



**Uso da biologia molecular no diagnóstico da doença de  
Chagas: uma abordagem teórico-experimental com  
foco em qPCR**

Aluna: Ana Luisa Pereira Marques

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Hecht

Brasília – DF

2016

**Ana Luisa Pereira Marques**

**Uso da biologia molecular no diagnóstico da doença de  
Chagas: uma abordagem teórico-experimental com  
foco em qPCR**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Patologia Molecular da Faculdade de Medicina  
da Universidade de Brasília, como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestre.

Brasília – DF

2016

**O presente trabalho foi realizado no Laboratório Interdisciplinar de Biociências (LabIBC), Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.**

**Financiamento: FAPDF / CNPq / CAPES**

“As nuvens sempre passam. Podem ser nuvens claras ou escuras, mas sempre passam. Talvez tenha que chover uma tempestade, mas ela também passa. Compreenda que você não é a nuvem, você é o céu.”

*Sri Prem Baba*

## DEDICATÓRIA

“O corpo dorme porque está cansado, mas as perguntas continuam.”

*Osho*

Às pessoas amadas e incentivadoras.

Aos meus familiares, todos, sempre me incentivando e me dando força para seguir os meus sonhos.

Ao meu querido irmão, Renan. À minha amada tia, Luciana, por sempre escutar as minhas angustias, meus medos e mencionar que sou capaz.

À família que escolhi, meus amados amigos, pela alegria sempre contagiante, sorrisos, apoio e estarem comigo em todos os momentos torcendo e vibrando com cada conquista minha.

Sem vocês esse caminho teria sido mais difícil!

## **AGRADECIMENTOS**

Todo trabalho é realizado por coletividade, colaboração e pessoas que ajudam durante o caminho. Sempre devemos agradecer as pessoas que fizeram o objetivo virar realidade e tudo valer a pena.

À minha orientadora, Mariana Hecht, por me aceitar como aluna e acreditar na minha capacidade em realizar o trabalho. Seu conhecimento, ajuda nas análises e sugestões foram essenciais para obtenção dos resultados e conquistas nesta pesquisa. Obrigada pelo carinho durante todos esses anos de convívio.

À minha também orientadora, Luciana Hagström que por motivos institucionais não pôde ser oficialmente orientadora no papel. Mas, mesmo com esse desvio nos planos, não deixou de dar todo seu empenho no trabalho. Foram seis anos de parceria, desde a iniciação científica até o mestrado. Sempre me lembrando da minha capacidade e vibrando junto com cada vitória. Obrigada por acreditar naquela jovem, inexperiente que entrou um dia no laboratório pedindo estágio. Obrigada por todos os ensinamentos, amizade, carinho, dedicação e confiança durante toda essa trajetória. Meu crescimento como pesquisadora e biomédica não teria sido possível sem você. Suas palavras de apoio e incentivo foram muito importantes para mim.

À Nadjar Nitz, por todo seu carinho e atenção no desenvolvimento da pesquisa. Suas palavras sábias e amorosas foram fundamentais para me sentir acolhida e feliz no local de trabalho.

Ao CNPq e a FAPDF pela bolsa concedida e pelo financiamento da pesquisa.

Agradeço à Ana Maria de Castro pela disponibilidade, participação e contribuição na apresentação dessa dissertação. Ao Bruno Dallago pelo carinho e conselhos demonstrados durante toda a pesquisa e poder participar da minha banca de defesa de mestrado. Ao, Alessandro Sousa (Ale), amigo de longa data que me ajudou durante todas as minhas iniciações científicas nas diversas análises de sequências de DNA e me proporcionou o pouco de conhecimento de bioinformática que tenho hoje. Fico muito

orgulhosa e feliz da sua participação na minha banca de defesa de mestrado, você faz parte dessa história.

Agradeço a querida amiga do laboratório, Tamires Vital, pela sua atenção, parceria, disponibilidade e amizade. Suas palavras de incentivo me acalmaram em muitos momentos difíceis. Obrigada por ajudar no que era necessário e por ser essa pessoa tão amorosa. Espero que essa parceria continue durante muitos anos.

Meu muito obrigada, aos outros colegas de laboratório que contribuíram nesse trabalho de alguma forma. À técnica, Cássia, pela ajuda desde a iniciação científica. A Isabella, Marcelle Ribeiro e Thaís Minuzzi pelas coletas de sangue e obtenção de amostras. À Aline Moraes, pela preocupação e sempre disponibilidade em ajudar. Aos estagiários, Genilson e Luísa, pela ajuda em alguns experimentos necessários e paciência nas minhas explicações de procedimentos. Em especial, aos estagiários Bruna, Guilherme (Búzios) pelos inúmeros géis de agarose, soluções e risadas certas (vocês são uns queridos). Agradeço também ao professor Rodrigo Gurgel pela colaboração com a pesquisa. Além de todos os outros colegas de laboratório que de alguma forma ajudaram nessa pesquisa.

Às pessoas tão especiais que já se foram do laboratório, Ester Rose, Maria Carolina Diniz (Marol) e Manuela Britto. Vocês fizeram parte da minha trajetória e com muito carinho. Deixaram saudades e muitos momentos bons na memória. Possuem o coração enorme e fazem diferença onde passam. Porém, como diz a Nadjar Nitz, “o bom filho a casa volta”, Ester. E tenho certeza que sua volta ao laboratório será de muitas alegrias e conquistas.

Aos meus familiares (avós, avôs, tios, primos, irmão, pai, mãe, Ceíça, madrinha e padrinho) que contribuíram de alguma forma para atingir meus objetivos. Obrigada pela torcida, vibração e companheirismo durante todo esse processo. Amo vocês! Em especial, agradeço a minha tão amada tia e amiga, Luciana, pela paciência e amor demonstrado durante todos esses anos. Sua ajuda e parceria me fortaleceram em muitos momentos difíceis nessa jornada. Nos momentos de angústia, você acalmou meu coração. Nos momentos de felicidade você vibrou junto comigo e nos momentos de desespero você ajudou a encontrar uma saída. Você faz a diferença. Ao meu amado avô, Sandoval, agradeço toda a compreensão pela minha ausência, em um momento que tanto você precisou de mim. Foram muitas noites de privação de sono, escrevendo e

cuidando de você pela noite. Mesmo quando era você que precisava de cuidados, se preocupava comigo, “filhinha, nossa netinha não dormiu até agora”. Prometo para você que agora irei dar mais atenção e amor.

Ao meu primo Marcio e amigo, por ajudar com alguns pedidos médicos na pesquisa e ser tão bondoso em dividir a amizade dos seus grandes amigos comigo.

Aos meus tão amados amigos que compreenderam minha ausência em muitos bares, festas, conversas e jantares. Obrigada por serem meu chão, minha alegria. Por se orgulharem tanto de mim, das minhas conquistas, estarem comigo em todos os momentos (sendo ruins ou bons) e as mensagens de preocupação e amor. Obrigada pelo acolhimento, carinho e me deixarem roubar um pouquinho a família de vocês para mim. Eu não tenho dúvidas de que são os melhores amigos que eu poderia ter. Vocês são a família que escolhi! Amo vocês!

Por fim, agradeço aos voluntários que participaram dessa pesquisa. Suas amostras foram recebidas e analisadas com muito carinho e empenho.

Obrigada!

