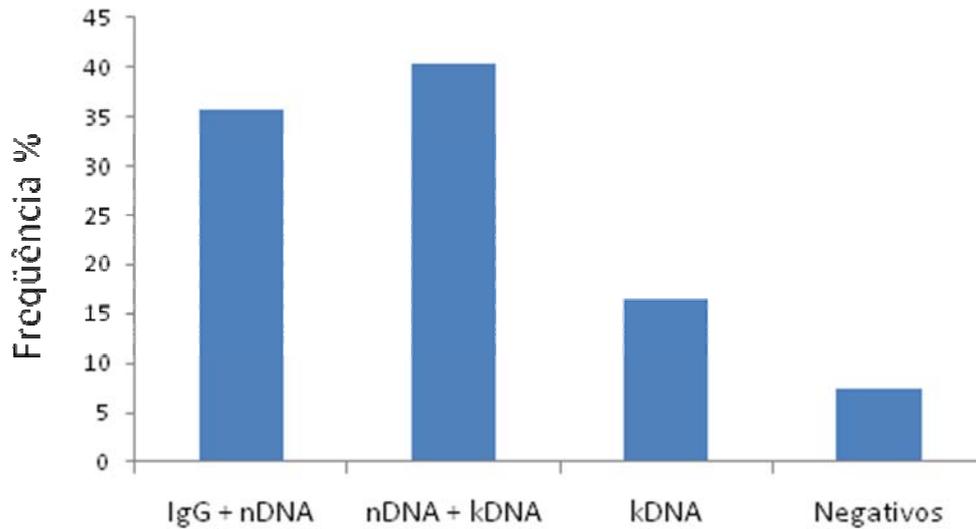


Figura 15: Frequência de casos com anticorpos e/ou marcadores genéticos de nDNA e kDNA de *Trypanosoma cruzi* na amostragem do estudo.

4.4. Diagnóstico diferencial das infecções mistas causadas por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp*

O diagnóstico diferencial entre as infecções por protozoários cinetoplastidas é particularmente importante porque as medidas de vigilância e as monitorações sobre morbidade e mortalidade dessas infecções requerem manejos específicos. Neste estudo, as discrepâncias entre resultados de testes imunológicos e PCR para diagnóstico de infecções pelo *T. cruzi* sugeriram infecções mistas (*Leishmania sp.* e *T. cruzi*) ou reações inespecíficas (cruzadas) contra antígenos indeterminados (Vexenat, 1993). Para esclarecer tais discrepâncias, as 109 amostras de soro e de DNA foram investigadas pelos testes IFI (IgG e IgM) e ELISA (IgG) para identificação de antígenos de *Leishmania braziliensis*, e PCR com *primers* de minicírculos de kDNA de *L. braziliensis*.

4.5. Testes imunológicos para detecção de anticorpos contra antígenos de *Leishmania braziliensis*

Os resultados dos testes imunológicos de *L. braziliensis* mostraram que 46,7% (51/109) dos casos apresentavam anticorpos contra antígenos de *L. braziliensis*. Os resultados imunológicos identificaram anticorpos da classe IgG em 45,4%, 40%, 41,3% e 61,9% dos indivíduos das famílias A, B, C e D, respectivamente. Os resultados dos testes imunológicos (IFI e/ou ELISA) contra antígenos de *L. braziliensis* estão sumariados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados dos testes imunológicos (IFI e/ou ELISA) para detecção de infecções contra antígenos de *Leishmania braziliensis* nas famílias estudadas.

Famílias	Indivíduos Positivos (%) *
A	45,4% (20/44)
B	40% (6/15)
C	41,3% (12/29)
D	61,9% (13/21)
Total	46,7% (51/109)

* Número de amostras positivas/ Número de indivíduos.

A Tabela 5 mostra 46,7% (51/109) indivíduos positivos pelos testes IFI e ELISA (IgG) para *L. braziliensis*. Desses, 19,6% (10/51) tiveram resultados concordantes pelos os testes IFI e ELISA, 72,5% (37/51) foram positivos pelo ELISA, e 7,8% (4/51) foram positivos pelo teste de IFI. O resultado de IFI era considerado positivo na diluição $\geq 1:40$. Todos as pessoas foram negativas no teste IFI IgM anti-*L. braziliensis*. Os índices de positividade para o ELISA alcançaram 47,6%, 45,4%, 40%, e 37,9%, respectivamente, nas famílias D, A, B e C. A Figura 16 mostra a frequência de resultados positivos para os testes IFI e/ou ELISA contra antígenos de *L. braziliensis*.

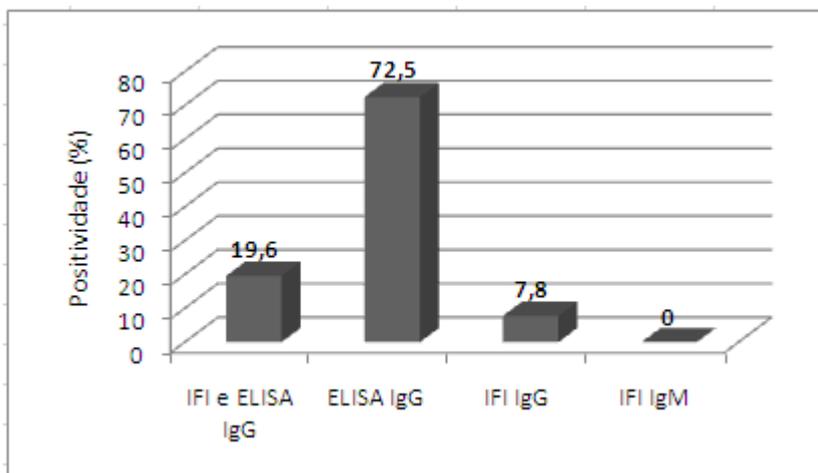


Figura 16: Identificação de anticorpos contra antígenos de *L. braziliensis* pelos testes IFI e/ou ELISA nas quatro famílias do estudo.

Os testes imunológicos sugeriram que 28,4% (31/109) dos casos tinham infecções mistas, pois apresentavam anticorpos que reconheceram ambos os antígenos, de *T. cruzi* e *L. braziliensis*. Destes, 74,1% (23/31) tiveram resultados concordantes pelo ELISA e IFI, 16,1% (5/31) foram positivos pelo ELISA e 9,6% (3/31) tiveram resultados positivos apenas pelo IFI. Em, 18,3% (20/109) das pessoas tinham apenas a infecção pela *L. braziliensis*. Por outro lado, os testes mostraram 7,3% (8/109) dos casos positivos para *T. cruzi* eram negativos para *L. braziliensis*. As demais pessoas da amostragem 45,8%, (50/109) não apresentaram anticorpos específicos para o *T. cruzi* e *L. braziliensis*. Esses resultados estão representados na Figura 17.

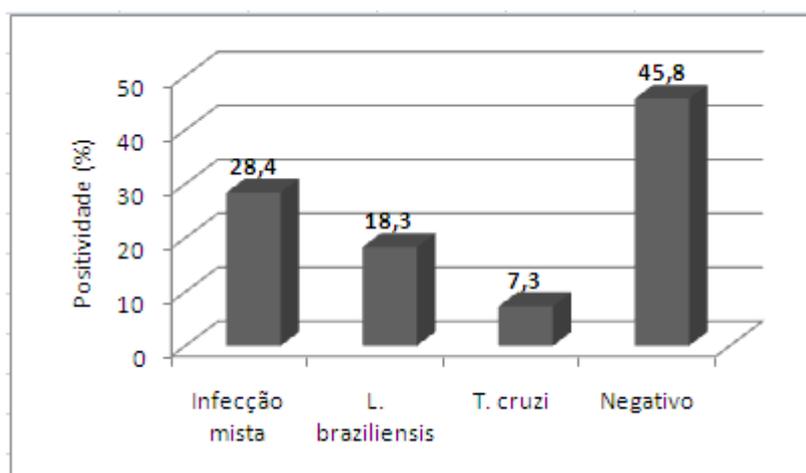


Figura 17: Evidência de infecções mistas: Identificação de anticorpos contra antígenos de *T. cruzi* e de *L. braziliensis* pelos testes IFI e/ou ELISA na população do estudo.

4.6. Diagnóstico molecular das infecções causadas por *Leishmania braziliensis*

As 109 amostras foram submetidas a PCR com *primers* de kDNA de *L. braziliensis* para a confirmação do diagnóstico imunológico das infecções causadas por *L. braziliensis*. Os testes moleculares revelaram que 83,4% (91/109) tiveram o kDNA de *L. braziliensis* amplificado pelos *primers* B1/B2. Este resultado tem significado diante do achado de anticorpos contra os antígenos de *L. braziliensis* em apenas 46,7% (51/109) dos indivíduos nas quatro famílias do estudo (Figura 18).

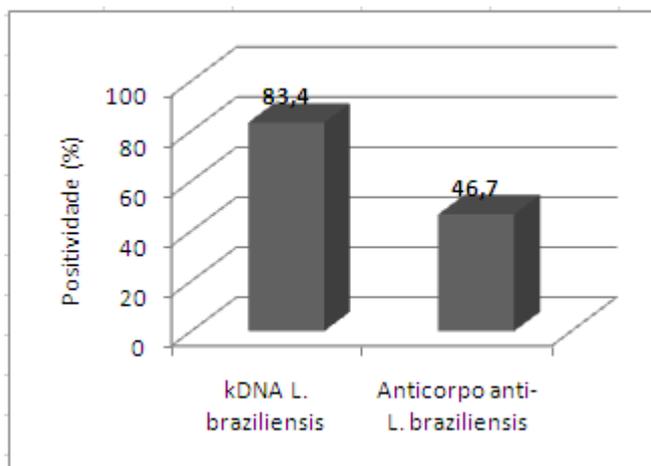


Figura 18: Comparação entre os resultados moleculares e imunológicos para a identificação das infecções causadas por *L. braziliensis*.

Os resultados obtidos no diagnóstico molecular com *primers* de kDNA de *L. braziliensis* estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Freqüência das infecções diagnosticadas pela PCR com *primers* de minicírculo de kDNA de *L. braziliensis* em 109 indivíduos das quatro famílias.

Famílias	kDNA <i>L. braziliensis</i> positivo*
A	81,8% (36/44)
B	73,3% (11/15)
C	86,2% (25/29)
D	90,4% (19/21)
Total	83,4% (91/109)

* Número de amostras amplificadas pelos *primers* específicos/ Número total de indivíduos.

Os resultados obtidos no diagnóstico molecular com *primers* de nDNA e kDNA de *T. cruzi* (Tabela 4) foram comparados com os dados de diagnóstico molecular com *primers* de kDNA de *L. braziliensis* (Tabela 6). Com isso, as infecções pelo *T. cruzi* foram identificadas em 76,1% das pessoas, enquanto que a *L. braziliensis* estava presente em 83,4% dessa coorte. Esses dados mostram que a maioria das 76,1% pessoas portadoras nDNA de *T. cruzi* também eram positivas para kDNA de *L. braziliensis*. As análises dos resultados indicam que 100% das pessoas da família B tinham a infecção pelo *T. cruzi*, mas apenas 73,3% dessa mesma família eram infectadas por *L. braziliensis*. Além disso, 57,1% das pessoas da família D tinham a infecção pelo *T. cruzi*, enquanto que 90,4% dessa mesma família eram infectados com *L. braziliensis*. As infecções mistas também tiveram distribuição semelhante nas famílias A e C. Brevemente, esses resultados mostram infecções mistas na grande maioria das pessoas na população estudada, porém, sem manifestação clínica de doença ativa.

4.7. Validação dos resultados de PCR com *primers* de nDNA e kDNA pela demonstração do *Trypanosoma cruzi* no sangue dos pacientes

Para validação dos resultados dos testes moleculares, os 29 indivíduos das quatro famílias, com manifestações clínicas de infecção aguda, foram submetidos a diferentes métodos parasitológicos (Tabela 7). Esses exames foram feitos no IEC/PA no mês do início das manifestações clínicas sugestivas de infecção aguda pelo *T. cruzi*. Os resultados revelaram que 72,4% (21/29) dos indivíduos, tiveram o diagnóstico de DCA confirmado pela demonstração direta do *T. cruzi* no sangue, e/ou isolado pelo xenodiagnóstico e/ou pela hemocultura (Tabela 7). Entretanto, outras tentativas de cultivar o *T. cruzi* no sangue das 109 pessoas, 2 e 5 anos após o diagnóstico de DCA, deram resultados negativos. O resultado negativo das hemoculturas repetidas em duas ocasiões confirma que as infecções crônicas pelo *T. cruzi* tornam-se crípticas e inacessíveis aos métodos parasitológicos de diagnóstico. Os resultados obtidos pelos exames parasitológicos em 21 casos com diagnóstico para a DCA estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Resultados dos exames parasitológicos em 21 casos diagnosticados com infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi*.

Famílias	Gota espessa/QBC	Xeno	Hemocultura
A	4/8	2/8	8/8
B	3/3	1/3	2/3
C	0/4	0/4	2/4
D	5/14	7/14	7/14
Total	41,3% (12/29) *	34,4% (10/29) *	65,5% (19/29) *

* Número de amostras positivas/ Número de indivíduos.

De grande interesse, em todos os casos com exame parasitológico positivo o teste PCR com *primers* TcZ1/2 amplificou a seqüência de 188 bp da região de DNA repetitivo do núcleo do protozoário. Diante do conjunto de exames efetuados, os resultados obtidos foram distribuídos pelas pessoas de cada família, conforme mostram os heredogramas.

4.8. Resultados dos exames de PCR com *primers* específicos de nDNA e kDNA nas quatro famílias do estudo

A Figura 19 resume os resultados obtidos nos testes de amplificação do nDNA e do kDNA do *T. cruzi* nas famílias A a D. Note que na família A, apenas os casos 125, 126, 127, 130, 136, 139, e 140 tiveram exame negativo para kDNA. Na família B, todos os casos têm o kDNA retido no genoma. Na família C, apenas o caso 119 não tinha kDNA no genoma. E na família D, todos os casos tinham o kDNA retido no genoma.

A Figura 19 também mostra que na família B, todos os casos são positivos para o nDNA. Na família A, os casos 124 e 138 tinham ausência de nDNA no genoma. Na família C, os casos 102, 120, 128, 131, 132, e 133 não retiveram o nDNA do *T. cruzi* no genoma. Finalmente, na família D os casos 61, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 77, e 79 também não tinham o nDNA do parasito no genoma. De grande interesse, todos esses 18 casos retiveram apenas o kDNA no genoma. A visualização desses dados é apresentada nos heredogramas 20 a 23.