## RESUMO

As infecções pelo *Trypanosoma cruzi* são um sério problema de saúde pública na América Latina, com alta morbidade e mortalidade. Cerca de oito a dez milhões de pessoas estão infectadas pelo parasito em todo o mundo e um terço irá desenvolver os sintomas da doença de Chagas. Para o diagnóstico dessa infecção, são usados principalmente métodos sorológicos que se baseiam em anticorpos específicos contra o parasito. Esses exames apresentam resultados duvidosos ou falsos positivos devido à reação cruzada com antígenos de outros microorganismos. A evolução na área da biologia molecular vem modificando e aperfeiçoando o diagnóstico da doença de Chagas, representando uma boa alternativa para complementar ou estabelecer o diagnóstico das infecções pelo *T. cruzi*. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma investigação teórica-experimental de protocolos de qPCR utilizados para o diagnóstico de infecções pelo *T. cruzi*. A revisão sistemática da literatura permitiu a identificação das condições experimentais (métodos de extração, iniciadores, enzimas amplificadoras, entre outros) mais utilizadas nos artigos científicos selecionados e a observação de que ainda não existe um procedimento padrão estabelecido. Assim, diferentes protocolos de qPCR para identificação do *T. cruzi* foram avaliados experimentalmente. Foram utilizados marcadores específicos para DNA nuclear (nDNA) e para minicírculos e maxicírculos de kDNA de *T. cruzi*. A população do estudo foi separada em três categorias - grupos positivo, negativo e duvidoso - de acordo com os testes sorológicos apresentados pelos indivíduos. Os resultados comparativos dos métodos sorológicos e moleculares apresentaram discordâncias peculiares, notadamente quando se utilizou marcadores para minicírculos de kDNA, fato que pode estar associado à integração dessas moléculas no genoma hospedeiro. Estabeleceu-se que a melhor escolha diagnóstica para identificação de infecção ativa pelo *T. cruzi* se dá com marcadores moleculares específicos para nDNA, o qual foi capaz de determinar a infecção em casos inconclusivos na análise sorológica. Os achados deste estudo reforçam a necessidade de um diagnóstico mais efetivo que possa ser utilizado como padrão-ouro para identificação das infecções pelo *T. cruzi*.

**Palavras-Chave:** Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, revisão sistemática, métodos experimentais, diagnóstico, qPCR

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* infection is a serious public health problem in Latin America, with high morbidity and mortality. About eight to ten million people are infected with the parasite worldwide and one-third will develop the symptoms of Chagas disease. Its diagnosis is mainly based on serological methods that recognize specific antibodies against the parasite. Often, these tests have inconclusive results or false positives due to cross-reaction with antigens from other microorganisms. Development in molecular biology has been changing and improving the diagnosis of Chagas' disease, representing a good alternative to supplement or establish the diagnosis of *T. cruzi* infection. Thereby, the objective of the current study was to evaluate theoretically and experimentally qPCR protocols used for Chagas disease diagnosis. A systematic review of the literature allowed the identification of experimental conditions (extraction methods, primers, amplifying enzymes, etc) commonly used in scientific articles and the observation that there is no standard procedure established. Thus, different qPCR protocols for *T. cruzi* identification were experimentally assessed. Specific primers were used for nuclear DNA (nDNA), and mitochondrial DNA (minicircles and maxicircles). The study population was divided into three categories - positive, negative and doubtful groups - according to the serologic tests. Comparison between serologic and molecular results showed peculiar disagreements, especially when using primers for kDNA minicircle, which may be associated with the integration of these molecules into the host genome. It was established that the best choice for diagnosis *T. cruzi* active infection is by specific molecular markers to nDNA, which was able to establish infection in inconclusive serological analysis. Our findings reinforce the need of an effective diagnosis that can be used as the gold standard for identification of *T. cruzi* infection.

**Key words:** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, systematic review, experimental methods, diagnosis, qPCR.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pg.</b>
<b>Figura 1:</b> Distribuição global da doença de Chagas entre os anos de 2006 a 2010.	03
<b>Figura 2:</b> Formas de desenvolvimento do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	04
<b>Figura 3:</b> Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	05
<b>Figura 4:</b> Curso natural da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> .	09
<b>Figura 5:</b> Ultraestrutura do <i>Trypanosoma cruzi</i> e micrografia eletrônica do kDNA de <i>Crithidia fasciculata</i> .	11
<b>Figura 6:</b> Esquema representando um minicírculo de kDNA.	12
<b>Figura 7:</b> Resultados das buscas da revisão sistemática.	30
<b>Figura 8:</b> Distribuição dos indivíduos nos grupos de estudo.	32
<b>Figura 9:</b> Curva de amplificação da qPCR ilustrando o seu $C_q$ .	45
<b>Figura 10:</b> Cronologia dos anos de publicação dos estudos da revisão sistemática.	48
<b>Figura 11:</b> Produtos da amplificação de cPCR de amostras com diferentes concentrações de <i>T. cruzi</i> com marcador TcZ3/TcZ4.	57
<b>Figura 12:</b> Produtos da amplificação de cPCR de amostras com diferentes concentrações de <i>T. cruzi</i> com marcador PON1/PON2.	58
<b>Figura 13:</b> Produtos da amplificação de cPCR de amostras com diferentes concentrações de <i>T. cruzi</i> com marcadores de kDNA.	59

<b>Figura 14:</b>	Curva de amplificação linear da qPCR das amostras de <i>T. cruzi</i> .	61
<b>Figura 15:</b>	Produtos da amplificação de qPCR de amostras com diferentes concentrações de <i>T. cruzi</i> com marcador TcZ3/TcZ4.	61
<b>Figura 16:</b>	Curva padrão de nDNA gerada a partir da amplificação de amostras de <i>T. cruzi</i> com diferentes concentrações.	62
<b>Figura 17:</b>	Curva de amplificação linear das qPCRs de kDNA das amostras de <i>T. cruzi</i> .	63
<b>Figura 18:</b>	Produtos da amplificação de qPCR de amostras com diferentes concentrações de <i>T. cruzi</i> com marcadores de kDNA.	64
<b>Figura 19:</b>	Curvas padrão de kDNA geradas a partir da amplificação de amostras de <i>T. cruzi</i> com concentrações variadas e diferentes iniciadores.	65
<b>Figura 20:</b>	Eletroforese do produto de qPCR com marcador TcZ3/TcZ4 para as amostras do grupo positivo extraídas com dois métodos diferentes.	67
<b>Figura 21:</b>	Eletroforese do produto de qPCR com marcador ND4/ND4R para as amostras do grupo positivo extraídas com dois métodos diferentes.	68
<b>Figura 22:</b>	Resultados da qPCR do grupo negativo usando o marcador TcZ3/TcZ4.	70
<b>Figura 23:</b>	Padrão da curva de dissociação obtida na qPCR com iniciadores de nDNA.	71
<b>Figura 24:</b>	Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S36/67R.	74
<b>Figura 25:</b>	Eletroforese do produto de qPCR de amostras do grupo negativo com marcador S36/67R.	75

<b>Figura 26:</b>	Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S34/S67.	76
<b>Figura 27:</b>	Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S36/67R.	77
<b>Figura 28:</b>	Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S34/S67.	79
<b>Figura 29:</b>	Eletroforese do produto de qPCR com marcador S34/S67.	80
<b>Figura 30:</b>	Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S36/67R do grupo duvidoso.	81
<b>Figura 31:</b>	Eletroforese do produto de qPCR das amostras duvidosas com marcador S36/67R.	82
<b>Figura 32:</b>	Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S34/S67 do grupo duvidoso.	83
<b>Figura 33:</b>	Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de maxicírculos kDNA ND4/ND4R para o grupo negativo.	84
<b>Figura 34:</b>	Análise das curvas de amplificação da qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S34/S67 do grupo negativo.	85
<b>Figura 35:</b>	Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de maxicírculos kDNA ND4/ND4R para o grupo positivo.	86
<b>Figura 36:</b>	Eletroforese do produto de qPCR de amostras positivas com iniciador de maxicírculo ND4/ND4R.	87
<b>Figura 37:</b>	Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de maxicírculos kDNA ND4/ND4R do grupo duvidoso.	88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Comparação entre sensibilidade e especificidade nos métodos diagnósticos parasitários, moleculares e sorológicos.	21
<b>Tabela 2:</b>	Questão da pesquisa.	27
<b>Tabela 3:</b>	Iniciadores específicos para <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizados nas cPCRs e qPCRs.	38
<b>Tabela 4:</b>	Artigos selecionados na revisão sistemática.	46
<b>Tabela 5:</b>	Características de interesse dos estudos selecionados na revisão sistemática.	49
<b>Tabela 6:</b>	DNA alvo amplificado, iniciadores utilizados e sistema de detecção da qPCR realizadas nos estudos selecionados na revisão sistemática.	54
<b>Tabela 7:</b>	Quantidade de DNA obtido nas amostras do grupo positivo com extração realizada pelos kits comerciais Promega e Biopur.	66
<b>Tabela 8:</b>	Cargas parasitárias das amostras do grupo positivo com DNA extraído pelos kits comerciais Promega e Biopur (dados da qPCR com marcadores TcZ3/TcZ4).	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>A</b>	Adenina
<b>AGDs</b>	Agrupamentos de genes diferenciais
<b>C</b>	Citocina
<b>CBS 3</b>	<i>Conserved sequence blocks</i> (blocos de sequências conservadas)
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>cPCR</b>	PCR convencional
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
<b>dNTP</b>	Desoxiribonucleotídeo trifosfato
<b>dNTPs</b>	Desoxiribonucleotídios trifosfato
<b>DTUs</b>	<i>Discrete typing unit</i> (tipos discretos de unidades)
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamiotetra-acético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzimas)

<b>G</b>	Guanina
<b>gRNAs</b>	RNAs guias
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HI</b>	Hemaglutinação indireta
<b>IFI</b>	Imunofluorescência Indireta
<b>kb</b>	Quilobase
<b>kDNA</b>	<i>Kinetoplast</i> DNA (DNA do Cinetoplasto)
<b>LabIBC</b>	Laboratório Interdisciplinar de Biociências
<b>LINE-1</b>	<i>Long interspersed element-1</i>
<b>LMPDC</b>	Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas
<b>LIT</b>	<i>Liver Infusion Triptose</i>
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Micrograma
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Mpb</b>	Mega pares de bases

<b>MIQE</b>	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments</i> (Informação mínima para publicação experimental da PCR em tempo real quantitativa)
<b>mRNAs</b>	RNAs mensageiros
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>nDNA</b>	DNA nuclear
<b>ng</b>	Nanograma
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana de Saúde
<b>ORFs</b>	Fases de leitura aberta
<b>par.eq./mL)</b>	Parasitas-equivalente/mL
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>qPCR</b>	PCR em tempo real ou PCR quantitativa
<b>RHS</b>	Retrotransposon <i>hot spot</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
<b>rRNAs</b>	RNAs ribossômicos

<b>RS</b>	Revisão sistemática
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>SSC</b>	Tampão Salino Citrato de Sódio
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TGV</b>	Transferência gênica vertical
<b>Tm</b>	Temperatura de <i>melting</i>
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

# SUMÁRIO

<b>I INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1. DOENÇA DE CHAGAS</b> .....	1
1.1 Descoberta da doença.....	1
1.2 Epidemiologia.....	2
1.3 Ciclo de vida .....	3
1.4 Vias de Transmissão .....	6
1.5 Manifestações clínicas.....	8
<b>2. AGENTE ETIOLÓGICO</b> .....	9
2.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
2.1.1 Organização e estrutura do DNA nuclear.....	10
2.1.2 Organização e estrutura do DNA do cinetoplasto.....	10
<b>3. PATOGÊNESE DA DOENÇA DE CHAGAS</b> .....	13
3.1 Persistência do parasito .....	13
3.2 Autoimunidade.....	14
<b>4. TRATAMENTO</b> .....	16
<b>5. DIAGNÓSTICO</b> .....	17
5.1 Diagnóstico parasitológico .....	18
5.2 Diagnóstico sorológico .....	19
5.3 Uso da biologia molecular .....	20
5.3.1 Reações de PCR e o diagnóstico da doença de Chagas.....	22
<b>II JUSTIFICATIVA</b> .....	25
<b>III OBJETIVOS</b> .....	26
<b>1. OBJETIVO GERAL</b> .....	26
<b>2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	26
<b>IV MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
<b>1. REVISÃO SISTEMÁTICA (RS)</b> .....	27
1.1 Tipo de estudo.....	27
1.2 A formulação da pergunta .....	27
1.3 Estratégia de coleta de dados .....	28
1.4 Seleção de artigos e processos de extração de dados .....	29
<b>2. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	31
2.1 GRUPO AMOSTRAL.....	31

2.1.1 Amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	31
2.1.2 Amostras humanas.....	31
2.2 CULTURA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	32
2.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO .....	33
2.4 EXTRAÇÃO DE DNA.....	33
2.4.1 Extração do DNA do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	33
2.4.2 Extração de DNA de células mononucleares do sangue periférico humano .....	34
2.4.2.1 Extração com o kit <i>Wizard Genomic DNA Purification Kit</i> .....	34
2.4.2.2 Extração com o kit <i>Mini Spin Plus Biopur</i> .....	35
2.4.2.3 Extração manual com fenol-clorofórmio .....	36
2.4.3 Quantificação e análise do DNA extraído.....	37
2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE CLÁSSICA .....	37
2.5.1 Amplificação do DNA nuclear (nDNA) do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	37
2.5.2 Amplificação do DNA do cinetoplasto (kDNA) do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	39
2.5.2.1 Desenho dos iniciadores de maxicírculos .....	39
2.5.2.2 Condições da amplificação do DNA do cinetoplasto (kDNA) do <i>T. cruzi</i> .....	40
2.5.3 Visualização dos produtos amplificados por cPCR.....	41
2.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR) .....	41
2.6.1 qPCR de nDNA do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	43
2.6.2 qPCR de kDNA do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	43
2.6.3 Curva padrão para quantificação absoluta .....	44
2.6.4 Eletroforese em gel de agarose.....	45
<b>V RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
<b>1. REVISÃO SISTEMÁTICA .....</b>	<b>46</b>
<b>2. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR) .....</b>	<b>56</b>
2.1 Detecção do <i>T. cruzi</i> por cPCR.....	56
2.1.1 Amplificação de nDNA.....	56
2.1.2 Amplificação de kDNA.....	58
2.2 Detecção do <i>T. cruzi</i> por qPCR .....	60
2.2.1 Amplificação do nDNA.....	60
2.2.2 Amplificação do kDNA.....	62
3. COMPARAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA HUMANO.....	65
4. DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DA qPCR EM HUMANOS.....	68

4.1 Emprego da qPCR com marcadores específicos para nDNA para identificação das infecções ativas pelo <i>T. cruzi</i> .....	69
4.1.1 Grupo negativo.....	69
4.1.2 Grupo positivo .....	70
4.1.3 Grupo duvidoso .....	71
4.2 Emprego da qPCR com marcadores específicos para kDNA para identificação do <i>T. cruzi</i> .....	72
4.2.1 Amplificação de regiões dos minicírculos de kDNA .....	72
4.2.1.1 Grupo negativo.....	72
4.2.1.1.1 Amplificação de minicírculos de kDNA com os iniciadores S36/67R .....	73
4.2.1.1.2 Amplificação de minicírculos de kDNA com os iniciadores S34/S67 .....	75
4.2.1.2 Grupo positivo .....	77
4.2.1.2.1 Amplificação de minicírculos de kDNA com os iniciadores S36/67R .....	77
4.2.1.2.2 Amplificação de minicírculos de kDNA com os iniciadores S34/S67 .....	78
4.2.1.3 Grupo duvidoso .....	80
4.2.1.3.1 Amplificação de minicírculos de kDNA com os iniciadores S36/67R .....	80
4.2.1.3.2 Amplificação de minicírculos de kDNA com os iniciadores S34/S67 .....	82
4.2.2 Amplificação de regiões dos maxicírculos de kDNA.....	84
4.2.2.1 Grupo negativo.....	84
4.2.2.1 Grupo positivo.....	85
4.2.2.3 Grupo duvidoso .....	87
<b>VI DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>1. REVISÃO SISTEMÁTICA .....</b>	<b>89</b>
<b>2. ANÁLISE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>93</b>
2.1 ASPECTOS GERAIS .....	93
2.2 USO DA qPCR PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	94
<b>VII CONCLUSÕES.....</b>	<b>100</b>
<b>VIII PERSPECTIVAS .....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>135</b>