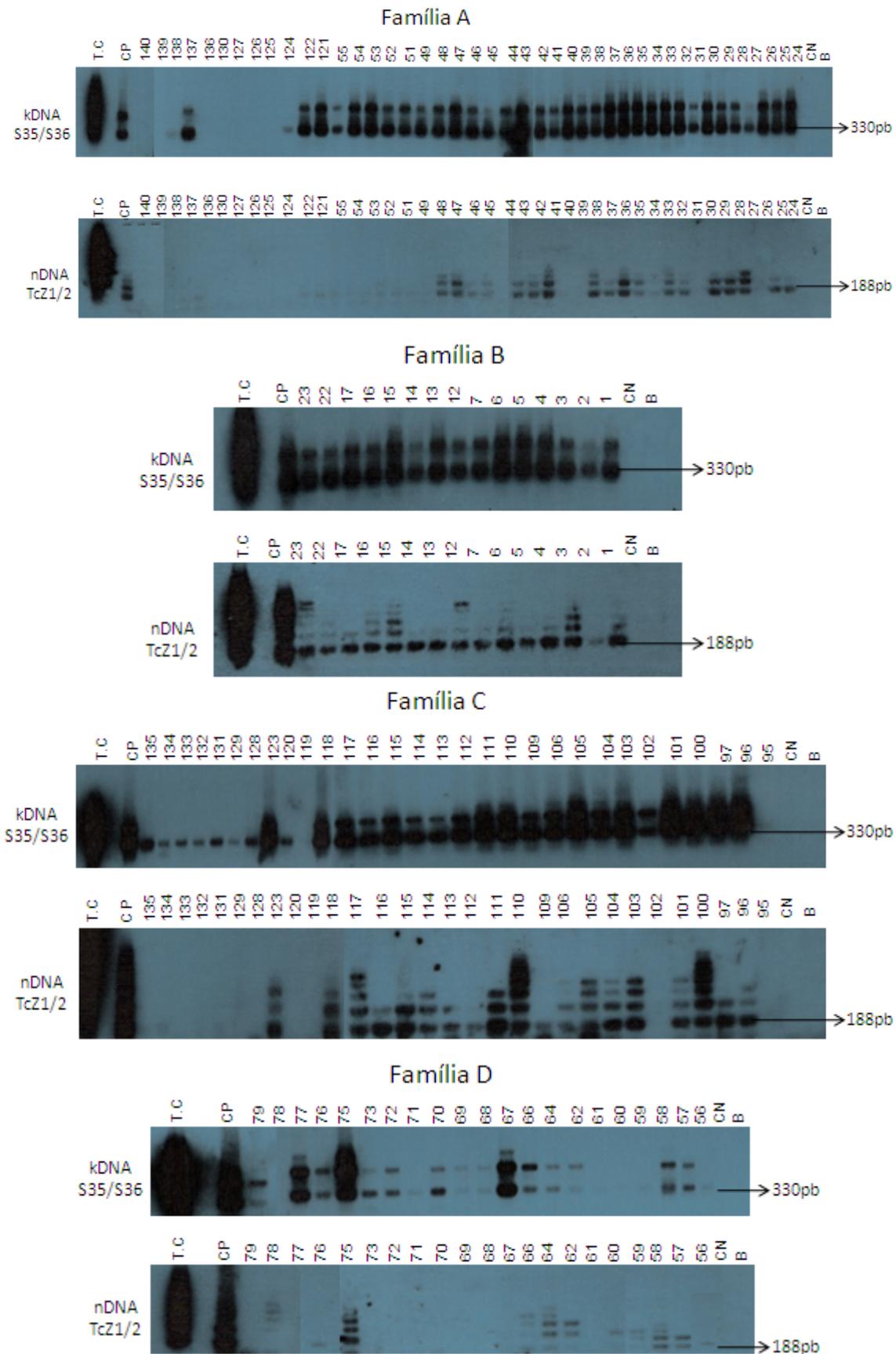


Figura 19: Retenção de kDNA e nDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de pessoas das quatro famílias do estudo.

4.9. Heredogramas com resultados dos exames imunológicos e de PCR para infecções pelo *Trypanosoma cruzi* nas quatro famílias estudadas

Os heredogramas das quatro famílias (Figuras 20 a 23) ilustram os resultados dos testes parasitológicos, imunológicos e moleculares (nDNA e kDNA) que identificam o portador de infecção ativa ou o contato prévio com o *T. cruzi*.

Para apreciação visual desses achados, recomenda-se que o leitor tenha conhecimento antecipado sobre a legenda dos heredogramas: nas Figuras 20, 21, 22 e 23 círculo e quadrado indicam, respectivamente, mulher e homem. Círculo e quadrado vermelho representam pessoas que tiveram nDNA+, kDNA+, e testes sorológicos positivos para *T. cruzi*. Círculo e quadrado preto representam casos com nDNA+, kDNA+, e sorologia negativa. Círculo e quadrado verde representam pessoas que tiveram kDNA+. Círculo e quadrado branco tiveram nDNA e kDNA negativos. Halo dourado significa que tiveram DCA confirmada pelo exame parasitológico, com nDNA+, kDNA+, e sorologia positiva para *T. cruzi*. Linha diagonal interna significa falecido. Círculo e quadrado sem numeração significam que não entrou no estudo. Os indicados com asteriscos (*) tiveram nDNA+, kDNA+ nas células germinativas (Dados da dissertação de Carlos Fernando Pimentel, Universidade de Brasília, 2012).

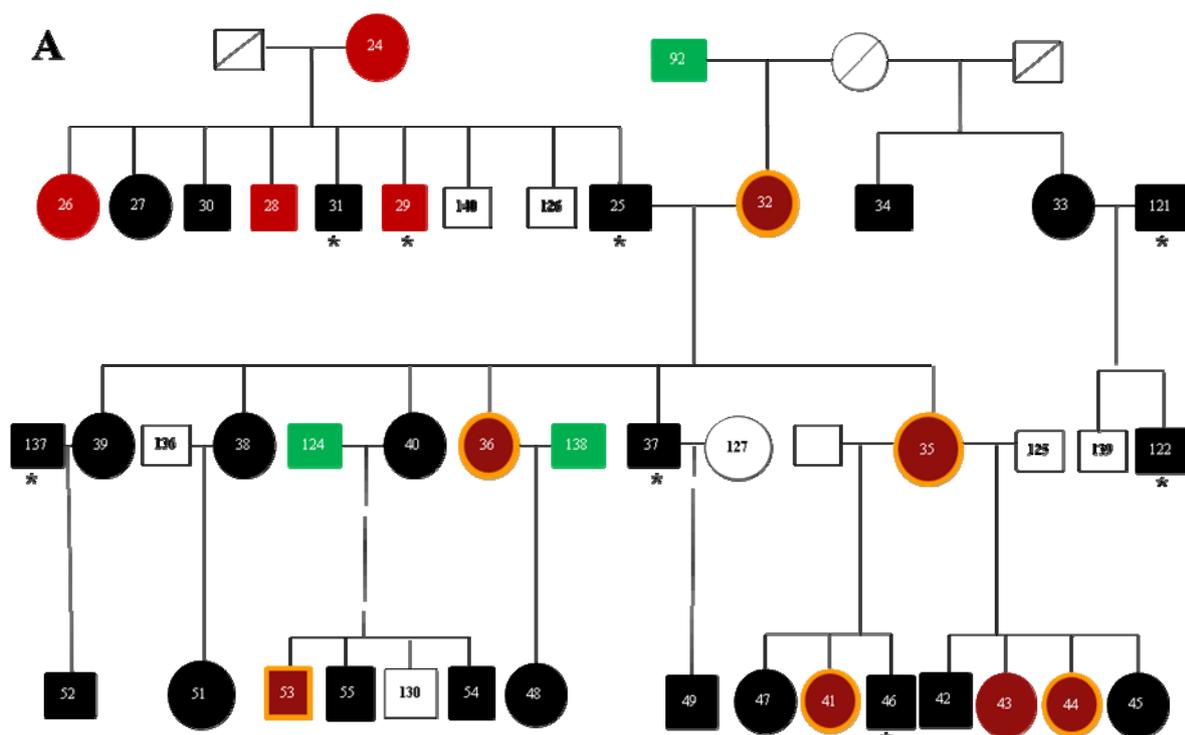


Figura 20: Heredograma da Família A com resultados de testes sorológicos e de PCR com *primers* específicos de kDNA e nDNA de *Trypanosoma cruzi*. Círculo e quadrado indicam, respectivamente, mulher e homem. As cores utilizadas têm os seguintes significados: Vermelho: kDNA+/nDNA+(Ac+); Preto: kDNA+/nDNA+(Ac-); Verde: kDNA+/nDNA-; Branco: kDNA-/nDNA-; Halo dourado: kDNA+/nDNA+/Parasitológicos+ (DCA); Linha diagonal: Falecido; Sem numeração: Não entrou no estudo; Asteriscos: kDNA+/nDNA+(Células germinativas).

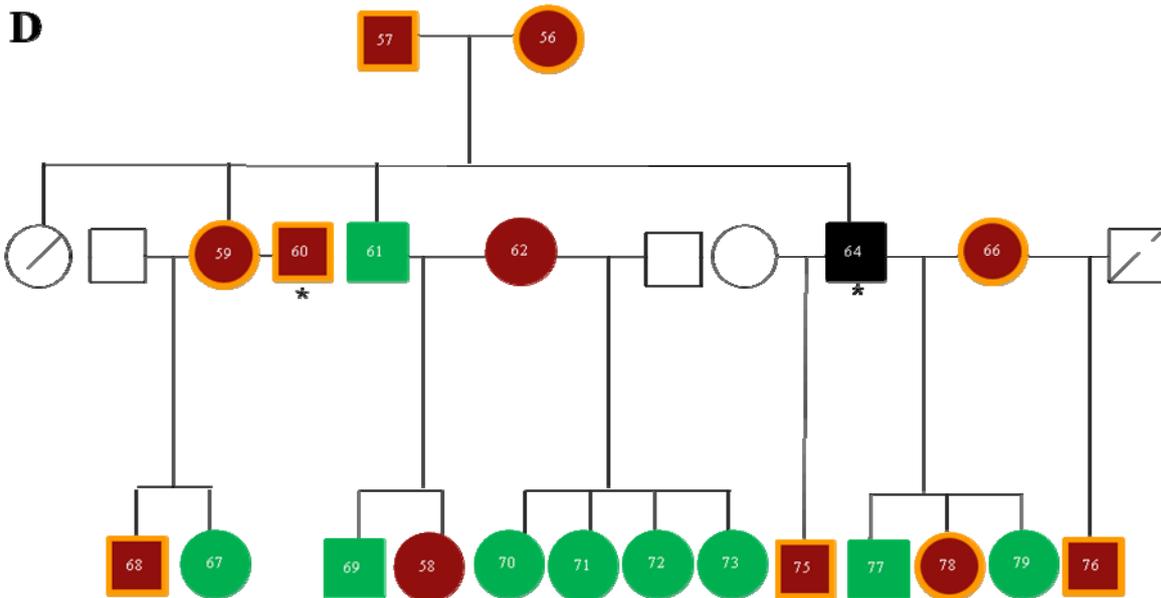


Figura 23: Heredograma da Família D com resultados de testes sorológicos e de PCR com *primers* específicos de kDNA e nDNA de *Trypanosoma cruzi*. Círculo e quadrado indicam, respectivamente, mulher e homem. As cores utilizadas têm os seguintes significados: Vermelho: kDNA+/nDNA+(Ac+); Preto: kDNA+/nDNA+(Ac-); Verde: kDNA+/nDNA-; Halo dourado: kDNA+/nDNA+/Parasitológicos+(DCA); Linha diagonal: Falecido; Sem numeração: Não entrou no estudo; Asteriscos: kDNA+/nDNA+(Células germinativas).

5. Análise da integração de seqüências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma humano

Trabalhos prévios (Nitz e cols. 2004; Hecht e cols. 2010; Teixeira e cols, 2011b) mostram que mutações de kDNA fixadas no genoma chagásico e sua progênie pode ser transferida para seus descendentes ao longo das gerações. Neste estudo, nós investigamos a herança das mutações nos genomas dos chagásicos e seus descendentes em três gerações de quatro famílias. A *tpTAIL*-PCR foi utilizada para mapear em larga escala a freqüência de integrações de kDNA do *T. cruzi* no genoma de todos os indivíduos kDNA+ (101/109). Os produtos obtidos do 3º ciclo de amplificação foram reconhecidos pela sonda específica de kDNA marcada radioativamente (Figura 24), e após foram submetidos à clonagem e seqüenciamento.

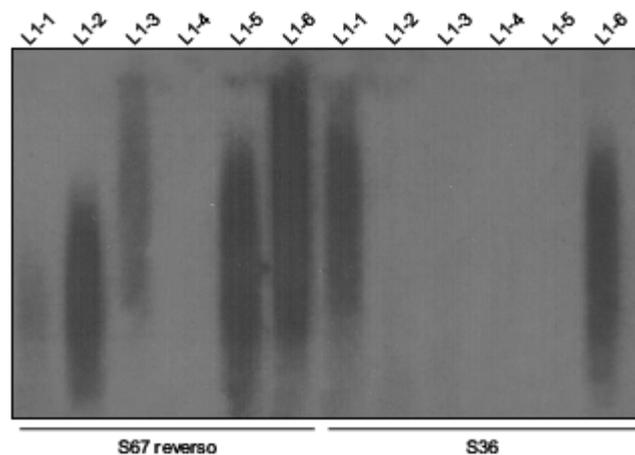


Figura 24: *Southern blot* dos produtos da *tpTAIL*-PCR3 proveniente do indivíduo chagásico 76 (Família D).

Dos 970 clones seqüenciados (PA01 a PA970), 23,5% (228/970) continham apenas o vetor ou a reação não tinha a qualidade satisfatória; 4,4% (43/970) apresentavam apenas DNA humano; e, 25,2% (245/970) tinham apenas o kDNA de *T. cruzi*. Contudo foram obtidos 46,8% (454/970) clones contendo seqüências de kDNA flanqueadas pelo DNA humano (Tabela 8). Esse resultado foi similar em outro projeto do LMPDC (Hecht e cols, 2010).

Tabela 8: Rendimento das *tpTAIL*-PCR's

Análise de rendimento dos Clones	% *
Sem similaridade com kDNA/Humano	23,5% (228/970)
DNA Humano	4,4% (43/970)
kDNA	25,2% (245/970)
Quimera kDNA/DNA humano	46,8% (454/970)

* Número de clones com as características indicadas /Total de clones seqüenciados.

O alinhamento dessas 454 seqüências kDNA-DNA flanqueador mostrou que muitas eram idênticas as obtidas de outros clones. O resultado dessa análise subtrativa revelou 430 seqüências quimeras obtidas de 98 dos casos kDNA+. Em apenas três chagásicos (25, 36 e 39) da família A não foi possível obter seqüência quimera, possivelmente, devido à dificuldade de seqüenciamento de regiões repetitivas ou indeterminadas do genoma onde o kDNA fica integrado.

As 430 seqüências quimeras kDNA-DNA humano estão detalhadas no Anexo I. O mapeamento dessas mutações de kDNA no genoma humano e os *loci* de integrações nos cromossomos estão ilustrados na Figura 25.

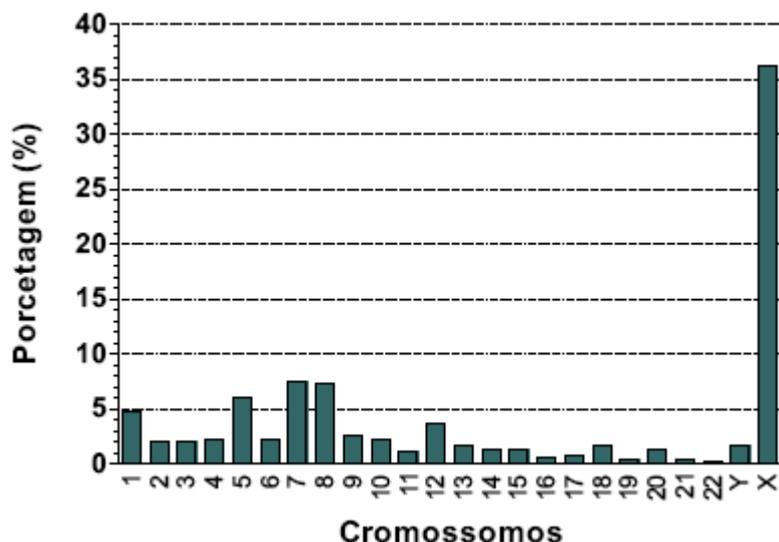


Figura 25: Freqüência das integrações de seqüências de minicírculos de kDNA do *Trypanosoma cruzi* em cromossomos humano. Note que 36% das integrações ocorreram no cromossomo X. Em seguida, os cromossomos 1, 5, 7, e 8 aparecem com maior número de mutações.