# I INTRODUÇÃO

## 1. DOENÇA DE CHAGAS

### 1.1 Descoberta da doença

A Tripanossomíase americana, popularmente conhecida como doença de Chagas, foi descoberta no ano de 1909, pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas. Durante uma campanha para o controle de Malária em Minas Gerais, alojado em um consultório em um vagão de trem, o Dr. Chagas observou a presença de organismos flagelados no sangue de uma criança febril chamada Berenice. Contraditoriamente, após a melhora do estado febril, não foi mais possível visualizar parasitos no sangue da menina. Relatos de habitantes da região chamaram a atenção do médico para um inseto hematófago muito encontrado nas casas precárias da população daquela localidade, o “barbeiro”. Curiosamente, ele associou com a Tripanossomíase Africana transmitida pela mosca tsé-tsé, levando-o a pensar na possibilidade do inseto hematófago ser o vetor da doença. Analisando o inseto ao microscópio após dissecação, ele observou um organismo flagelado muito semelhante ao encontrado no sangue da criança e enviou o material para o laboratório de referência da época, o Instituto Manguinhos (atual Oswaldo Cruz). No instituto foi realizada a inoculação do conteúdo fecal do intestino do inseto em cobaias, evidenciando as formas flageladas no sangue alguns dias após a infecção. Assim, foi documentado o primeiro indivíduo infectado, o agente etiológico, o vetor e o ciclo de vida do parasito da doença de Chagas. O parasito responsável pela doença foi nomeado por Carlos Chagas em homenagem ao seu mentor, Oswaldo Cruz, como *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Desta forma, Carlos Chagas tornou-se um grande nome na medicina tropical, por vários meses trabalhou com poucos recursos, descreveu o patógeno, seu vetor e as características clínicas da fase aguda e crônica da doença. Vários anos após a detecção do parasito em Berenice, a mesma foi localizada e foi verificado sorologia positiva para Chagas. Entretanto, ela não apresentava sintomatologia e seu óbito em 1973 não foi associado à doença de Chagas (Chagas, 1909; Tanowitz *et al.*, 2009).

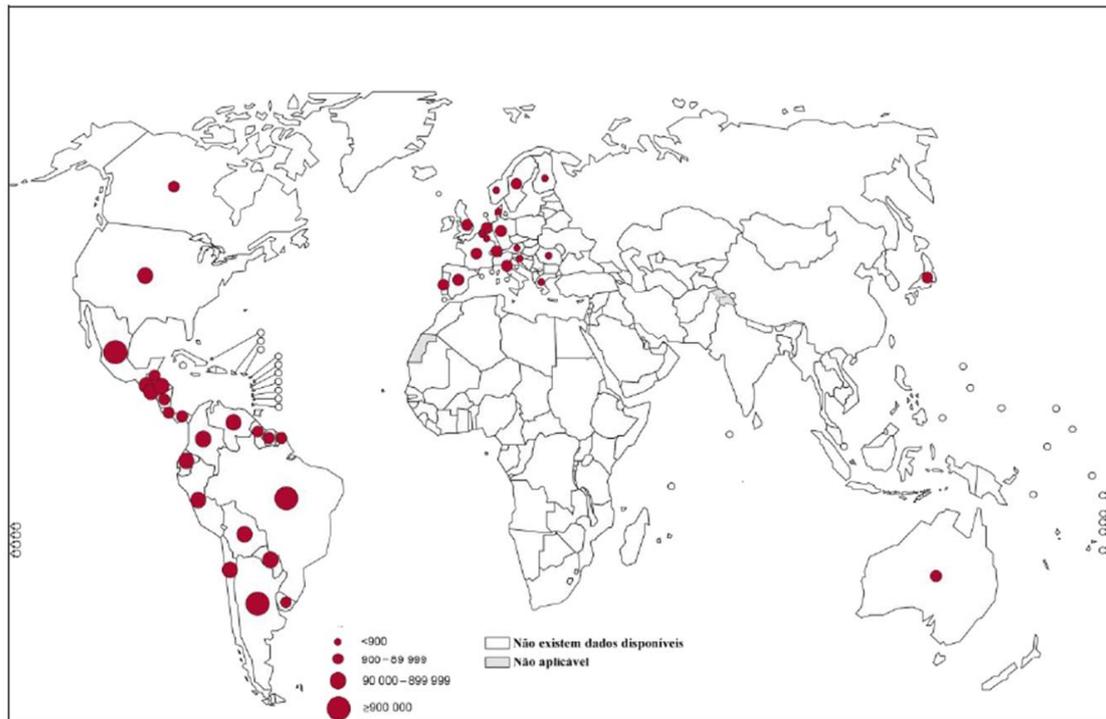
## 1.2 Epidemiologia

Durante muitos anos, a doença de Chagas foi considerada uma patologia de prevalência em áreas rurais de países endêmicos. Porém, atualmente, está presente em 21 países e em regiões não endêmicas devido à migração humana, sendo descrita no Canadá, Estados Unidos, Austrália, Japão, diversos países da Europa, entre outros (Gascon *et al.*, 2010; Rassi *et al.*, 2010; Biolo *et al.*, 2010). As infecções pelo *T. cruzi* representam um sério problema de saúde pública para a América Latina, com gastos anuais aproximados de US\$1.2 bilhões, e para vários países com números crescentes de imigrantes infectados. A Espanha, por exemplo, é um país com taxas elevadas de imigrantes oriundos do Equador, Argentina, Bolívia e Peru infectados com o *T. cruzi* (Gascon *et al.*, 2010).

Cerca de oito a dez milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* ao redor do mundo e a estimativa é que aproximadamente 120 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a doença (WHO, 2015). Aproximadamente 12.000 mortes de pacientes infectados na fase crônica sintomática, associadas à cardiomiopatia chagásica, são registradas todo ano (Cunha-Neto e Chevillard, 2014; WHO, 2015; Granjon *et al.*, 2016). No Brasil, a doença de Chagas foi responsável por 58.928 mortes no período entre 2000 a 2011, equivalente a 76,7% das mortes por doenças tropicais (Martins-Melo *et al.*, 2016).

Em 1980, 100 milhões de pessoas corriam risco de adquirir a infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto, um número bem menor de indivíduos foi infectado entre 1980 a 1985 (24 milhões). Em 2001, esse número foi de 9.8 milhões. Na realidade, principalmente a partir do ano de 1990, o número de novas infecções pelo *T. cruzi* começou a diminuir na América Latina (Mott *et al.*, 1990) devido, principalmene, a estratégias bem sucedidas no controle do vetor da doença (*Triatoma infestans*) nas regiões endêmicas, onde o número de novos casos diminuiu de 700.000 por ano em 1990 para 41.200 no ano de 2006 e também devido às ações nos bancos de sangue, diminuindo a transmissão por transfusão sanguínea. Entretanto, outras vias de transmissão (ver item 1.3, Vias de Transmissão), a transmissão sexual e a infecção oral, podem ter aumentado sua importância epidemiológica. Além disso, a elevação do processo migratório em países desenvolvidos, sem controle em bancos de sangue e em transplantes de órgãos, já demonstram taxas relevantes de indivíduos infectados com a doença de Chagas

(Schmunis *et al.*, 1991; WHO, 1991; Schmunis *et al.*, 2000). A **Figura 1** mostra a distribuição da doença de Chagas no mundo em 2010.

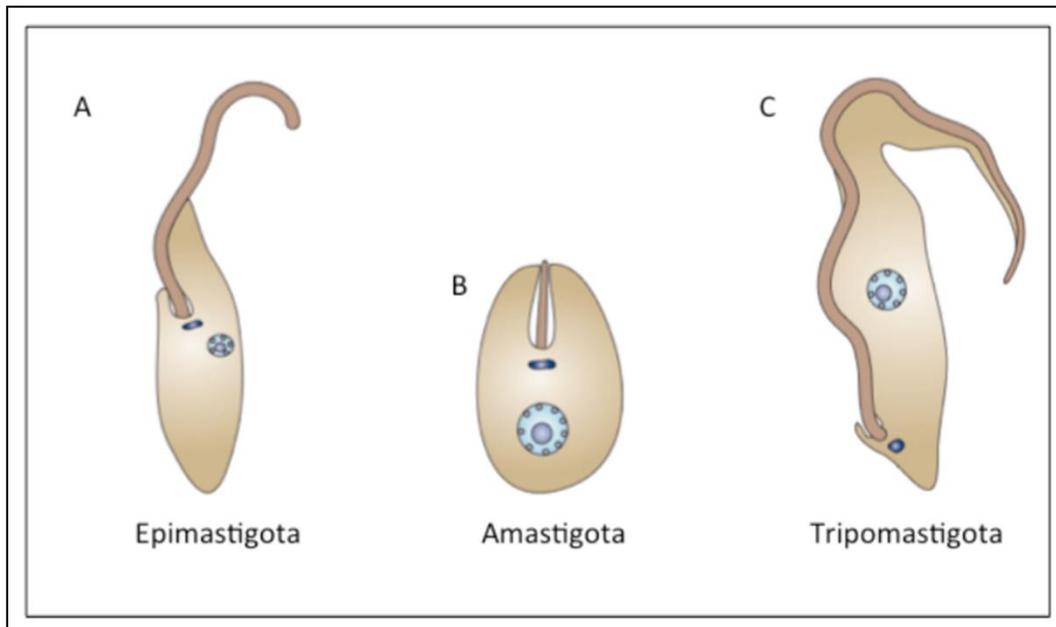


**Figura 1. Distribuição global da doença de Chagas entre os anos de 2006 a 2010.** Esse mapa evidencia a distribuição da doença de Chagas na América Latina, mas mostra a doença sendo distribuída em outros locais devido aos processos migratórios em crescente processo. Os círculos de cor vermelha apresentam os locais com números significativos da doença. Quanto maior o círculo, mais casos são relatados no local e quanto menor, menos numerosos são os casos. Os locais em cinza e branco são os lugares em que não existem dados disponíveis (Adaptado de WHO, 2013).

### 1.3 Ciclo de vida

*T. cruzi* apresenta ciclo heteroxeno, alterando entre hospedeiro vertebrado e invertebrado. Cerca de 180 espécies de mamíferos, foram identificadas como participantes do ciclo de vida do parasito (Noireau *et al.*, 2009). Este parasito apresenta formas replicativas, estágios que sofrem divisão binária, e formas não replicativas infectantes. As formas de desenvolvimento são epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas, sendo essa última encontrada no sangue do hospedeiro e nas fezes do

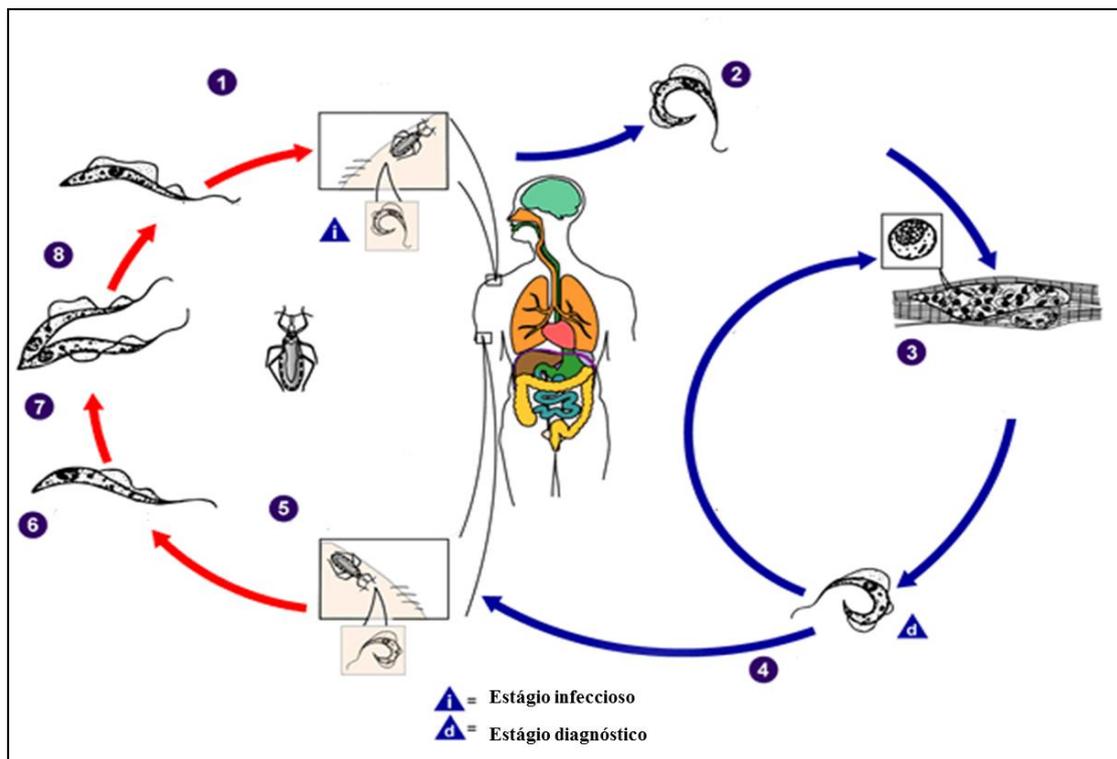
triatomíneo (**Figura 2**). Neste último caso, é denominada tripomastigota metacíclica (Garcia *et al.*, 2007).



**Figura 2. Formas de desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi*.** As formas de desenvolvimento diferem de acordo com a posição do flagelo e cinetoplasto. **A)** Epimastigota, forma replicativa no intestino do triatomíneo. **B)** Amastigota, forma intracelular replicativa no hospedeiro vertebrado. **C)** Tripomastigota, forma infectante (Adaptado de Docampo *et al.*, 2005).

O triatomíneo, quando entra em contato com um hospedeiro infectado, ingere formas tripomastigotas do *T. cruzi* durante o respasto sanguíneo. Após a ingestão, os tripomastigotas se diferenciam em formas epimastigotas, no intestino do triatomíneo. Elas migram para o intestino médio do vetor infectado, onde acontece a multiplicação por divisão binária. Depois da divisão, os parasitos vão para a porção posterior do intestino e se diferenciam para tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Ao picar o hospedeiro durante o respasto sanguíneo, o triatomíneo libera fezes e urina contaminadas com tripomastigotas metacíclicas próximos ao local da picada. A saliva do vetor possui substâncias capazes de causar um pequeno processo alérgico no local. Assim, no momento em que o hospedeiro coça a ferida, a forma infectante pode penetrar em seu organismo. Além disso, os tripomastigotas podem penetrar no hospedeiro através das mucosas e feridas pré-existentes. Assim, os parasitos entram na circulação sanguínea e são fagocitados por várias células do hospedeiro. Após a invasão, os tripomastigotas se diferenciam em

amastigotas, que evadem o vacúolo parasitóforo, e iniciam a multiplicação intracelular. Após a multiplicação, ocorre a diferenciação em tripomastigotas e o rompimento da membrana plasmática, liberando os parasitos. Os tripomastigotas podem invadir novas células, ou se espalharem pelo organismo por via hematogênica, podendo ser ingeridos pelo vetor em um novo repasto, reiniciando o ciclo (Cuervo *et al.*, 2010; Nogueira e Cohn, 1976) (**Figura 3**).