O cromossomo X concentrou 36,2% (156/430) das mutações no genoma das pessoas das quatro famílias, sendo que em 92,3% (144/156) desses casos a inserção do kDNA ocorreu no *locus* AL732374.14. Nos 12 casos restantes as mutações estavam distribuídas em outros *loci* do cromossomo X (Anexo I).

Esses dados corroboram as integrações de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* em pessoas de cinco famílias de diferentes ecossistemas brasileiros (Hecht e cols, 2010). Aspectos de integrações repetidas de regiões truncadas de kDNA estão ilustrados na Figura 26 (clone PA531) do indivíduo chagásico 96 (Família C), no *locus* AL732374.14 do cromossomo X. Esta seqüência exhibe fragmentos de cinco regiões conservadas de minicírculos interesparsadas por fragmentos de LINE-1, sugerindo que pelo menos dois minicírculos teriam sido incluídos nesse evento.

A)

67rev

```

1      GAACCCCTCCCT CCCAAAACCA GGAAGAAGAT TAATCTCTGA ATAGACCAAT AACAGGCTCT
61     GATACACATA CACCCTCCCA AGACTAAACC AGGAAGAAGT TTAATCTCTG AATACACCAA
121    CCCCAATCGG ACCCCACCTC CCGTAAACAA CCCTCATTTT CGGCAGTATA ATGTACGGGG
181    GAGATGCATA ATGTATGGGT GAGATGCATG ATTTTTCGGC CATAAATTTG AGGCCCTCC
241    CAAGACTAAA CCAGGAAGAA GTTGATCTC TGAATAGACC AATAACAGGG GCAGTATAAT
301    GTACGGGTGA GATGTATAAT GNACGGGAGA TGCATGATTT TTCGGGCCAT AAATTTGAGG
361    CCCCTCCCAA GACTAAACCA GGAAGAAGTT GGATCTCTGA ATAGACCAAC CCCAATCGAA
421    CCCACCTCC CGTGAACAAC CCTCATTTTC GGCAGTATAA TGTACGGGGG AGATGCATAA
481    TGTACGGGGG AGATGCATAA TGTACGGGTG AGATGCGTGA TTTTTCGGCC ATAAATTTGA
541    GGCCTCTCCC AAGACTAAAC CAGGAAGAAG TTTAATCTCT GANNACACCA ACCCAATCG
601    AACCCACCT CCCGTAAACA ACCCTCATTT TCGGCAGTAT AATGTACGGG GGAGATGCAT
661    GATTTTTCGG GCCCAAATTT GAACCCCTCC CCAAGACTA AACCAGGAGG AAGTTGAGTC
721    TCTGAATAGA CCAATAACAG GCTCTGATAC ACATACACCC TCCAAGACT AAACCAGGAA
781    GAAGTTTAAAT CTCTGAATAC ACCAACCCCA ATCGAACCCC ACCTCCCGTA AACCAACCTC
841    ATTTTCGGCA GTATAATGTA CGGGTGAGAT GCATGATTTT TTGACCATAA ATTTGAGGCC
901    TCTCCAAGA CTAACCAGG A

```

L1-5

B)

[emb|AL732374.14|](#) **ED** Human DNA sequence from clone RP13-444K19 on chromosome X Contains a mitochondrial ribosomal protein S18C (MRPS18C) pseudogene, the 3' end of the PHF8 gene for PHD finger protein 8 and a CpG island, complete sequence
Identities = 112/118 (95%), Gaps = 0/118 (0%)
Score = 187 bits (206), Expect = 2e-43

[gb|M19188.1|TRBKPMCO](#) T.cruzi kinetoplast minicircle DNA, clone y01 cst 4
Identities = 103/118 (87%), Gaps = 1/118 (1%)
Score = 141 bits (156), Expect = 7e-30

Figura 26: Evento de integração de seqüência de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no locus AL732374.14 do cromossomo X. **A)** Clone do indivíduo 96 (PA531). Cinco fragmentos de minicírculos de kDNA (em azul) estão intercaladas em LINE-1 (seqüência verde) truncado. Os trechos em amarelo têm identidade compartilhada de kDNA e DNA humano. Os primers utilizados no terceiro ciclo da *tpTAIL*-PCR estão sublinhados. **B)** Análise BLASTn da quimera.

De grande importância, todas as 430 seqüências quimeras integradas no genoma dos 98 indivíduos compartilharam em média 61 ± 1 pb. Em geral, verificou-se que os motivos (repetições) ricos em A/C (adenina/citosina), foram constantemente encontrados nas junções do kDNA com o DNA do hospedeiro. Essas microhomologias foram identificadas em vários de nossos clones e nos trabalhos prévios em humanos (Hecht e cols, 2010) e em aves (Teixeira e cols, 2011b). As microhomologias presentes nas seqüências do minicírculo de kDNA e do genoma humano intermediam a recombinação homóloga e a integração do DNA exógeno (Mcvey e Lee, 2008).

A presença de regiões flanqueadoras longas permitiu um *E-value* bastante significativo, onde foi possível obter escores 0.0 (identidade completa) em 5,5% (24/430) dos clones. Na Figura 27 podemos mostrar o clone PA441 proveniente do indivíduo chagásico 52 (Família A), onde a seqüência do kDNA de *T. cruzi* está ligada a seqüência de DNA humano do cromossomo 8.

A) 67rev

```

1      GAACCCCTC CCAAACCCG ATTTTCGAAT CTTCAAACCC GTAATTATCC AACACCATTC
61     ACCATCCGTA ACACCACCAA CACCGAACCT CTACCGCCAT ATTATAAAAAG ATATATACAA
121    CTAACATTAC TAACTATATA CATTATGAGC TCATTAACCC ACCAAGTATA AATATCACAC
181    ACGTACTATA TATATCACAT CATTCAACTA CACTCTAAAA CATCACACAC CCATTCTATA
241    ATCATCCACC TAGTCCTATA TTACACCAAC CCAATGGAA CCCCACCTC CCGTAAACAA
301    CCCCATTTT CGGCCATATA ATGTACGGGG GAGATGCATG ATTTTCCGG CCCAAATTTG
361    AACCCCTC CCAAACCCG TATTTACGA ATCTCCATAC CTCATACCCG GTAACCATAA
421    CACAAACACA ATCATAACAAC CCCATTAACC AAATATATAA ACTGTAATAT AACTCTAATT
481    ATACAAACTT AAACCACCTA CCAAAGTGA ACTCACACGA TATAAACTCA CATAATCAT
541    CTTAAACATA TTCAATAAGT TATATACCA ATATTCTACT AATCCACTAA CCTCCTTATA
601    TTACACCAAC CCAATCGAA CCCCACCTCC CGTAAACACA CCCCATTTTC GGCATATAA
661    TGTACGGGGG AGATGCATGA TTTTTCGGGC CCAAAGTGA AACCCCTCCC AAGACTAAAC
721    CAGGAGCACC AACCCCAATC GAACCACACC AACCCCAATC GAACTACACC AACCCCAATG
781    GAACCTGAAC AACCTGCTCC TGAATGACTA CTGGGTAAAT AATGAAATGA AGGCAGAAAT
841    AAATAAGTTN TTTGAAACCA ATGAGAACA AGACACAGCG TACCAGAATA TNTGGGACAC
901    AGCTAAAGCA GTGTGTAGAC GGAAATTTAT AGCACTAAAT GCCACAGGA GAAAGTGGGA
961    AAGACACCCT AACATCACAG TTTAAAGAAG TAGAGAAACA AGGGCAAACA AATTCAAAAG
1021   CTAGGAGAAG GCAAGAAATA AATAAGATCA GAGCAGAACT GAAGGAAATA GAGACACAA
1081   AAACCCTTCA AAAAATTAAT GAATCCAGGA GCTGGTTTTT TCAAATGATC AACAAAATCG
1141   ATAGACCGCT AGCAAACTA ACAAAGAAGA AAAGAGAGAA GAATCAAATA AATGCAATAA
1201   AAAATGATAA AGGGGATATC ACCACCAATC CCACAGAAAT ACAAATACC ATCAGAGAAT
1261   ACTATAGACA CCTCTATGCA AATAAAGTAG ATGTTGTAGA AGAAATGGAT AAATTC

```

B)

[ref|NG_012005.1](#) D Homo sapiens neuregulin 1 NRG1, RefSeqGene on chromosome 8;
Identities = 503/541 (93%), Gaps = 2/541 (0%)
Score = 800 bits (886), Expect = 0.0
[gb|M18814.1|TRBKPMCAA](#) T.cruzi kinetoplast minicircle DNA, clone KY-13;
Identities = 388/499 (78%), Gaps = 41/499 (8%)
Score = 333 bits (368), Expect = 2e-87

Figura 27: Quimera formada pela integração de seqüência de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma de um indivíduo chagásico. **A)** Clone do indivíduo 52 (PA441). A seqüência em azul escuro, representa uma região conservada de kDNA (*E-value*= 2e-87), em azul claro a região variável, seguido em verde de uma seqüência de DNA humano do cromossomo 8. O trecho em amarelo representa a região de microhomologia (bases compartilhadas) entre os DNAs. Os *primers* utilizados na terceira reação da *tpTAIL*-PCR estão sublinhados. **B)** Resultado obtido após análise das seqüências no BLASTn.

5.1. Características das seqüências flanqueadoras do kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma humano

As análises das seqüências repetitivas no genoma humano, feita com emprego do *repeat masker* CENSOR-GIRI, revelaram que, as integrações ocorreram predominantemente em retrotransposons autônomos do tipo LINE-1, o que representou 70% (301/430) dos clones seqüenciados. O *locus* AL732374.14, identificado como sítio preferencial de integração do kDNA no cromossomo X, foi caracterizado como um elemento do tipo LINE-1. Este relato confirma os dados anteriores (Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011b). As integrações de kDNA em retrotransposon não autônomo do tipo (*Alu*), em retrovírus endógenos (HERV, MER e PRIMA) e em DNA transposons (CHARLIE), representou respectivamente, 0,9% (4/430); 6,2% (27/430) e 0,2% (1/430) do total de clones seqüenciados, conforme apresentado na Figura 28.

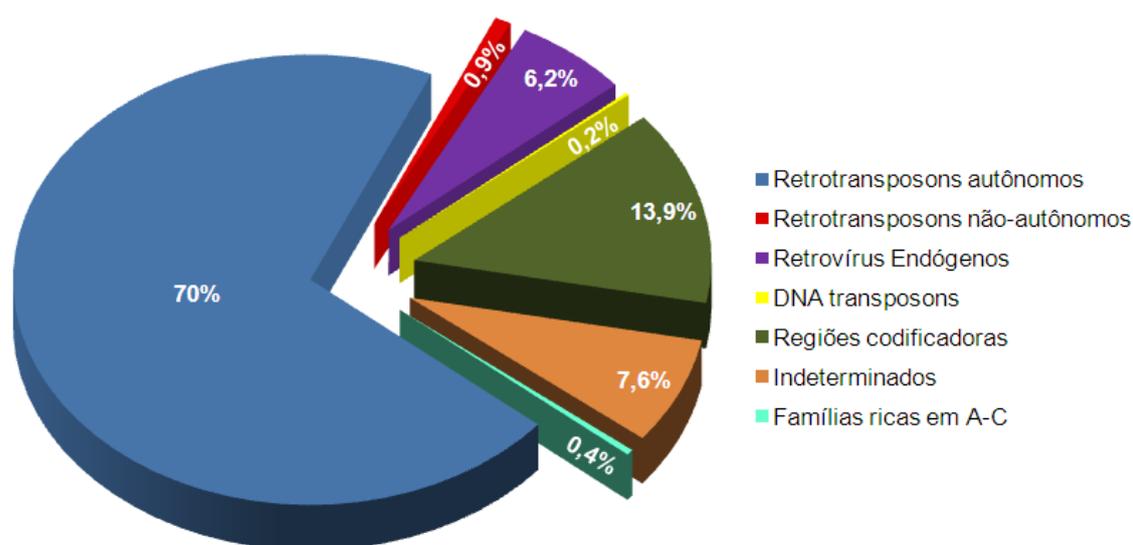


Figura 28: Integração de seqüências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em elementos repetitivos no genoma humano.

As integrações de kDNA em regiões codificadoras do genoma humano foram identificadas em 13,9% (60/430) das seqüências quimeras. Esse resultado foi semelhante àquele obtido por Hecht e cols (2010) nas cinco famílias de chagásicos de vários ecossistemas. As famílias A e C concentraram 83,3% (50/60) das mutações no *locus* BC137023.1 do gene de receptor olfatório (OR1-17). Adicionalmente, 16,6% (10/60) das mutações ocorreram nos genes PRKY (*Protein Kinase, Y-linked*), PHF15 (*PHD finger protein 15*), MYO3A (*Myosin IIIA*) e EFTUD2 (*Translation elongation factor Tu domain 2*). O pseudogene, tRNA-*Asp-Gay* foi encontrado no clone PA956 do caso 73 (Família D). As demais mutações 0,4% (2/430) ocorreram em regiões ricas em A-C.

Não obstante a qualidade das seqüências obtidas com até 1317 pb, em 7,6% (33/430) dos casos não foi possível determinar o *locus* de integração. Observou-se que nos bancos de dados, inclusive no GIRI há ausência de informação sobre esses sítios de integração de kDNA no genoma humano, ainda que as identidades com a seqüência quimera obtivesse *E-value* ($5e-67$) significativo e identidade (99%). Esses casos indeterminados estão detalhados no (Anexo I). Neste estudo, 14,6% (63/430) das mutações de kDNA foram encontradas nas 19 famílias de elementos LINE-1 identificadas na Figura 29.

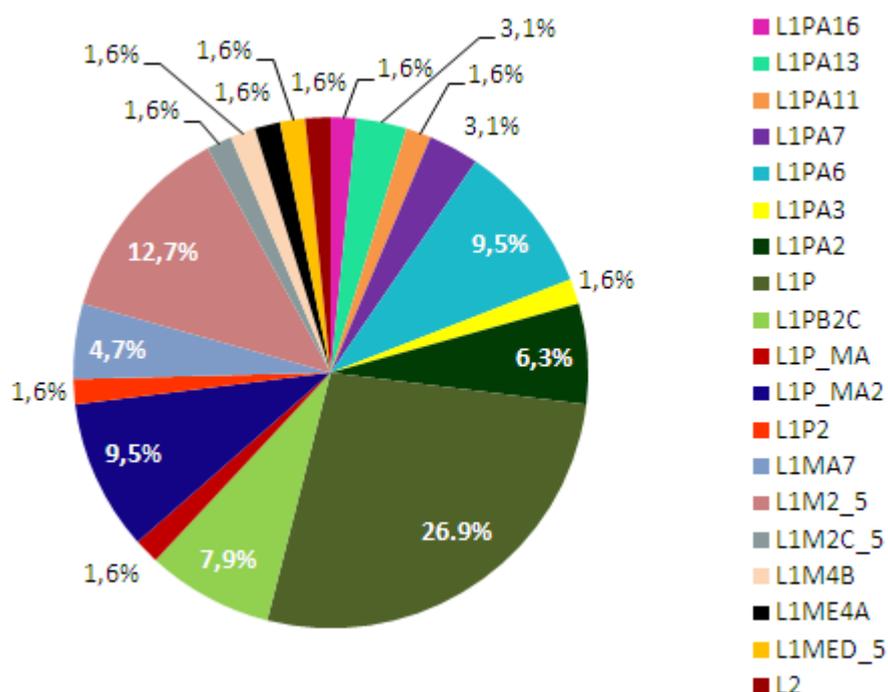


Figura 29: Mapeamento das famílias de elementos LINE-1 associados às seqüências de kDNA de *T. cruzi* integradas no genoma humano.

Em nove casos (clones PA358, PA460, PA583, PA588, PA592, PA602, PA694, PA695 e PA835) foram obtidas mutações kDNA-LINE-1 cujas seqüências podem ter sido mobilizadas “*hitchhiking*” de um sítio primário para outro, dentro do genoma, pela maquinaria intrínseca de retrotransposição. A Figura 30 documenta o caso do clone PA460 do chagásico 54 (Família A), onde elementos LINE-1 (L1M2_5) e retrovírus endógeno (HERV e PRIMA) flanqueiam o kDNA de *T. cruzi* integrado no genoma humano.

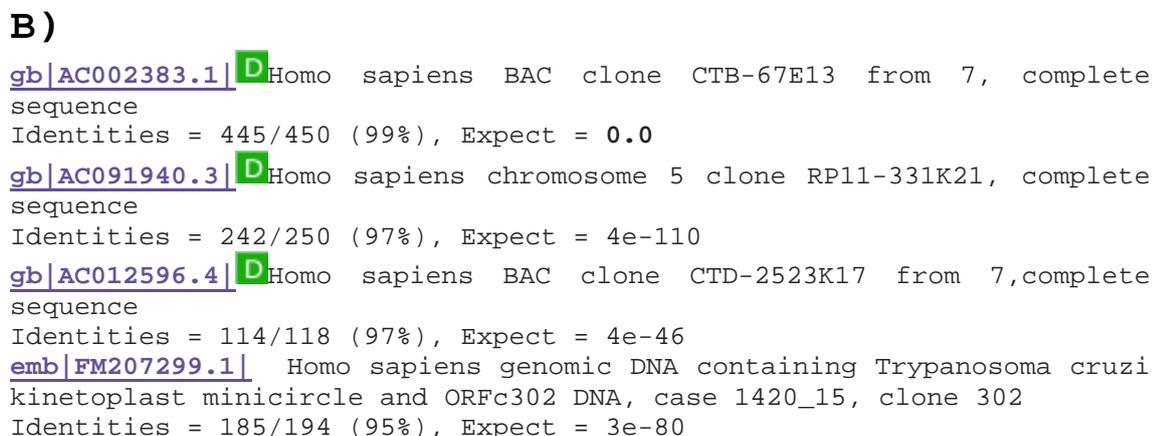
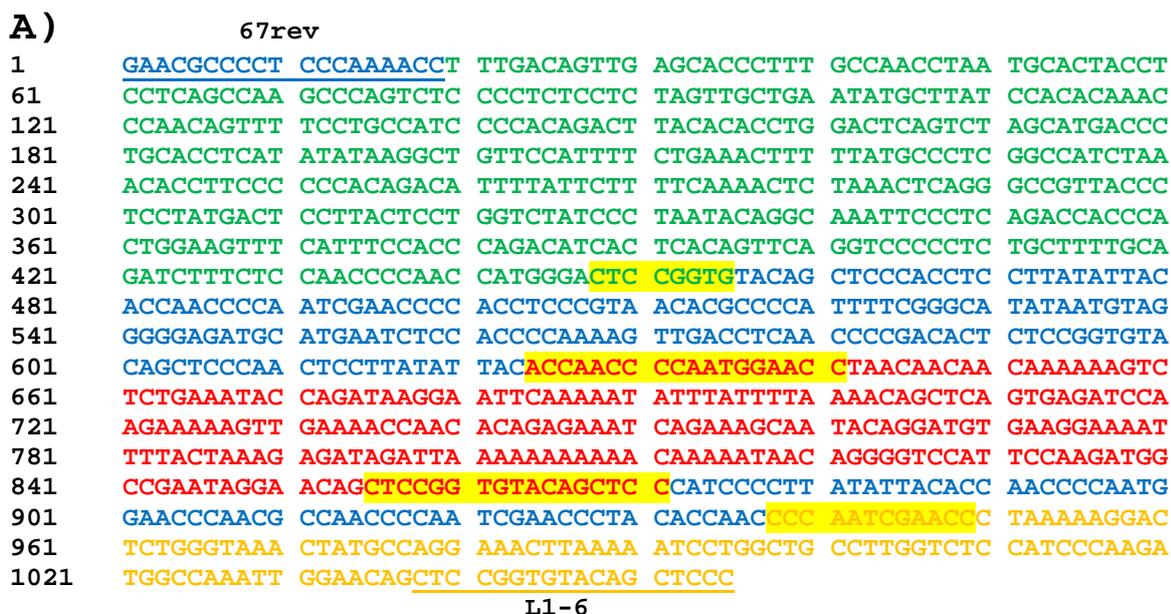


Figura 30: Remodelamento do genoma de chagásico em sítio de mutação de kDNA sugestivo de *hitchhiking* e recombinação de três cromossomos. **A)** Clone do indivíduo 54 (PA460). Em verde, representa o DNA humano do cromossomo 7, reconhecido como retrovírus endógeno HERV. A seqüência conservada de minicírculo de kDNA está representada em azul escuro. Em vermelho, representa uma seqüência do cromossomo 5, identificada como retrotransposon da família L1M2_5. A cor laranja, representa uma seqüência do cromossomo 7, identificada como retrovírus endógeno PRIMA. Os trechos em amarelo representam as regiões de microhomologias (bases compartilhadas) entre os DNAs. Os *primers* utilizados na terceira reação da *tpTAIL*-PCR estão sublinhados. **B)** Análises bioinformáticas pelos algoritmos BLASTn e Censor-GIRI.

5.2. Identificação de ORFs quimeras nas mutações

Análises das 430 seqüências quimeras kDNA-DNA hospedeiro pelo algoritmo UGENE revelaram 148 ORFs putativas com potencial de tradução de novas proteínas. Algumas dessas apresentaram similaridades significativas com proteínas de *T. cruzi* e humanas conforme mostra a Figura 31. Esses achados *in silico* tem coincidências com dados prévios do nosso laboratório (Nitz e cols, 2004; Simões-Barbosa e cols, 2006; Hecht e cols, 2010).

67rev

```
1      GAACCCCCCT CCCAAAACCA GGAGGAAGTT GAGTCTCTGA ATAGACCAGT AACAGGCTCT
61     GATACACATA CACTCTCCCA AGACTAAACC AGGATGAAAGT TTAATCTCTG AATACACCAA
121    CCCCAATCGA ACCACCATCA GAGAATACTA TAAACACCTC TATGCAAATA AACTAGAAAA
181    TCTAGAAGAA ATGGATAAAT TCCTGGACAC ATACACCCTC CCAAGACTAA ACCAGGAAGA
241    AGTTGAATCC CTGAATACAC CAATAACGGG CTCTGATACA CATAACCAA CCCCAATCGA
301    ACCCCACCTC CCGTAAACAA CCCTCATTTT CGGCAGTATA ATGTACGGGT GAGATGCATG
361    ATTTTTCGGG CCCAAATTTG AACGCCCTC CCAAGACTAA ACCAGGAGGA AGTTGAATCT
421    CTGAATACAC CAATAACGGG CTCTGATACA CATAACCAA CCCCAATCGA ACCTCACCTC
481    CCGTAAACAA TCCCATTCT CGGCCATATA ATGTACGGGT GAGATGCATG ATGTACGGAG
541    GAGATGTATA ATGTACGGGT GAGATGCATG AATTTTCCGC CAAAAAGTTG AACGC CCCTC
601    CCAAGACTAA ACCAGGAGGA AGTTGAGTCT CTGAATAGAC CAA TAACAGG CTCTGATACA
661    CATACTCT CCCAAGACTA AACCAGGA
```

L1-5

Figura 31: Identificação de ORF quimérica putativa do clone PA871 do indivíduo chagásico 22 (Família B). A seqüência verde (E -value= $1e-63$) representa LINE-1 humano no cromossomo 18 (AC037476.10) e em azul a região conservada de kDNA (E -value= $5e-81$). Microhomologias compartilhadas estão em amarelo. Os *primers* utilizados no terceiro ciclo da *tpTAIL*-PCR estão sublinhados. A região sublinhada representa proteína putativamente traduzida pela ORF 2 do LINE-1, conforme análises BLASTn e UGENE.

Os transcritos da maioria das ORFs quimeras traduzem *in silico* proteínas hipotéticas (Anexo II). As ORFs quimeras apresentavam homologias com 40 proteínas hipotéticas referidas em banco de dados com E -value significativos. Notou-se que 35% (14/40) das novas proteínas tem homologias com o transcrito do *locus* CAR63139.1. A proteína traduzida pela ORF 2 de LINE-1 foi obtida em seis clones (PA477, PA825, PA856, PA870, PA871 e PA904). Em um clone (PA163) a proteína quimera não foi identificada nos bancos de dados. As quimeras de proteínas putativas revelavam motivos comuns (PTPIE) em 15,5% dos casos (23/148). Esses motivos foram encontrados em 11 chagásicos e em três casos que tinham apenas mutação de kDNA. A correlação da topologia com a fisiologia das ORFs quimera requer

conhecimento adicional que poderia ser obtido com seqüenciamento completo do genoma humano e obtenção da livreria de ORFs quimeras em chagásico. Na ausência de informação sobre a função de ORFs quimera em chagásicos, modificações genótípicas têm sido relacionadas com as lesões na doença de Chagas.

6. *Southern Blot* genômico

A análise do DNA humano pela técnica *Southern blot* foi feita com objetivo de definir perfis de bandas formados pelo kDNA integrado no genoma humano. As radioautografias identificaram bandas de kDNA de aproximadamente 3 kb no genoma do hospedeiro, e ausência de bandas nos controles (Figura 32). O tamanho desta banda é superior ao do minicírculo livre (1,4 kb), indicando que a seqüência foi transferida verticalmente para a progênie F₂ (Família D). O achado pelo *Southern blot* corrobora os resultados de PCR e de seqüenciamento de mutações quimeras neste estudo e em estudo prévio (Hecht e cols, 2010).

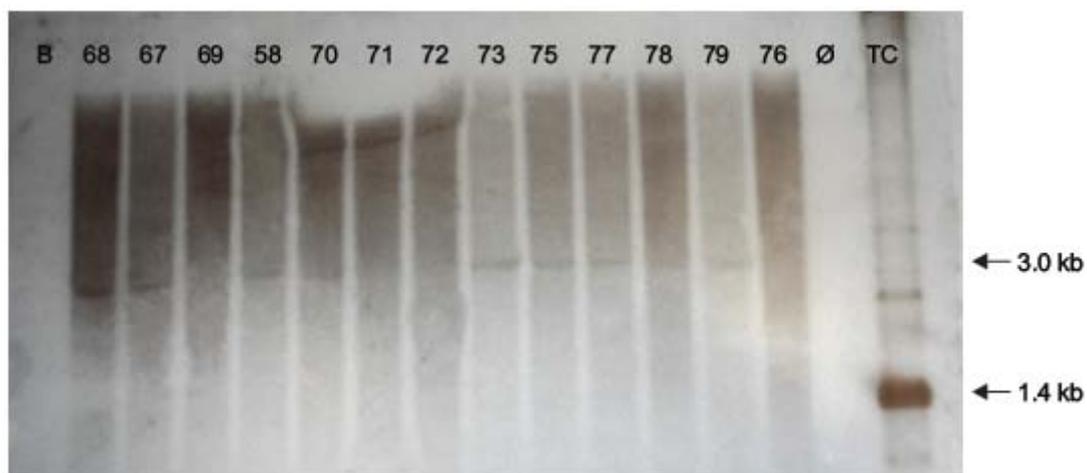


Figura 32: Identificação de banda de kDNA de *T. cruzi* no genoma humano pelo *Southern blot*. Note que os indivíduos 68, 67, 58, 70, 73, 75, 77, 78, e 79 da geração F₂ (Família D), formaram banda de 3 kb após hibridização com sonda radiomarcada específica de minicírculo de kDNA. O controle positivo (TC) obtido pela digestão do DNA do *T. cruzi* com *EcoRI*, forma banda de 1.4 kb. As setas indicam o peso molecular das bandas reconhecidas pela sonda.

5. DISCUSSÃO

5.1. Características das microepidemias de infecções pelo *Trypanosoma cruzi* na Amazônia

Este é o primeiro estudo com amostragem em famílias selecionadas a partir da história clínica-epidemiológica de casos agudos da doença de Chagas na Amazônia brasileira. A abordagem de aspectos intrínsecos da cadeia epidemiológica de uma grande endemia inserida em múltiplos ecossistemas do continente Latino Americano requer abordagem multidisciplinar para avaliar aspectos importantes nas microepidemias das infecções pelo *T. cruzi*. Mesmo porque alguns aspectos relativos à circulação do parasito em microsistema complexo de pessoas agregadas em família precisam ser investigados no curso da microepidemia, visando à avaliação de todas as possibilidades de transmissão do protozoário para o hospedeiro humano. Este estudo tem desenho experimental parecido com o trabalho de Hecht e cols (2010) que estudou aspectos imunológicos e genéticos das infecções pelo *T. cruzi* em famílias de diferentes ecossistemas: i) Amazônia legal; ii) Cerrado; iii) Mata Atlântica Costeira, e IV) Caatinga. Porém, diferentemente do estudo de Hecht e cols (2010) que foi iniciado pela identificação de chefes de família com testes sorológicos positivos para *T. cruzi*, o desenho da pesquisa na Amazônia teve como ponto de partida a identificação de famílias com casos de DCA. Enfim, outros estudos serão conduzidos com motivação diferente, visando ao entendimento do panorama parasitológico-clínico-genético-epidemiológico da doença de Chagas nos cinco continentes para onde migraram portadores das infecções pelo *T. cruzi*. O panorama que se delineia nesta investigação mostra a importância de tentar novas abordagens de pesquisa, se quisermos compreender como um protozoário ancestralmente transmitido pela ingestão de triatomíneos contaminados, ou veiculado no dejetos contaminante da pele e mucosa pode ter chegado aos cinco continentes a partir da hiperendemia na América Latina.