**Figura 3. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** Os números representam a sequência em que normalmente ocorre a infecção pelo *T. cruzi* (números 1 a 8). (1) O triatómico infectado libera sobre a pele do hospedeiro fezes e urina contaminadas com tripomastigotas metacíclicos após o repasto sanguíneo. (2) As formas tripomastigotas atingem a corrente sanguínea. (3) Os tripomastigotas invadem células onde se diferenciam em amastigotas. (4) Os amastigotas se multiplicam dentro da célula e se diferenciam em tripomastigotas. As células se rompem e liberam na corrente sanguínea os parasitos, que invadem outras células. (5) Os tripomastigotas circulantes são ingeridos por outro triatómico no momento da hematofagia. (6) No intestino do triatómico, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas (7) e se multiplicam por divisão binária. (8) Os epimastigotas se deslocam para o intestino posterior e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, reiniciando o ciclo (Adaptado de CDC, 2016; <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>).

## 1.4 Vias de Transmissão

Em regiões endêmicas, a principal via de transmissão do *T. cruzi* é a vetorial. Essa transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor, eliminando fezes e urina contendo as formas metacíclicas do protozoário sobre o hospedeiro (ver item 1.3 Ciclo de vida). Esses vetores são hematófagos, pertencentes à família Reduviidae e à subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como “barbeiros” (Dorn *et al.*, 2007). O parasito é transmitido por muitas espécies de triatomíneos distribuídos em várias regiões da América Latina e até mesmo no sul dos Estados Unidos (Shender *et al.*, 2016). Há sete linhagens diferentes de *T. cruzi* circulantes em triatomíneos (mais de 140 espécies) em vários países de todo o continente Americano, exceto o Canadá (Minuzzi-Souza *et al.*, 2016). As espécies mais relevantes de triatomíneos para a doença de Chagas são: *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida*, *Triatoma brasilienses*, *Triatoma maculata*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius neglectus*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*. A prevenção primária da infecção seria reduzir o contato entre o vetor e os seres humanos. Isso normalmente é realizado por pulverização com inseticidas nas casas suscetíveis. Essa estratégia é satisfatória contra espécies de vetores domiciliados e contra vetores introduzidos acidentalmente (Abad-Franch *et al.*, 2015).

A aproximação dos centros urbanos com áreas silvestres tem sido fator importante para descoberta de triatomíneos infectados em áreas domiciliares e peridomiciliares, mesmo em países não endêmicos. A invasão de casas por triatomíneos adultos em áreas urbanas e rurais foi descrita, por exemplo, nos Estados Unidos, México e outros países. No Brasil, o departamento de saúde de Tocantins, por exemplo, documentou mais de 10.000 casos de invasão domiciliar de triatomíneo entre 2005 e 2013 (Kjos *et al.*, 2013; Abad-Franch *et al.*, 2015).

Em regiões endêmicas, os bancos de sangue realizam testes para detecção de anticorpos contra *T. cruzi*, sendo obrigatórios. Entretanto, nessas áreas, a transmissão via transfusão sanguínea ainda é considerada a segunda principal forma de infecção, depois da vetorial. Em regiões não endêmicas e sem testes obrigatórios de detecção da doença de Chagas em bancos de sangue, as populações de imigrantes oriundos de países endêmicos tornam a transfusão sanguínea a principal forma de transmissão (apresentando casos autóctones) (Castro *et al.*, 2009; Strasen *et al.*, 2013).

As infecções da doença de Chagas também ocorrem por transplante de órgãos, acidentes de trabalho (Bonney e Engman, 2008; Júnior *et al.*, 2015) e por via congênita. Normalmente, as mães infectadas apresentam patologia crônica e sem sintomatologia, entretanto, há risco elevado de parto prematuro ou feto natimorto (Howard *et al.*, 2013).

Atualmente, a infecção por via oral é considerada um modo de transmissão importante em diversas regiões endêmicas do Brasil, com relatos de surtos de patologia aguda severa pela ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados, como o açaí e o caldo de cana-de-açúcar. Nesses surtos, acredita-se que fezes de triatomíneos contaminadas ou insetos infectados com o *T. cruzi* foram triturados juntamente com os alimentos (Yoshida *et al.*, 2008). No Brasil, entre os anos de 2000 e 2011, foram relatados 1.252 casos agudos de infecções pelo *T. cruzi* e desses, 70% foram atribuídos à transmissão oral (Domingues *et al.*, 2015). Duas microepidemias, ocorridas no nordeste do Brasil, foram causadas pelo consumo de alimentos contaminados com o parasito. Doze dos 13 indivíduos infectados nesses surtos desenvolveram sintomatologia como febre e dispnéia, cinco também desenvolveram insuficiência cardíaca congestiva e dois foram a óbito em decorrência da doença. Esses fatos demonstram que a infecção por via oral pode apresentar sintomas mais exacerbados na fase aguda, diferente do que acontece nas outras vias de transmissão (Bonney e Engman, 2015).

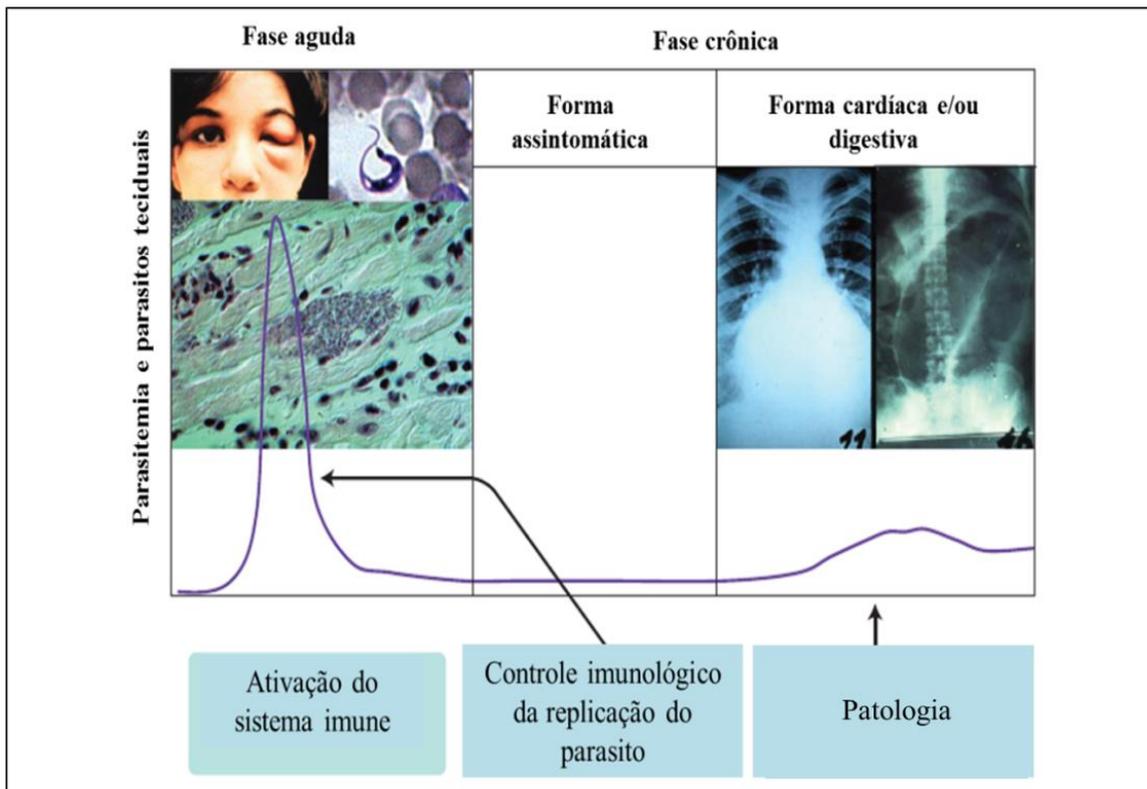
A possibilidade da transmissão sexual do *T. cruzi* tem sido discutida. Apesar desse modelo de transmissão ter sido sugerido há bastante tempo, ela ainda é pouco estudada. Um dos primeiros indícios da transmissão sexual foi a observação de ninhos de amastigotas em células de gonioblastos de túbulos seminíferos dos testículos e em células da teca de ovários de crianças com poucos meses de vida (Teixeira *et al.*, 1970). Um estudo realizado em camundongos demonstrou a presença de DNA nuclear do parasito no sangue de animais previamente saudáveis que foram acasalados com animais infectados em fase aguda (Silva, 2013). Outro estudo evidenciou a transmissão sexual do *T. cruzi* através do acasalamento de camundongos com a doença de Chagas experimental crônica com animais saudáveis. Neste caso a infecção pelo *T. cruzi* foi comprovada por testes sorológicos e moleculares no sangue e tecidos (Ribeiro *et al.*, 2016).

Infecções pelo protozoário culminando na doença de Chagas também podem ser adquiridas por outras formas, como transplante de órgãos e acidentes de trabalho (Bonney e Engman, 2008; Júnior *et al.*, 2015).

## 1.5 Manifestações clínicas

A doença de Chagas apresenta duas fases bem definidas com manifestações clínicas distintas: fase aguda e fase crônica. A maior parte dos indivíduos infectados pode permanecer assintomática ao longo da vida, dificultando o diagnóstico. A fase aguda se inicia entre seis a dez dias após o contato do indivíduo com o *T. cruzi* e dura aproximadamente dois meses. O paciente sintomático na fase aguda pode apresentar mal-estar, febre, mialgia e sonolência excessiva. Alguns indivíduos apresentam o chagoma de inoculação ou sinal de Romanã, sinalizando a porta de entrada do protozoário. Entretanto, em 95% dos casos essa fase é assintomática e passa despercebida (Junqueira *et al.*, 2010). No início da infecção os altos níveis de parasitemia sanguínea são evidentes (Barrett *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2006a).

A partir de oito semanas os indivíduos entram na fase crônica da doença. Cerca de 70 a 85% dos pacientes ficam assintomáticos na fase crônica, podendo permanecer na forma indeterminada da doença de Chagas, sem apresentar sintomatologia, durante toda a vida. Entretanto, um terço dos indivíduos podem desenvolver sinais clínicos da doença décadas após a infecção. Danos teciduais ocorrem entre 20 a 30% dos pacientes com doença de Chagas principalmente por alterações cardíacas e digestivas (Duarte *et al.*, 2014). Em 94,5% dos casos ocorrerão lesões graves no coração e 4,5% dos pacientes desenvolvem megacólon e megaesôfago, também conhecido como síndrome dos megas. A cardiomiopatia chagásica causa insuficiência cardíaca onde 58% dos pacientes com essas complicações vão a óbito e as arritmias cardíacas têm sido associadas com morte súbita em 36,5% dos pacientes (Teixeira *et al.*, 2006b). Diferentemente da fase aguda, que é caracterizada pelas altas taxas de parasitos no sangue periférico, na fase crônica a parasitemia sanguínea é quase nula (**Figura 4**). Na fase crônica é possível a demonstração dos parasitos por ninhos de amastigotas nos tecidos em 10 a 20% dos pacientes infectados (Teixeira *et al.*, 2006a; Barrett *et al.*, 2003).



**Figura 4. Curso natural da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.** A figura ilustra as fases da doença de Chagas. Primeiramente ocorre a fase aguda, normalmente assintomática, associada com alta parasitemia sanguínea, parasitos nos tecidos e ativação do sistema imunitário. Ilustrada no canto superior esquerdo por uma criança com o sinal de Romaña e formas amastigotas nos tecidos. Na fase crônica existe a forma indeterminada, onde a parasitemia sanguínea é baixa, a maioria dos pacientes são assintomáticos, apresentam inflamação local e escasso parasitismo nos tecidos afetados. Porém, 20 a 30% podem desenvolver sintomas. A fase crônica sintomática está representada no canto superior direito, mostrando as formas cardíacas e digestivas (Adaptado de Junqueira *et al.*, 2010).

## 2. AGENTE ETIOLÓGICO

### 2.1 O *Trypanosoma cruzi*

O protozoário *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Apresenta-se como um hemoflagelado com uma grande mitocôndria única, diferenciada, denominada cinetoplasto, que concentra uma grande quantidade de DNA circular (kDNA) organizado em redes concatenadas. Esse protozoário, quando em contato com o hospedeiro vertebrado, é intracelular ou se apresenta na forma tripomastigota (Devera *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2007).

Os diferentes genótipos de *T. cruzi* podem ser distinguidas em sete Unidades Discretas de Tipificação (DTUs, do inglês, *discrete typing units*) nomeados como TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e Tcbat (Zingales *et al.*, 2012; Shender *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2016). Vários autores afirmam que a distinção das cepas influencia no tecido de predileção da infecção sintomática, ou seja, diferentes genótipos de *T. cruzi* apresentam distribuição preferencial em determinados tecidos. Assim, a forma clínica da doença é influenciada pela variabilidade gênica do parasito. A diferenciação dos genótipos marcados pelos DTUs pode ser um fator importante para a melhor compreensão da doença em países não endêmicos. Estudos demonstram que a distribuição das DTUs na população imigrante parece ser semelhante à observada nos países de origem dos mesmos (Devera *et al.*, 2003; Perez-Molina *et al.*, 2014).

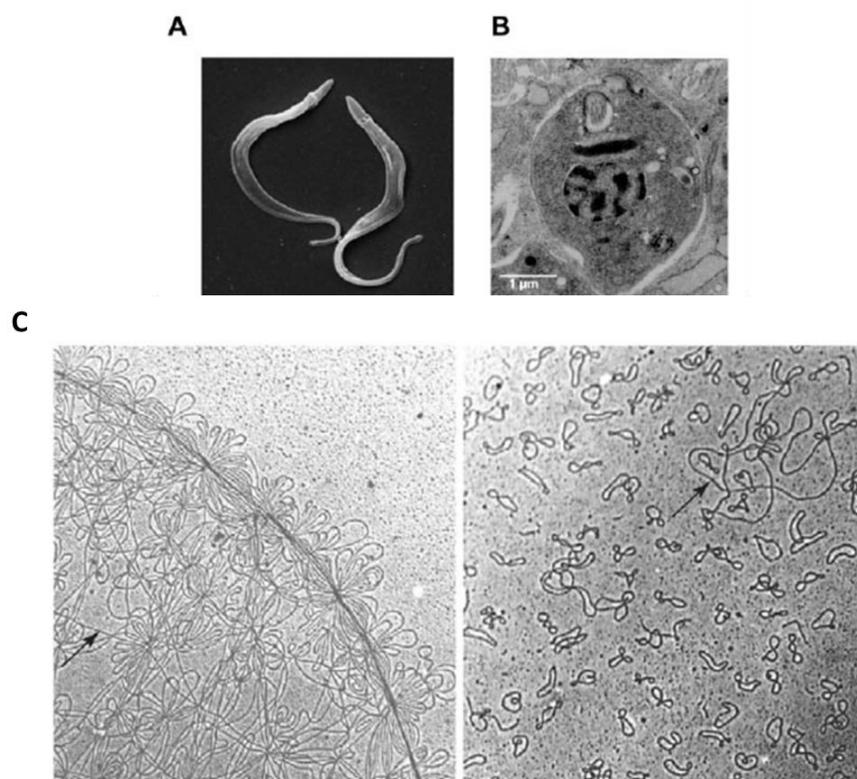
### **2.1.1 Organização e estrutura do DNA nuclear**

O genoma do *T. cruzi* apresenta aproximadamente 60,3 Mpb e seu DNA total tem tamanho de aproximadamente 125 a 280 fg/célula (Teixeira *et al.*, 2011a). Os genes são organizados em blocos e regiões entre os agrupamentos de genes direcionais (AGDs), também chamadas de regiões de desvio em cadeia (SSRs, do inglês, *strand switch regions*). As diferenças de tamanhos e dos números de cromossomos podem variar devido às inserções, duplicações e deleções durante o processo de replicação. Em epimastigotas e amastigotas (ver item 1.3 Ciclo de Vida) o núcleo é esférico e contém um grande nucléolo e pequenas quantidades de heterocromatina. Em contrapartida, em tripomastigotas (ver item 1.3 Ciclo de Vida) o núcleo é alongado, o nucléolo desaparece e a heterocromatina é encontrada dispersa por todo o nucleoplasma (Elias *et al.*, 2002).