Em primeiro lugar, a lógica da pesquisa científica iniciada pelo Doutor Carlos Chagas (1909) justifica a ênfase absoluta sobre a transmissão do *T. cruzi* dos triatomíneos para o homem. Essa lógica tem sustentação na importância do inseto hematófago na aquisição de sangue contaminado de animais silvestres, e a transmissão do *T. cruzi* para o homem. Esta é a via de transmissão mais antiga e já existente desde a chegada dos melanésios (Guidon e Delibras, 1986) ao continente Latino Americano, portanto, há cerca de cinquenta mil anos. A esse respeito, o achado mais antigo é datado de 9 mil anos no deserto de Atacama, numa múmia com o coração sugestivo de doença de Chagas que teve o teste PCR positivo para DNA do parasito (Aufderheide e cols, 2004). Desde então, as infecções pelo *T. cruzi* tem sido encontradas nos ecossistemas Latino Americanos onde a pesquisa clínico-epidemiológica tem sido conduzida. Considerando que as fronteiras geo-políticas não têm serventia para exclusão de triatomíneos, tripanossomas e mamíferos susceptíveis, os fatores temperatura, altitude, e, certamente, educação e condição sócio-econômica da população limitam a dispersão de triatomíneos e, conseqüentemente, a transmissão de *T. cruzi* (Teixeira e cols, 2001; Coura e cols, 2002; Dias e cols, 2002). Isto explica porque as infecções pelo *T. cruzi* são encontradas onde viceja os triatomíneos hematófagos, entre os paralelos 42 °N na Califórnia, e 42 °S na província de Chubute, Argentina. Por último, ao tomar conhecimento das microepidemias de DCA os pesquisadores ganharam motivação para estender o conhecimento sobre a epidemia na Amazônia, até recentemente considerada região não endêmica para infecções pelo *T. cruzi* (Teixeira e cols, 2006; Pinto e cols, 2008).

Atualmente, são conhecidas 22 espécies de triatomíneos na Amazônia, e 13 dessas já foram relacionadas com transmissão de *T. cruzi* para o homem (Galvão e cols, 2003). Os triatomíneos dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* têm importância epidemiológica, mas na Amazônia os insetos da tribo Rhodniini (*Rhodnius milesi*, *R. pictipes*, *R. brethesi*, *R. robustus*, *R. nasutus*) contaminados com *T. cruzi* são encontrados frequentemente em proximidade com o homem (Valente e cols, 2001). A cadeia epidemiológica se completa com mais de 1250 espécies de mamíferos susceptíveis as infecções pelo *T. cruzi*. A importância de animais insetívoros no ciclo de transmissão do protozoário e sua circulação na natureza têm reconhecimento ancestral. A

pesquisa de campo que busca triatomíneo tem como guia os ninhos de pássaros, tocas de roedores, e esconderijos de mamíferos de grande porte. Ou seja, os triatomíneos vivem em proximidade com as fontes de alimento/sangue. Sendo assim, a proximidade de triatomíneos com o domicílio humano é fator importante na epidemiologia da transmissão do *T. cruzi* (Pinto e cols, 2008). O desmatamento, a escassez de reservatórios silvestres, e a luz são fatores de atração de triatomíneos para a presa e ocorrência de microepidemias da DCA em famílias na região Amazônica (Aguilar e cols, 2007). Ênfase deve ser dada ao aumento exponencial da densidade demográfica naquela região nas últimas cinco décadas (Teixeira e cols, 2001).

As microepidemias de DCA descritas em várias regiões do Brasil, Venezuela, Colômbia e em outros países Latino Americanos (Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012) têm enfatizado sobre a possibilidade de aquisição do *T. cruzi* pela via oral a partir de triatomíneos nas proximidades do local onde teria ocorrido a contaminação das pessoas.

A epidemiologia das microepidemias de infecções pelo *T. cruzi* em famílias na região Amazônica (Valente, 2008) tem sido guiadas pela plausibilidade de contaminação de alimentos com dejetos de triatomíneos alimentados em hospedeiros infectados com *T. cruzi*. O caso mais estudado tem relacionado o açaí triturado com triatomíneo contaminado com *T. cruzi*. O suco contaminado do açaí, vendido em quiosque nas praças das cidades da Amazônia, seria uma fonte de transmissão do *T. cruzi* para pessoas de uma família. Essa explicação tem valor epidemiológico, mas a demonstração direta do *T. cruzi* no suco de açaí não foi obtida. Entretanto, um conjunto de evidências indiretas, circunstanciais, sugere que a ingestão de suco de açaí, cana, goiaba e, também, ingestão de carne contaminada com dejetos de triatomíneos, sejam via de transmissão da infecção. Nesse ínterim, a epidemiologia das microepidemias de infecções agudas pelo *T. cruzi* pela ingestão de alimentos é a mais plausível, mas a sua comprovação ainda requer investigação (Teixeira e cols, 2001).

O dejetos de triatomíneo contaminado com *T. cruzi* depositado sobre alimentos, fômites e outros veículos transmite as infecções pelo protozoário ao hospedeiro mamífero, mas existe possibilidade de aquisição da infecção por outras vias. Milhões de casos de doença de Chagas crônica é consequência de infecções agudas, sintomáticas e assintomáticas, que se tornaram crônicas ao longo de várias décadas de vida do hospedeiro. Entretanto, sabe-se que infecções agudas pelo *T. cruzi* são hiperendêmicas na Amazônia, mas o número de casos da infecção crônica em humanos é relativamente pequeno (Xavier e cols, 2006; Valente e cols, 2002). Talvez, essa defasagem seja explicada pela baixa morbidade e mortalidade da infecção chagásica em humanos, devido a fatores íntimos da endemia na região: *i*) via de aquisição da infecção; *ii*) fatores demográficos, ambientais e sociais; *iii*) escassez de investigação sobre o curso natural da doença de Chagas na Amazônia.

5.2. Estudos epidemiológicos baseados na pesquisa de anticorpos contra *Trypanosoma cruzi*

A parcela das infecções agudas pelo *T. cruzi* considerada nos parágrafos acima diz respeito aos casos diagnosticados pelos testes imunológicos, ELISA e IFI usados nos laboratórios de hospitais públicos e privados de atendimento à população. Neste estudo, os testes ELISA e IFI em diluições de soro de até 1:640 foram feitos em triplicata. Esses testes foram repetidos em alíquotas de soros obtidos em duas ocasiões: as pessoas das famílias A, B e C doaram sangue 2 e 5 anos após o diagnóstico clínico de DAC, e as pessoas da família D doaram sangue na fase aguda (um mês) da doença e três anos depois. De grande interesse, 35,7% (39/109) dos soros examinados tiveram títulos de anticorpos positivos ($\geq 1:40$) contra antígenos de *T. cruzi*. A frequência mais alta de soropositividade (76,1%; 16/21) foi observada na família D. Somente nesta família havia anticorpos IgM contra antígenos de *T. cruzi*. Pelo entendimento corrente, fica claro que 39 pessoas tinham anticorpos específicos para as infecções pelo *T. cruzi*, possivelmente, adquiridas via fatores exógenos ou do meio ambiente, tais como triatomíneos, alimentos, fômites, e, ainda, contaminação pessoa a pessoa pelas mãos contaminadas com dejetos de barbeiros.

5.3. Identificação de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* por marcadores genéticos do nDNA do parasito em indivíduos com sorologia negativa

Em acentuado contraste, os testes de ácidos nucleicos para *T. cruzi* foram positivos em 76,1% (83/109) das pessoas nas quatro famílias do estudo. Em todos esses casos, a PCR com *primers* específicos revelou amplicons de nDNA e kDNA que hibridizaram com as respectivas sondas radiomarcadas. Adicionalmente, os testes de PCR com *primers* de kDNA identificaram seqüências de minicírculos retidas no genoma de 92,6% (101/109) pessoas. Ou seja, apenas oito pessoas (7,3%) nas quatro famílias não tinham a marca genética do *T. cruzi* no genoma. A diferença entre as positivities nos testes sorológicos (35,7%) e de ácidos nucleicos (76,1%) significa que a maior parcela de pessoas infectadas (53%) não teria sido diagnosticada pela abordagem convencional com base em anticorpos séricos. Por último, chama-se atenção para o fato de que 100% das pessoas na família B eram positivas para nDNA e apenas 26,6% delas tinham anticorpos contra o *T. cruzi*. Esse achado é relevante para a discussão sobre a epidemiologia genética das infecções chagásicas que abre capítulo novo na história dessa endemia.

Vale ressaltar que os casos de DCA da família D tinham anticorpos da classe IgM contra antígenos de *T. cruzi*. Desses casos agudos e dos demais com sintomatologia compatível com DCA foram colhidas amostras de sangue para pesquisa direta do *T. cruzi*, e/ou xenodiagnóstico e/ou hemocultura. O diagnóstico parasitológico foi comprovado e convalidado em todos os 21 casos de DCA pelos testes PCR com *primers* de nDNA e kDNA. Porém, as hemoculturas semeadas com sangue colhido aos 2 e 5 anos após a fase aguda foram negativas, ainda que as infecções crípticas fossem persistentes nos casos com marcadores de nDNA e kDNA positivos. Ademais, as células germinativas no sêmen de 19 casos convalidaram os resultados da PCR positiva para nDNA e kDNA de *T. cruzi* nas células somáticas do sangue.

5.4. Os indivíduos 'tolerizados' ao *Trypanosoma cruzi* não produzem anticorpos contra antígenos do parasito

A questão fundamental que se coloca para o leitor diz respeito à explicação de uma pessoa parasitada pelo *T. cruzi* não ter anticorpo contra antígenos do parasito. Como dito em parágrafo anterior, os anticorpos são encontrados em pessoas que adquirem a infecção exógena pela contaminação no sítio da picada do inseto ou pela ingestão de dejetos de triatomíneo contaminado com *T. cruzi*. Então, a resposta para a pergunta pode ser dada com conhecimento sobre tolerância imunológica, capítulo da ciência que rendeu Prêmio Nobel para os Laureados Peter Medawar e Frank McFarlane Burnet, em 1960. Na verdade, a construção deste conhecimento começou na Academia de Ciências de Praga onde o pesquisador Ian Hacek, trabalhando com vírus aviário, observou que aves nascidas de patos infectados não produziam anticorpos contra o vírus. Esses estudos com vírus avançaram na Austrália com a pesquisa de Burnet (1961) e na Inglaterra com a pesquisa de Billingham, Brent e Medawar (1953) em embriões de vacas que recebiam hemácias de grupos sanguíneos incompatíveis. Os bezerros nascidos de vacas imunizadas no início da gestação não produziam anticorpos contra o grupo sanguíneo incompatível porque tinham sido 'tolerizados' pelas injeções de hemácias no período inicial da gravidez, previamente à maturação do sistema imune.

O dogma central da imunologia admite que o sistema imune reconheça antígenos estranhos introduzidos no organismo e produz resposta imune contra epítomos geralmente situados na região hidrofóbica da cadeia de aminoácidos da proteína. Essa reação é designada de imunidade adquirida, diferente da imunidade inata que já está pronta no corpo para reagir independentemente de experiência prévia com estímulo de antígeno. A imunidade adquirida tem grande importância na produção de vacinas protetoras contra agentes infecciosos, vírus e bactérias. A possibilidade de alguém não produzir anticorpo contra antígenos de agente infeccioso é reconhecida em casos de deficiência imunológicas congênitas, resultantes de defeitos no sistema imune em consequência de mutações e deleções de genes de respostas imunes. Entretanto, como o repertório de receptores antigênicos é ilimitado sempre há possibilidade de reatividade autoimune. A tolerância imunológica manifestada

no nascimento persiste ao longo da vida. Um mecanismo relacionado com indução de tolerância ao 'próprio' é conhecido com o nome deleção clonal e consiste na deleção ou eliminação do clone de linfócito autoreativo, no timo (células T) ou na medula óssea (células B). A tolerância imunológica periférica é mantida pela deleção clonal, anergia, supressão, ou 'ignorância' clonal pelo fato de células T ou B não reagir contra antígeno 'próprio' (Mueller e Jenkins, 1996). Em resumo, a teoria da tolerância imunológica explica que o repertório de moléculas presentes no embrião antes da maturação do sistema imune é considerado como "self" e não induz a produção de anticorpos.

5.5. A teoria da tolerância imunológica explica que pessoas com DNA nuclear de *T. cruzi*, mas sem anticorpo específico, podem ter adquirido as infecções via placenta ou sexual, antes da maturação do sistema imune

O cuidado tomado com respeito à possibilidade de explicação da tolerância imunológica em 44 pessoas da amostragem foi precedido pela avaliação de dois pontos fundamentais nesta pesquisa: i) A convalidação dos testes de ácidos nucleicos com os resultados dos exames parasitológicos realizados no IEC/PA pelos pesquisadores Aldo Valente e Vera da Costa Valente. Em 21 casos com manifestação clínica de DCA os exames de sangue pela pesquisa direta do *T. cruzi*, e/ou xenodiagnóstico e/ou hemocultura foram positivos. Em todos esses casos a PCR com *primers* específicos de nDNA e kDNA do parasito também foram positivos; ii) Tendo encontrado os marcadores genéticos de nDNA e kDNA do *T. cruzi* em células somáticas, respectivamente, de 76,1% e 92,6% das pessoas da amostragem, o estudo foi estendido para a análise das células germinativas dos homens nas quatro famílias. O estudo revelou marcadores de nDNA e kDNA de *T. cruzi* no esperma de todos os casos que os exames foram positivos nas células somáticas. Diante das convalidações das parasitemias pelos testes de PCR com *primer* de nDNA de *T. cruzi* e da positividade do nDNA no esperma dos homens nas famílias estudadas, foram encontrados os elementos para explicar a ausência de anticorpos em 53% da amostragem que tinha a infecção ativa pelo *T. cruzi*.

A questão posta aqui diz respeito à interpretação desses achados que não poderiam ser explicados, exceto pela transmissão das infecções pelo *T. cruzi* pela placenta ou pela via sexual. As duas possibilidades de transmissão

existem nas pessoas de quatro famílias que tem os testes positivos para nDNA de *T. cruzi* na ausência de anticorpos específicos. Evidentemente, o esclarecimento desta equação não é assunto semântico, pois tem significado singular na atualização da compreensão sobre a epidemiologia da grande endemia chagásica e, também, nos programas de combate à transmissão dessas infecções. Recentemente, tem-se dado ênfase as coincidências entre as infecções pelo vírus HIV e pelo *T. cruzi*. Essa premissa foi rebatida corajosamente pelos nobres defensores da saúde pública no Brasil, mas, ainda assim, este assunto persiste para ser esclarecido pela pesquisa científica. Pois, sabemos que as questões do conhecimento não podem ser resolvidas consensualmente. Diante dos resultados obtidos nesta investigação, é recomendável continuar o trabalho com delineamento experimental adequado para esclarecer a questão da transmissão sexual das infecções pelo *T. cruzi* em modelos animais. A pesquisa em andamento no nosso laboratório na Universidade de Brasília produzirá resultados para esclarecer se a infecção pelo *T. cruzi* pode ser transmitida de macho infectado para fêmea sadia, e vice-versa. Os resultados preliminares sugerem que a transmissão sexual do *T. cruzi* será comprovada experimentalmente no tempo devido.

5.6. Mapeamento das mutações de kDNA no genoma das pessoas nas quatro famílias da Amazônia

A idéia que deu origem ao estudo nas famílias da amostragem faz parte de uma linha de pesquisa que visa a investigar morbidade e mortalidade nas pessoas infectadas pelo *T. cruzi* e tentar correlacionar esses dados clínico-laboratoriais com as mutações de minicírculos de kDNA em *loci* genéticos distribuídos em vários cromossomos, conforme estudo prévio de Hecht e cols (2010). Nesse sentido, foram mapeadas 430 mutações de kDNA encontradas no genoma de 98 pessoas positivas no teste PCR com *primers* específicos de minicírculos. Como foi observado no estudo de Hecht e cols (2010) no qual a grande maioria das mutações (70%) foi localizada em retransposons LINE-1. De interesse as mutações em LINE-1 foram encontradas no *locus* AL732374.14 do cromossomo X, em 92,3% dos casos. Em 7,6% dos casos as mutações se achavam em sítios indeterminados do genoma. Diferentemente do estudo de Hecht e cols (2010) que identificaram mutações em genes

relacionados com respostas imunes, crescimento e diferenciação celular, nesse estudo 83,3% das mutações ocorreram no gene de receptor olfatório OR1-17. Chama atenção também a baixa ocorrência de mutações com remodelamentos do genoma local devido a recombinações, “*hitchhiking*” e deleções, em apenas 2,9% dos casos. O resultado sugere a busca de eventos de remodelamento de genoma nos sítios das mutações de kDNA em estudo prévio e em outros que serão realizados, visando a comparar a atividade remodeladora do genoma nas áreas de instabilidade criadas pelas mutações em diferentes faixas etárias da população humana. Esses aspectos poderiam lançar luz sobre variabilidade e gravidade de manifestação clínica da doença de Chagas em diferentes regiões.

Enfim, o mapeamento das mutações em famílias de chagásicos da Amazônia brasileira será utilizado em outro estudo que tenta fazer análises de associação entre os marcadores genéticos nDNA e kDNA e os dados clínico-laboratoriais que avaliam função cardíaca em chagásicos e em controles de Brasília. Essa parte da pesquisa constitui a tese de Doutorado da médica cardiologista, Dra. Adriana Almeida, neste laboratório. Este trabalho de pesquisa multidisciplinar é ciência de muitos, construção coletiva, que requer juntar profissionais com aptidões diferenciadas para a criação de conhecimento novo e de interesse social.

Tendo iniciado a pesquisa com o objetivo de mapear mutações de kDNA no genoma de chagásicos da Amazônia, no curso da investigação, à medida que os achados chegavam da bancada, foi aparecendo o perfil novo das infecções pelo *T. cruzi* sem anticorpos contra antígeno do parasito. Este, pois, é um caso típico de ‘serendipidade’, visto que a equipe estava olhando uma coisa e achou outra diferente, mas de grande valor científico e social. Então, foi espontâneo o interesse pelo assunto que correspondia melhor à necessidade prática do conhecimento do que aquele que se procurava inicialmente. A importância social do conhecimento obtido nesta pesquisa terá grande repercussão nos programas de controle da endemia e no acompanhamento dos fatores de morbidade e de mortalidade de chagásicos. Entretanto, é preciso que o leitor aprecie o trabalho já feito ao invés de lamentar a atenção e a enorme parcela de esforços que precisa ser feito para lidar com este assunto fundamental na saúde pública dos países latino-americanos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- * Abad-Franch, F; Monteiro, F.A. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl.I): 57-70, 2007.
- * Abad-Franch, F; Monteiro, F.A; Jaramillo, N.O; Gurgel-Gonçalves, R; Dias, F.B.S; Diotaiuti, L. Ecology, evolution and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop* 112: 159-177, 2009.
- * Abrahamsohn, I. A e Coffman, R.L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental Parasitology*, 84: 231-244; 1996.
- * Agência Brasil. Município do Amazonas registra surto de doença de Chagas. *Notícias da Amazônia On Line*, Manaus, 11 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.noticiasdaamazonia.com.br/11165-municipio-do-amazonas-registra-surtode-doenca-de-chagas/>>. Acesso em: 15 jan. 2010.
- * Aguilar, M e Yépez, R. Evolución epidmiologica de la enfermedad de Chagas em el Ecuador. Proc. of the International Workshop on Populatio Genetics and Control of Triatominae, Santo Domingos de los Colorados, Ecuador, 24-28 September, 1995. Vol.(1)30-38, 1996.
- * Aguilar, H.M; Abad-Franch, F; Dias, J.C.P; Junqueira, A.C.V; Coura, J.R. Chagas disease in the Amazon Region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 47-56, Suplemento 1, 2007.
- * Albajar, P.V; Laredo, S.V; Terrazas, M.B; Coura, J.R. Miocardiopatia dilatada em pacientes com infecção chagásica crônica. Relato de dois casos fatais autóctones do Rio Negro, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: 2003.
- * Almeida-de-Faria, M; Freymuller, E; Colli, W; Alves, M.J. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol* 92: 263–274; 1999.
- * Almeida, I.C; Covas, D.T; Soussumi, L.M; Travassos, L.R. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosobent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion* 37: 850-857, 1997.
- * Almeida, J.O e Fife, E.H Jr. Quantitatively standardized complement-fixation methods for critical evaluation of antigens prepared from *Trypanosoma cruzi*. *Pan Am Health Org* 39, 86 p, 1976.
- * Amúnarriz, M; Chico, M.E; Guderian, R.H. Chagas' disease in Ecuador: a sylvatic focus in the Amazon region. *Jour. Trop. Med. Hyg.* 94: 145-149, 1991.

- * Andrade, Z.A. Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. Ciba Found. Symp. 99, 214-233, 1983.
- * Andrade, Z.A. Pathogenesis of Chagas' disease, Res. Immunol. 142, 126-129, 1991.
- * Andrade, Z.A; Andrade, S.G; Correa, R; Sadigursky, M; Ferrans, V.J. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. Am. J. Pathol. 144, 1403-1411, 1994.
- * Andrade, L.O e Andrews N.W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. Nat Rev Microbiol. Oct; 3(10):819-23; 2005.
- * Argañaraz, E.R. Integração de seqüências de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em elemento L1 no genoma da célula hospedeira. Tese, Universidade de Brasília, 1996.
- * Aufderheide, A. C; Salo, W; Madden, M; Streitz, J; Buikstra, J; Guhl, F; Arriaza, B; Renier, C; Witmers JR, L.E; Fornaciari, G; Allison, M.A. 9,000 – year record of Chagas disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, p. 2034-2039, 2004.
- * Bahia-Oliveira, L.M.G; Gomes, J.A.S; Cançado, J.R; et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. J Infec Dis, 182:634-638; 2000.
- * Barbosa, R.L. Transmissão Oral do *Trypanosoma cruzi* pela polpa de açaí em camundongos. Dissertação, Universidade Estadual de Campinas/SP, 2010.
- * Barbosa, W; Czerewuta, A.C; Oliveira, R.L. Tentativa de isolamento primário de *T.cruzi* de pacientes crônicos de doença de Chagas por hemocultura agentes bloqueadores. Rev. Patologia Tropical v. 12, p. 155-163, 1983.
- * Batzer, M.A e Deininger, P.L. Repeats of *Alu* and Human Diversity of Genomic. Genetics, 3: 370-9, 2002.
- * Belancio, V.P; Roy-Engel, A.M; Deininger, P.L. All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. Semin. Cancer Biol., 20:200–10, 2010.
- * Biémont, C e Vieira, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. Nature, v.443, p.521-524, 2006.
- * Billingham, R.E; Brent, L; Medawar, P.B. Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature 172: 603–606, 1953.
- * Böhne, A; Brunet, F; Galiana-Arnoux, D; Schultheis, C; Volff, J.N. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. Chromosome Research, 16: 203-215, 2008.

- * Borborema, M; Guerra, J; Malheiros, R; Fé, N; Lacerda, M.G; Mourão, M.P.G; Coelho, L.I; Macedo, V; Coura, J.R; Junqueira, A. Doença de Chagas urbana em Tefé (AM): relato de nove casos com suspeita de transmissão oral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, p. 491, 2005.
- * Brener, Z e Gazzinelli, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 114(2):103-110,1997.
- * Britten, R.J e Kohne, D.E. Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529-540, 1968.
- * Brumpt, E. Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier a la Trypanosomose de Chagas. *Bull Soc Pat Exot* 7: 706-710, 1914.
- * Brumpt, E. Précis de Parasitologie. Paris, Masson, Tome I, 1931.
- * Burns, K.H; Boeke, J.D. Human transposon tectonics. *Cell.* 11;149 (4):740-52, 2012.
- * Burnet, F.M. Immunological recognition of self. *Science* 133: 307–311, 1961.
- * Calvo-Méndez, M.L; Noguera-Torres, B; Alejandre-Aguilar, R; Cortés-Jiménez, M. Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* a través de agua y alimentos contaminados. *Revista Latino-Americana de Microbiología*, v. 36, n. 1, p. 67-69, 1994.
- * Camandaroba, E.L; Pinheiro Lima, C.M; Andrade, S.G. Oral transmission of Chagas' disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 44, n.2, p. 97-103, 2002.
- * Camargo, M.E e Hoshino-Shimizu, S. Metodologia sorológica na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Goin Med* 20: 47-65, 1974.
- * Camargo, M.E e Takeda, G.K.F. Diagnóstico de laboratório. In: Brener, Z; Andrade, Z.A. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 175-198, 1979.
- * Cannova, D.C; Aguilar, M.C; Pacheco, M; Simons, M.I; Medina, Rev. Fac. Cien. Salud. V. 6(3), p. 4, 2002.
- * Carceres, C.D; Nicholis, S; Corredor, A; Gualdrón, L; Slait, E; Dib, J.C; Ariza, K. Investigación de un brote de síndrome febril com miocardites aguda en Guamal., Magdalena., 7 a 11 de junio de 1999. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional, 12: 180-186, 1999.
- * Cardoso, F.A. Sur le mecanisme de la transmission de la maladie de Chagas. *Annals Parasitology. Human. Compative* , v. 16, p. 341-349, 1933.

- * Carrasco, H.J; Torrellas, A; García, C; Segovia, M; Feliciangeli, M.D. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *International Journal for Parasitology* 35: 1379-1384, 2005.
- * Carroll, M.L; Roy-Engel, A.M; Nguyen, S.V; Salem, A.H; Vogel, E; et al. Large-scale analysis of the Alu Ya5 and Yb8 subfamilies and their contribution to human genomic diversity. *J. Mol. Biol.*, 311:17–40, 2001.
- * Castanho, R.E.P; Martins, L.P.A; Godoy, C.A.P; Rosa, R.M. Infecção experimental de camundongos através da ingestão de caldo de cana contaminado por *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35(I), p. 176, 2002.
- * Cerisola, J.Á; Chaben, M.F; Lazari, J.O. Test de hemaglutinação para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Prensa Méd Argent* 49: 1761-1767, 1962.
- * Cerisola, J.Á; Alvarez, M; Bock, M; Wegner, D. A comparison of a new antigen from amastigotes of *Trypanosoma cruzi* and an antigen from epimastigotes for the diagnosis of chagas`disease by the indirect immunofluorescence test. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 13: 162-166, 1971.
- * Chagas C. Nova Tripanozomíaze humana. “Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem”. *Mem Inst Oswaldo Cruz*: 1 (S1): 159-218, 1909.
- * Chiari, E; Dias, J.C.P; Lana, M; Chiari, C.A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 22: 19-23, 1989.
- * Chiari, E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, suppl. 1, p. 299-300, 1999.
- * Christensen, T. Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol.*, Vol.15: 179–211, 2005.
- * Cohen, C.J; Lock, W.M; Mager, D.L. Endogenous retroviral LTRs as promoters for human genes: a critical assessment. *Gene*. 448 (2): 105-14. Epub, 2009.
- * Comeaux, M.S; Roy-Engel, A.M; Hedges, D.J; Deininger, P.L. Diverse cis factors controlling Alu retrotransposition: What causes Alu elements to die? *Genome Res.*, 19:545–55, 2009.
- * Coura, J.R; Junqueira, A.C.V; Boia, M.N; Fernandes, O. Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 379-384, 1999.

- * Coura, J.R; Junqueira, A.C; Fernandes, O; Valente, A.S; Miles, M.A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends in Parasitol 18: 171-176, 2002.
- * Coura JR. Chagas disease: what is know and what is needed A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz; 102 (Supl I): 113-22, 2007.
- * Cunha-Neto, E. Estudo da Ativação e Inativação de Linfocitos T Com Clones Murinos Ativados Quimicamente. In: XI Congresso Sociedade Brasileira de Imunologia. Resumos. Caxambu, 1986.
- * Cunha-Neto, E; Bilate, A.M; Hyland, K.V; Fonseca, S.G; Kalil, J; Engman, D.M. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: A case for molecular mimicry. Autoimmunity, 39(1): 41-54, 2006.
- * Deane, L.M. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. Rev Brasil Malariol D Trop 16: 27-48, 1964.
- * deBruijn, M.H e Barker, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmaniabraziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Trop. Sep;52(1):45-58, 1992.
- * De Souza, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr. Pharm. Des. 8: 269-282; 2002.
- * Dias, E. Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 35: 335-342, 1940.
- * Dias, J.C.P; Prata, A; Schofield, J.C. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectiva de prevenção. Rev Soc Bras de Med Trop 35: 669-678, 2002.
- * Dias, J.C.P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 4, p. 370-375, 2006.
- * Dias, J.P; Bastos, C; Araújo, E; Mascarenhas, A.V; Martins Netto, E; Grassi, F; Silva, M; Tatto, E; Mendonça, J; Araújo, R.F; Shikanay-Yasuda, M.A; Aras, R. Surto de doença de Chagas aguda associada à transmissão oral. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41(3), p. 296-300, 2008.
- * Dias, J.C; Prata, A; Correia, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. Rev Soc Bras Med Trop, v. 41(2), p. 193-196, 2008.
- * Diaz Ungría, C. La contaminación por vía buco-gástrica e ocular en los tripanosomas. Revista de la Universidad de Zulia, v. 41, p. 45, 1968.
- * DosReis, G.A. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitology today, Vol 13 (9): 335-342, 1997.

- * Dutra, W.O; Rocha, M.O; Teixeira, M.M. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trend Parasitol*; 21(12):581-7; 2005.
- * Fé, N.F; França, M.S; Carvalho-Costa, F.A. Reassessing the entomological investigation around the first autochthonous case of Chagas disease in Western Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 121-123, 2009.
- * Feliciangeli, M.D; Dujardin, J.P; Bastrenta, B; Mazzarri, M; Villegas, J; Flores, M; Muñoz, M. Is *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae) responsible for Chagas disease transmission in Western Venezuela? *Tropical Medicine and International Health* 7: 280-287, 2002.
- * Ferreira, A.W e Ávila, S.L.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2^a. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
- * Ferreira, C.S; Martinho, P.C; Amato-Neto, V; Cruz, R.R.B. Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 43, n. 3, p. 161-162, 2001.
- * Feschotte, C e Pritham, E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu. Rev. Genet.*, v.41, p.331-368, 2007.
- * Fife, E.R e Muschel, L.H. Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc Soc Exp Biol* 10: 540-543, 1959.
- * Fraiha, H. Doença de Chagas. In: Saúde na Amazônia 2^a edição: 43-45, 1983.
- * Franco da Silveira, F.J; Carvalho, E.S; Luquetti, A.O. Chagas' disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trend Parasitol*. 17: 286-291; 2001.
- * Fundação Oswaldo Cruz. História dos métodos de diagnósticos para a doença de Chagas. Brasil, 2009 [acessado 2011]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=29>
- * Gadelha, A.A.M. Avaliação do desempenho do *kit* EIE-Recombinante- Chagas-Biomanguinhos frente ao ELISA convencional e ao teste de Hemaglutinação Indireta. Mestrado. Recife: Fundação Oswaldo Cruz, 2003.
- * Galvão, C; Carcavallo, R.U; Rocha, D.S; Jurberg, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36, 2003.
- * Gomes, A.P; Santos, M.A; Rôças, G. et al. Vida e morte na Amazônia: o desmatamento e a ecoepidemiologia da infecção por *Trypanosoma cruzi* como temática para a educação ambiental na formação de profissionais de saúde. In: Encontro Nacional de Ensino de Ciências da Saúde e do Ambiente, Niterói, RJ. UNIPLI, p. 440-446, 2008.

- * Gomes, Y.M. Diagnóstico Etiológico. In: Malta J. (Org.). Doença de Chagas. São Paulo: Editora Savier, p. 119-132, 1996.
- * Gomes, Y.M; Pereira, V.R.A; Nakazawa, M; Rosa, D.S; Barros, M.N.D.S, Ferreira, A.G.P; Silva, E.D; Ogatta, S.F.Y; Krieger, M.A; Goldenberg, S. Serodiagnosis of Chronic Chagas Infection by Using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos Kit. Mem Inst Oswaldo Cruz 96: 497-501, 2001.
- * Goodier, J.L e Kazazian, H.H Jr. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. Cell ,135:23–35, 2008.
- * Gurgel-Gonçalves, R. Filogeografia, morfometria e distribuição geográfica potencial de populações de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) no Brasil. Tese, Universidade de Brasília, 2008.
- * Guerreiro, C; Machado, A. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Brasil med 27: 225-226, 1913.
- * Guidon , N e Delibras, G. Carbon-14 dates point to man in the Americas 32,000 years ago. Nature, 321, p. 769-771, 1986.
- * Han, K; Konkel, M.K; Xing, J; Wang, H; Lee, J; Meyer, T.J; Huang, C.T; Sandifer, E; Hebert, K; Barnes, E.W; Hublet, R; Miller, W; Arian, F.A; Ullmer, S.B; Batzer, M.A. Mobil DNA in old world monkeys. A glimpse through the Rhesus macaque genome. Science, 316: 238-240, 2007.
- * Hecht, M.M; Nitz, N; Araujo, P.F; Sousa, A.O; Rosa, A.D.C; Gomes, D.A; Leonardecz, E; Teixeira, A.R.L. Inheritance of DNA transferred from *Trypanosoma cruzi* to human hosts. Plos One. , v.5, p.e9181, 2010.
- * Hernández, L.M; Cano, A.N.R; Cucunubá, Z; Zambrano, P. Brote de Chagas agudo em Lebrija, Santander 2008. Revista Del Observatorio de Salud Pública de Santander (OSPS), n. 4(1), p. 28-36, 2009.
- * Ianni, B.M e Mady, C. Como era gostoso meu caldo de cana. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 85 (6), p. 379-381, 2005.
- * ISID. International Society For Infectious Diseases ProMED-mail: Trypanosomiasis, foodborne - Venezuela: (Vargas), guava juice, 06 apr. 2009. Disponível em: <http://www.promedmail.org/pls/otn/f?p>. Acesso em: 11 ago. 2011.
- * Iskow, R.C; McCabe, M.T; Mills, R.E; Torene, S; Pittard, W.S; et al. Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. Cell, 141:1253–61, 2010.
- * Jansen, A.M e Deane, M.P. *Trypanosoma cruzi* infection of mice by ingestion of food contaminated with material of the anal gland of the opossum *Didelphis marsupialis*. In: Reunião sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 1985, Caxambu. Anais do evento, p. 39, 1985.

- * Jurka, J; Kapitonov, V.V; Pavlicek, A; Klonowski, P; Kohany, O; Walichiewicz, J. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetics and Genome Research.*, 110: 462-467, 2005.
- * Kalil, J e Cunha-Neto, E. Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today*, V. 12, p. 396-399, 1996.
- * Kapitonov, V.V e Jurka, J. The age of *Alu* subfamilies. *Mol Evol.*, 42(1):59-65, 1996.
- * Kapitonov, V.V e Jurka, J. RAG1 core and V(D)J recombination signal sequences were derived from Transib transposons. *PLoS Biol.*, 3:e181, 2005.
- * Kapitonov, V.V e Jurka, J. Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons. *Trends in Genetics*. v23, n10, p521-9, 2007.
- * Khodosevich, K; Lebedev, Y; Sverdlov, E. Endogenous retroviruses and human evolution. *Comp Funct Genomics*. 3: 494-498, 2002.
- * Kidwell, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*. 115: 49-63, 2002.
- * Kofoid, C.A e Donat, F. Experimental infection with *Trypanosoma cruzi* from the intestine of cone-nose bug: *Triatoma protracta*. *Proceedings of Society Experimental Biology NY*, v. 30, p. 489-491, 1933.
- * Krieger, M.A; Almeida, E; Oelemann, W; Lafaille, J.J; Borges-Pereira, J; Carvalho, M.R; Goldenberg, S. Use of recombinant antigens for the accurate immuno-diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 46: 427-434, 1992.
- * Kwun, H.J; Han, H.J; Lee, W.J; Kim, H.S; Jang, K.L. Transactivation of the human endogenous retrovirus K long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein 0. *Virus Res*. 86(1-2):93-100, 2008.
- * Lacerda, M; Borborema, M; Damian, M; Malheiros, R; Mourão, M.P; Macedo, V; Guerra, J. Meningoencefalite chagásica: relato de um caso na Amazônia brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 495, 2005.
- * Lander, E.S; Linton, L.M; Birren, B; Nusbaum, C; Zody, M.C; et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921, 2001.
- * Landry, J.R e Mager, D.L. Functional Analysis of the Endogenous Retroviral Promoter of the Human Endothelin B Receptor Gene. *J Virol.*,77(13):7459–7466, 2003.
- * Lainson, R; Shaw, J.J; Naiff, R.D. Chagas disease in the Amazon basin: Speculations on transmission “*per os*”. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, n. 22, p. 294-297, 1980.

- * Lauria-Pires, L; Braga, M.S; Vexenat, A.C; Nitz, N; Simões-Barbosa, A; Tinoco, D.L; Teixeira, A.R.L. Progressive chronic Chagas Heart disease ten years after treatment with anti-trypanosoma nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg.* V 63 (3-4): 111-118, 2000.
- * Lemmers, R.J; Van der Vliet, P.J; Klooster, R; Sacconi, S; Camano, P; et al. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Science.* 329:1650–53, 2010.
- * Lemos, E.R.S e D'Andrea, P.S. Trabalho com animais silvestres. In: Martins, E.V; Martins, A.S; Silva, F.H.A.L; Lopes, M.C.M; Moreno, M.L.V; Silva, P.C.T. (Org.). *Biossegurança, informação e conceitos, textos básicos.* 1 ed. Rio de Janeiro: Fiocruz I: 273-288, 2006.
- * Leon, J.S e Engman, D.M. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front. Biosci.,* 8: 315-322, 2003.
- * Lewinsohn, R. Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte I). *Jornal da Unicamp, Campinas, ano XIX, n. 283, p. 2, 11 abr. 2005a.*
- * Lewinsohn, R. Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte II). *Jornal da Unicamp, Campinas, ano XIX, n. 287, p. 2, 09 mai. 2005b.*
- * Liu, B; Liu, Y; Motyka, S.A; AGBO, E.E.C; Englund, P.T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology.* V 21(8): 363-369, 2005.
- * Liu, Y.G e Whittier, R.F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics,* 25, 674-681, 1995.
- * Lukes, J; Hashimi, H; Zíková, A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr. Genet.* 48(5): 277-299, 2005.
- * Luquetti, A.O e Rassi, A. Diagnóstico laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brener, Z; Andrade, Z.A; Barral-Netto, M. (Org.). *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 17. p, 344-378; 2000.
- * Magalhães, L.K.C; Prestes, S.R; Fé, N.F; Ciriano, C.M; Fé, F.A.A; Fabiano, M.P; Maciel, M.G; Oliveira, J.C; Silveira, H; Barbosa, M.G.V. Infecção natural e diversidade de espécies de vetores de doença de Chagas nos municípios de Manaus, Coari e Tefé/AM. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42: 156, 2009.
- * Mamedov, I.Z; Shagina, I.A; Kurnikova, M.A; Novozhilov, S.N; Shagin, D.A; Lebedev, Y.B. A new set of markers for human identification based on 32 polymorphic Alu insertions. *Eur J Hum Genet.* Jul; 18(7):808-14, 2010.

- * Marcondes, C.B; Guedes, L.A; Mendonça, D. Surto de doença de Chagas com provável contaminação oral em Catolé do Rocha (PB) – observações epidemiológicas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 20(II), p. M11-M13, 1987.
- * Marcus, E. Retraction controversy. *Cell*,123, p. 173-175, 2005.
- * Marguerat, S; Wang, W.Y; Todd, J.A; Conrad, B. Association of Human Endogenous Retrovirus K-18 Polymorphisms With Type 1 Diabetes. *53(3):852-4*, 2004.
- * Martin, S.L e Bushman, F.D. Nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein from the mouse LINE-1 retrotransposon. *Mol. Cell. Biol.* 21:467–75, 2001.
- * Martin, S.L. The ORF1 Protein Encoded by LINE-1: Structure and Function During L1 Retrotransposition. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. V: 1-6, 2006.
- * Mayer, H.F. Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* por via digestiva. *An. Inst. Med. Region (Corrientes)*, v. 5, p. 43-48, 1961.
- * Mazza, S; Montana, A; Benitez, C; Janzi, E. Transmission del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas. *Mepra*, v. 28, p. 41-46, 1936.
- * Mcvey, M e Lee, S.E. MMEJ repair of double-strand breaks (director’s cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet* 24:529-538, 2008.
- * Menna-Barreto, R; Salomão, K; Barbosa, H.S. Bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. V 104 (Suppl I), 2009.
- * Miki, Y; Nishisho, I; Horii, A; Miyoshi, Y; Utsunomiya, J; et al. Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res.* 52:643–45, 1992.
- * Miles, M; Souza, A; Pova, M; Shaw, J.J; Lainson, R; Toy, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas’ disease in Amazonian Brazil. *Nature*; 272:819-821, 1978.
- * Miles, M.A; Souza, A.A; Pova, M. Chagas disease in the Amazon Basin. III - Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera, Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, Brazil. *Journal of Medical Entomology* 18:266-278, 1981.
- * Miles, M.A. Culturing and biological cloning of *Trypanosoma cruzi*. In: Hyde, J.E. ed. *Methods in molecular biology, protocols in molecular parasitology*. Totowa, Humana 15-28, 1993.

- * Miles, M.A. Orally Acquired Chagas Disease: Lessons from an Urban School Outbreak. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 201, p. 1282-1284, 2010.
- * Moran, J.V; Holmes, S.E; Naas, T.P; DeBerardinis, R.J; Boeke, J.D; Kazazian, H.H. Jr. High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell*, 87:917-27, 1996.
- * Moser, D.R; Kirchhoff, L.V; Donelson, J. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. V 27: 1477-1482, 1989.
- * Mott, G.A; Burleigh, B.A. The role of host cell lysosomes in *Trypanosoma cruzi* invasion. *Subcell Biochem*. 47:165-73; 2008.
- * Moyes, D; Griffiths, D.J; Venables, P.J. Insertional polymorphisms: a new lease of life for endogenous retroviruses in human disease. *Trends Genet*. 23:326–33, 2007.
- * MS- Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, Gerência Técnica de doença de Chagas. Normas de segurança para infecções acidentais com o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. *Rev. Patologia Tropical*, v. 26, p. 129-130, 1997.
- * MS- Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, Suppl. III, p. 12-14, 2005.
- * Mueller, D.L e Jenkins, M.K. *Clinical Immunology. Principles and Practice*. Ed. Mosby, vol 1. p.231-232, 1996.
- * Mullis, K.B e Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350, 1987.
- * Natan-Larrier, L. Infections à Trypanosomes at voies de penetrations des virus *Bulletin de la Société de Pathologie Éxotique*, v. 14, p. 537-542, 1921.
- * Nelson, P.N; Hooley, P; Roden, D; et al. Human endogenous retroviruses: Transposable elements with potential? *Clin Exp Immunol*. 138:1-9, 2004.
- * Nitz, N. Evidência de transferência horizontal de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de coelhos chagásicos. Tese, Universidade de Brasília, 2001.
- * Nitz, N; Gomes, C; Rosa, A.C; Souza-Ault, M.R; Moreno, F; Lauria-Pires, L; Nascimento, R.J; Teixeira, A.R. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease. *Cell*. V 118 (2): 174-186, 2004.

- * Noya, B.A; Díaz-Bello, Z; Colmenares, C; Ruiz-Guevara, R.; Mauriello, L; Zavala-Jaspe, R; Suárez, J. A; Abate, T; Naranjo, L; Paiva, M; Rivas, L; Castro, J; Márques, J; Mendoza, I; Acquatella, H; Torres, J; Noya, O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas' disease at a school in Caracas, Venezuela. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 201, p. 1308-1315, 2010.
- * Noireau, F; Diosque, P; Jansen, A.M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research*, v.40, n.2, p.26, 2009.
- * Oliveira, S.B.C; Nogueira, O.L; Almeida, D.M; Albuquerque, P.L.M.M; Mont'Alverne, T.N.S. Doença de Chagas aguda por transmissão via oral. In: Congresso Brasileiro de Clínica Médica, 9º, 2007, Curitiba. Anais do evento, CD-ROM, 2007.
- * Ono, R; Nakamura, K; Inoue, K; Naruse, M; Usami, T; et al. Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat. Genet.* 38:101–6, 2006.
- * OPS- Organización Panamericana de La Salud. Informe de la consulta técnica en epidemiología, prevención y manejo de la transmisión de la enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos (ETA). Rio de Janeiro, 2006. 46 p. Disponível em: <http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/informe_eta.pdf>. Acesso em: 7 mar. 2009.
- * Otero, A.M.A; Carcavallo, R.U; Tonn, R.J. Notas sobre la biología, ecología y distribución geográfica de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae). *Bolletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental* 16: 163-168, 1976.
- * Parker, H.G; Von Holdt, B.M; Quignon, P; Margulies, E.H; Shao, S; et al. An expressed *fgf4* retrogene is associated with breed-defining chondrodysplasia in domestic dogs. *Science*, 325:995–98, 2009.
- * Pereira, K.S; Schmidt, F.L; Guaraldo, A.M.A; Franco, R.M.B; Dias, V.L; Passos, L.A.C. Chagas' disease as a foodborne illness. *Journal of Food Protection*, v. 72 (2), p. 441-446, 2009.
- * Pimentel, C.F. Herança de seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de células do sêmen de pacientes chagásicos com presença de nDNA de *Trypanosoma cruzi* . Dissertação, Universidade de Brasília, 2012.
- * Pinto, A.Y.N; Harada, G.S; Valente, V.C; Abud, J.E; Gomes, F.D; Souza, G.C; Valente, S.A.S. Cardiac attacks in patients with acute Chagas disease in a family micro-outbreak, in Abaetetuba, Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34:413-419, 2001.

- * Pinto, A.Y.N; Valente, S.A; Valente, V.C; Ferreira-Junior, A.G; Coura, J.R. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 602-614, 2008.
- * Pokorna, M; Kratochvil, L; Kejnovsky, E. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics*. 12: 1471, 2011.
- * Portela-Lindoso, A.A.B e Shikanai-Yasuda, M.A. Chronic Chagas' disease from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev. Saúde Pública*, v. 37, n.1, p. 107-115, feb. 2003.
- * Rassi, A; et. al. Clinical features. In: Wendel, S; Brener, Z; Camargo, M.E; Rassi, A. (Eds). *Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine*. São Paulo: Editora Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, p. 81-101, 1992.
- * Rey, L. *Parasitologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 161-178, 2002.
- * Ribeiro dos Santos, R; Rossi, M.A; Laus, J.L; Santana Silva, J; Savino, W; Mengel, J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. exp. Med.* V 175: 29-39, 1992.
- * Rodrigues, I.R.C; Souza, A.A; Terceros, R; Valente, S. Doença de Chagas na Amazônia I. Registro de oito casos autóctones em Macapá. *Rev Soc Bras Med Trop*; 21: 193- 197, 1988.
- * Rodríguez, B; Maya, B; Blanco, M; Nicholls, S; Hernández, C.A; Gualdrón, L.E. Estudio de un brote de carditis chagásica aguda en una población adulta. *Acta Médica Colombiana*, v. 17, Suppl. p. 280, 1992.
- * Rodriguez-Morales, A.J. Chagas disease: An emerging food-borne entity? *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 2, p. 149-150, 2008.
- * Rodriguez-Morales, A.J; Silvestre, J; Carzola-Perfetti, D.J. Chagas disease in Barcelona, Spain. *Acta Tropica*, v. 112, p. 86-87, 2009.
- * Roellig, D.M; Ellis, A.E; Yabsley, M.J. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* with opposing evidence for the theory of carnivory. *Journal of Parasitology*, v. 95(2), p. 360-364, 2009.
- * Rogers, K; Gao, G; Simpson, L. Uridylate-specific 3' 5'-exoribonucleases involved in uridylate-deletion RNA editing in trypanosomatid mitochondria. *J Biol Chem* 282: 29073-29080, 2007.
- * Rossi, M.A., Ramos, S.G., Bestetti R.B. Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. *Front. Biosci.* 8: E94-E109, 2003.

- * Roy, J; Faktorová, D; Lukes, J; Burger, G. Unusual mitochondrial genome structures throughout the Euglenozoa. *Protist.* 158(3):385-96, 2007.
- * Sambrook, J; Fritsch, E.F; Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Second Edition. Cold Spring Harbor NY, 1989.
- * Sambrook, J e Russel, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Third Edition, Chapter 6. Cold Spring Harbor NY, pp 7-12, 2001.
- * Santos-Buch, C.A e Teixeira, A.R.L. The immunology of experimental Chagas disease. III. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. *J. exp. Med.* V 140: 38-53, 1974.
- * Schechter, M; Luquetti, A.O; Rezende, J.M; Rassi, A; Miles, M.A. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* , v. 79, p. 637, 1985.
- * Schenone, H; Alfaro, E; Reyes, H; Taucher, E. Valor del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica. *Bol Chil Parasitol* 23: 149-154, 1968.
- * Schmidt, T e Heslop-Harrison, J.S. Genomes, genes, and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends in Plant Science*, 3: 195-199, 1998.
- * Serafino, A; Balestrieri, E; Pierimarchi, P; Matteucci, C; Moroni, G; Oricchio, E; Rasi, G; Mastino, A; Spadafora, C; Garaci, E; Vallebona, P.S. The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Exp Cell Res*; 315:849-62, 2009.
- * SESA- Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. Surto de doença de Chagas em Redenção. *Nota Técnica*, 14 mar. 2006, p. 2, 2006.
- * Shaw, J.J; Lainson, R; Fraiha, H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, 3: 153-157. 1969.
- * Shikanay-Yasuda, M.P. Surto epidêmico de doença de Chagas aguda em Catolé do Rocha, Paraíba. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 20(II), p. M14-M15, 1987.
- * Shikanai-Yasuda, M.A e Carvalho, N.B. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.*54(6):845-52, 2012.
- * Silva, A.R.S; Mendes, J.R.B; Mendonça, M.L; Cutrim, R.N; Brazil, R.P. Primeiros casos agudos autóctones da doença de Chagas no Maranhão e inquérito soro-epidemiológico da população. *Rev Inst Méd Trop*;18(4):269-270, 1985.
- * Silva, N.N; Clausell, D.T; Núbilos, H; Mello, A.L; Ossanai, J; Rapone, T; Snell, T. Surto epidêmico da doença de Chagas com provável contaminação oral. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 10, n. 5, p. 265-276, 1968.

- * Silveira, A.C; Feitosa, V.R; Borges, R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975/83, Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 36: 15-312, 1984.
- * Simões-Barbosa, A; Barros, A.M; Nitz, N; Argañaraz, E.R; Teixeira, A.R. Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequence in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas disease patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 94 (1): 249-252, 1999.
- * Simões-Barbosa, A. Transferência horizontal de seqüência de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para transposon LINE-1 e alteração da expressão do gene p9 na célula hospedeira. Tese, Universidade de Brasília, 2000.
- * Simões-Barbosa, A; Argañaraz, E.R; Barros, A.M; Rosa, A.C; Alves, N.P; Louvandini, P; D'Souza-Ault, M.R; Nitz, N; Sturm, N.R; Nascimento, R.J; Teixeira, A.R. Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 101 (8): 833-43, 2006.
- * Simpson, A.G.B; Stevens, J.R; Lukes, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitol*, 22:168-174, 2006.
- * Soares, M.B.P; Pontes-de-Carvalho, L; Ribeiro dos Santos, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73 (4): 547-559; 2001.
- * Soares, V.A; Dias, J.C.P; Marsden, P.D. Sobrevivência do *Trypanosoma cruzi* em caldo de cana: Resultados preliminares. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 20(2), p. 38, 1987.
- * Storino, R; Jorg, M.E. Vias de infección y aspectos clínicos. In: Storino R, Milei J, orgs. *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires: Doyma; Ppp, 132-41, 1994.
- * Strout, R.G. A method for concentrating hemoflagellates. *Journal of Parasitology*, v. 48, p. 100-105, 1962.
- * Sturm, N.R; Degraeve, W; Morel, C; Simpson, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplastide minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol.* V 33: 205-214, 1989.
- * SVS- Secretaria de Vigilância em Saúde do Brasil. Doença de Chagas aguda por transmissão oral. Nota Técnica SVS 2007a, 26 set. 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas_2609.pdf. Acesso em: 12 dez. 2010.
- * SVS- Secretaria de Vigilância em Saúde do Brasil. Doença de Chagas aguda. Nota Técnica SVS 2007b, 09 out. 2007. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas_091007.pdf. Acesso em: 12 dez. 2010.

- * Tam, O.H; Aravin, A.A; Stein, P; Girard, A; Murchison, E.P; et al. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*, 453:534–38, 2008.
- * Tarleton, R.L. Chagas disease: a role for autoimmunity. *Trends Parasitol.* 19(10): 447-451, 2003.
- * Tarleton, R.L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curren Opinion in Immunology*; 19:430-434; 2007.
- * Teixeira, A.R.L; Teixeira, M.L, Santos-Buch, C.A. The immunology of experimental Chagas' disease - IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am J Path.* V 80: 163-180, 1975.
- * Teixeira, A.R.L. Doença de Chagas e outras doenças por Tripanossomos. Editora Universidade de Brasília, 161p, 1987.
- * Teixeira, A.R.L; Lacava, Z; Santana, J.M; Luna, H. Insertion of *Trypanosoma cruzi* DNA in the genome of mammal host cell through infection. *Rev Soc Bra Med Tro.* V 24 (1): 55-58, 1991.
- * Teixeira, A.R.L; Argañaraz, E.R; Freitas, L.H; Lacava, Z; Santana, J.M; Luna, H. Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. *Mutat Res.* V 305 (2): 197-209, 1994.
- * Teixeira, A.R.L; Argañaraz, E.R; Vieira, D; Lauria-Pires, L; RJ, N; Vexenat, A; Ault, S.K; Costa, J.M. Emerging chagas disease: Trophic network and cilce of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerging Infectious Diseases (Print)*, v.7, p.100 - 112, 2001.
- * Teixeira, A.R.L; Nascimento, R.J; Sturm, N.R. Evolution and pathology in Chagas Disease – a Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 101 (5): 463-491, 2006.
- * Teixeira, A.R.L. Doença de Chagas e evolução. Universidade de Brasília: Finatec, 1ª edição, 2007.
- * Teixeira, A.R. L; Hecht, M.M; Guimaro, M.C; Sousa, A.O; Nitz, N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical microbiology review s (Online)*, v. 24, p. 592-630, 2011a.
- * Teixeira, A.R. L; Gomes, C; Nitz, N; Sousa, A.O; Alves, R.M; Guimaro, M.C;Cordeiro, C; Bernal, F.M; Rosa, A.C; Hejnar, J; Leonardecz, E; Hecht, M.M. *Trypanosoma cruzi* in the Chicken Model: Chagas-Like Heart Disease in the Absence of Parasitism. *Plos Neglected Tropical Diseases.* v.5, p.e1000, 2011b.
- * Teixeira, M.M; Gazzinelli, R.T; Silva, J.S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol*; 18(6):262-5; 2002.

- * Thomas, S; Martinez, L.L; Westenberger, S.J; Sturm, N.R. A population study of the minicircles in *Trypanosoma cruzi*: predicting guide RNAs in the absence of empirical RNA editing. *BMC Genomics* 8: 133-145, 2007.
- * Torrico, R.A. Conocimientos actuales sobre la enfermedad de Chagas en Bolivia. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, v. 29, p. 827, 1950.
- * Umezawa, E.S; Nascimento, M.S; Kesper, J.R.N; *et al.* Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas disease. *J. clin. Microbiol*, 34: 2143-2147, 1996.
- * Umezawa, E.S; Corbett, C.E; Shikanai-Yasuda, M.A; Stolf, A.M. Chagas' disease. *Lancet*; 357:797-9, 2001.
- * Umezawa, E.S; Bastos, S.F; Coura, J.R; Levin, M.J; Gonzalez, A; Rangel-Aldao, R; Zingales, B; Luquetti, A.O; Silveira, J.F. An improved Serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*; v. 43, p. 91-97, 2003.
- * Valente, S.A.S e Valente, V.C. Situação atual da doença de Chagas na Amazônia. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 26 (suppl. 29): 68-70, 1993.
- * Valente, S.A.S; Valente V.C; Fraiha Neto, H. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94 (1), p. 395-398, 1999.
- * Valente, S.A.S. Estudos dos surtos de doença de Chagas ocorridas no Pará e Amapá: Análise parasitológica, sorológica e Molecular. Tese, Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz/RJ, 2008.
- * Valente, V.C; Valente, S.A.S; Noireau, F; Carrasco, H.J; Miles M.A. Chagas disease in the Amazon basin: association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) with domestic pigs. *Journal of Medical Entomology* 35: 99-103, 1998.
- * Valente, V.C; Valente, S.A.S; Carcavallo, R.U; Rocha, D.S; Galvão, C; Jurberg, J. Considerações sobre uma nova espécie do gênero *Rhodnius* Stål, do Estado do Pará, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores*, v. 8, n. 1, p. 65-80, 2001.
- * Valente, V.C; Valente, S.A.S; Pinto, A.Y.N. Microepidemia com 10 casos de doença de Chagas em Ponta de Pedras Região do Marajó, Pará com suspeita de transmissão oral. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXXVIII, 2003, Foz do Iguaçu-PR, SBMT 35:164, 2002.
- * Vexenat, A.C. Diagnóstico sorológico diferencial de infecções causadas por *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania chagasi* e outras doenças crônicas. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 1993.

- * Vergani, F. Estudio sobre la vección de tripanosomas por medio de dípteros no vulnerantes. Boletín del Instituto de Investigaciones Veterinarias, v. 4, p. 657, 1952.
- * Viana, S; Farias, E; Lima, F; Batista, L; Vieira, A; Silva, L; Lobato, C; Nascimento, S; Chalub, S. Doença de Chagas no Estado do Acre: registro de três casos de Miocardiopatia Chagásica Aguda autóctone no Município de Rio Branco, 1993. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 27, p. 177, 1994.
- * Villalobos, R. Reparición de Enfermedades Tropicales. Kasmera, v. 35(2), p. 89-90, 2007.
- * Virreira, M; Torrico, F; Truyens, C; Alonso-Vega, C; Solano, M; Carlier, Y; Svoboda, M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am. J. Trop. Med. V 68(5): 574-582, 2003.
- * Volff, J.N. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. BioEssays. v.28, p.913-922, 2006.
- * Voller, A; Draper, C; Bidwell, D.E; Bartlett, A.A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease. Lancet 1: 426-429, 1975.
- * Wei, W; Gilbert, N; Ooi, S.L; Lawler, J.F; Ostertag, E.M; et al. Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. Mol. Cell. Biol. 21:1429–39, 2001.
- * Westenberger, S. J; Cerqueira, G. C; El-Sayed, N. M; Zingales, B; Campbell, D. A; Sturm, N. R. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. BMC Genomics, V. 7, P. 60, 2006.
- * WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas' disease. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series. p.38-42, 1991.
- * WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas Disease. Second report of a WHO expert committee. WHO Technical Report Series, V 905, 2002.
- * Wicker, T; Sabot ,F; Hua-Van, A; Bennetzen, J.L; Capy, P; Chalhoub, B; Flavell, A; Leroy, P; Morgante, M; Panaud, O; Paux, E; SanMiguel, P; Schulman, A.H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nature Reviews Genetics, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.
- * Wood, S.F.A. Potencial infectivity index for *Triatoma* harboring *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. Experimental Parasitology, v. 10, p. 356-365, 1960.

- * Yaeger, R.G. Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection to opossums via the oral route. *The Journal of Parasitology*, v. 57(6), p. 1375-1376, 1971.
- * Yoshida, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 78 (1): 87-111; 2006.
- * Yoshida, N e Cortez, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Subcell Biochem* 47: 82-91; 2008.
- * Xavier, S.S; Sousa, A.S; Vinas, P.A; Junqueira, A.C; Boia, M.N; Coura, J.R. Chronic chagasic cardiopathy in the Rio Negro, Amazon State. Report of three new autochthonous cases confirmed by serology, clinical examination, chest X-rays, electro and echocardiography. *SBMT*, 39 (2): 211-6, 2006.
- * Xing, J; Zhang, Y; Han, K; Salem, A.H; Sen, S.K; et al. Mobile elements create structural variation: analysis of a complete human genome. *Genome Res*. 19:1516–26, 2009.
- * Zhang, Z; Harrison, P; Gerstein, M. Identification and analysis of over 2000 ribosomal protein pseudogenes in the human genome. *Genome Res*. 12:1466–82, 2002.
- * Zhang, J; Fackenthal, J.D; Huo, D; Zheng, Y; Olopade, O.I. Searching for large genomic rearrangements of the BRCA1 gene in a Nigerian population. *Breast Cancer Res Treat*. Jul 2, 2010.
- * Zingales, B; Katzin, A.M; Arruda, M.V; Colli, W. Correlation of tunicamycin-sensitive surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* with parasite interiorization into mammalian cells. *Mol Biochem Parasitol*. Jun;16(1):21-34; 1985.