### **2.1.2 Organização e estrutura do DNA do cinetoplasto**

O DNA do cinetoplasto (kDNA) do *T. cruzi* está localizado adjacente ao corpo basal do flagelo e possui um arranjo de DNA que concentra entre 20 e 25% do DNA total do parasito (Souza, 2003). O kDNA apresenta arquitetura complexa, composta por

maxi e minicírculos organizados em rede concatenada e condensada (Simpson *et al.*, 1973), como observado na **Figura 5**.

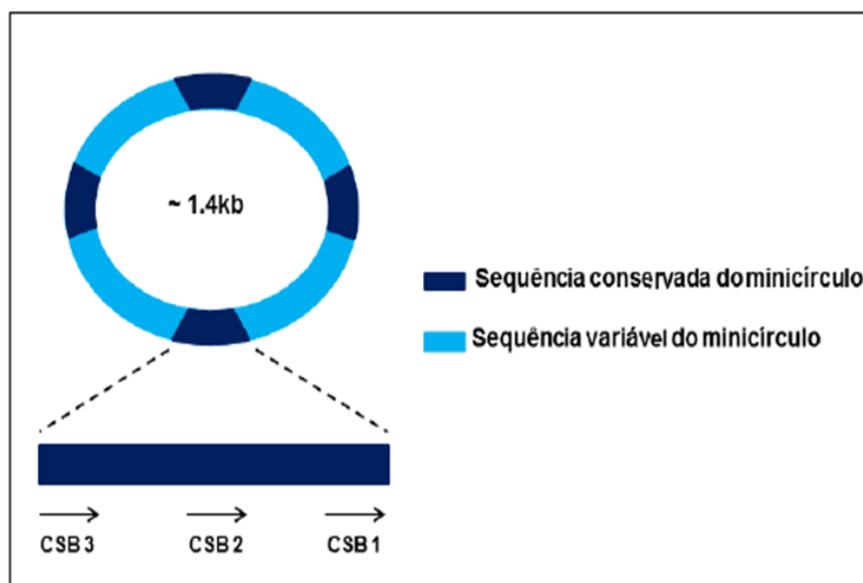


**Figura 5.** Ultraestrutura do *Trypanosoma cruzi* e micrografia eletrônica do kDNA de *Crithidia fasciculata*. **A)** Microscopia de varredura de tripomastigota de *T. cruzi* (Adaptado de Menna-Barreto *et al.*, 2009). **B)** Microscopia eletrônica de amastigota de *T. cruzi* dentro da célula muscular. (Adaptado de Teixeira *et al.*, 2011b). **C)** A figura da esquerda mostra os minicírculos e maxicírculos de kDNA de *Crithidia fasciculata*. À direita vê-se o kDNA tratado com Topoisomerase II deixando os mini e maxicírculos separados, evidenciando a discrepância e tamanho entre ambos. A seta indica um maxicírculo (Adaptado de Liu *et al.*, 2005).

A rede de kDNA apresenta cerca de 20 mil minicírculos e dezenas de maxicírculos. Os maxicírculos são macromoléculas de tamanho aproximado entre 20 a 40 kb. Sua sequência apresenta modificações entre cada linhagem de *T. cruzi* e diferentes espécies de tripanossomatídeos (Westenberger *et al.*, 2006). Comparando os maxicírculos ao DNA mitocondrial de outros mamíferos pode-se evidenciar semelhanças. Ambos possuem sequências codificadoras para RNAs ribossômicos (rRNAs) e genes que codificam proteínas responsáveis pela produção de energia (proteínas do complexo respiratório) (Leon *et al.*, 1980; Affranchino *et al.*, 1986; Simpson *et al.*, 1987; Torri *et al.*, 1996). Os minicírculos codificam os RNAs guias

(gRNAs) responsáveis pela editoração dos transcritos dos maxicírculos. Trechos variáveis de resíduos de uridinas são inseridos ou deletados em sítios específicos da maioria dos transcritos, formando novas fases de leitura aberta (ORFs, do inglês *Open Region Frames*) (Lukes *et al.*, 2002; Westenberger *et al.*, 2006; Souza, 2009).

Os minicírculos de kDNA do *T. cruzi* estão presentes em milhares de cópias concatenadas com tamanho de 1,4 quilobase (kb) aproximadamente. Eles possuem uma estrutura molecular contendo quatro regiões de DNA conservado de 122 pb localizado a uma distância de 90° intercalando-se com quatro regiões de DNA variável de tamanho aproximado de 238 pb. A presença de três regiões com sequências constantes entre os minicírculos estão presentes nas regiões conservadas (Ray *et al.*, 1989) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Esquema representando um minicírculo de kDNA. Ele apresenta quatro regiões conservadas, em azul escuro, intercaladas com quatro regiões variáveis, em azul claro. Em destaque está a localização dos blocos de sequências conservadas (CSBs, do inglês *constant sequence blocks*), que se apresentam sempre na mesma ordem (Adaptado de Britto, 2013).

O processo de replicação do minicírculo de kDNA é unidirecional, sendo iniciada na região conservada dos blocos de sequências conservadas (CBS, do inglês, *conserved sequence blocks*) de número três (CBS 3). Entretanto, para esse processo acontecer é necessário o desprendimento da rede entrelaçada dos anéis pela ação da enzima Topoisomerase II. Os minicírculos desprendidos se encaminham para região entre o disco de kDNA e a membrana do cinetoplasto (Liu e Englund, 2007). A proteína de ligação em combinação com a DNA primase e os DNA e RNA polimerases, se ligam

ao sítio da replicação, onde se inicia a duplicação (Lukes *et al.*, 2005; Liu e Englund, 2007). Os maxicírculos também possuem replicação unidirecional, mas não necessitam do desprendimento dos anéis e o sítio de iniciação da replicação está localizado na região variável e não codificadora (Liu *et al.*, 2005; Klingbeil *et al.*, 2001).

### **3. PATOGÊNESE DA DOENÇA DE CHAGAS**

Os mecanismos responsáveis pela patogênese da doença de Chagas ainda não foram bem esclarecidos. Existem duas teorias principais para explicar os danos teciduais causados pela presença do *T. cruzi* no indivíduo infectado (Teixeira *et al.*, 2006). A primeira é a persistência do parasito no organismo do chagásico crônico. A segunda é a autoimunidade, onde ocorre a rejeição de algumas células próprias do hospedeiro, independente da infecção crítica persistente. Apesar do assunto ser amplamente discutido, a melhor forma de pensar na patogênese da doença deveria ser mesclando as teorias, tanto a persistência do parasito quanto uma possível autoimunidade. A resposta de cada indivíduo infectado depende do seu sistema imunológico, pois cada um desenvolve a doença de uma forma (indeterminada ou sintomática) e com intensidades diferentes (Bonney e Engman, 2008; Teixeira *et al.*, 2011b).

#### **3.1 Persistência do parasito**

A teoria da persistência do parasito sugere que as lesões observadas em alguns pacientes na fase crônica da doença de Chagas seriam decorrentes do processo inflamatório devido à presença de *T. cruzi*, mesmo que em baixíssimo número. A doença de Chagas seria então uma inflamação, principalmente no tecido cardíaco, causada pela presença de formas amastigotas. A divisão das formas amastigotas intracelulares produziria uma ruptura celular e a inflamação gerada seria uma resposta a grande quantidade de antígenos parasitários e aos antígenos dos tecidos lesionados (Gutierrez *et al.*, 2009; Higuchi *et al.*, 2003).

O fato dos ninhos de amastigotas de *T. cruzi* serem encontrados em vários tecidos do hospedeiro na fase aguda da doença e em alguns indivíduos crônicos sintomáticos, reforça a idéia de que o parasito seja o responsável pela destruição dos tecidos (Sousa, 2012). Com isso, estratégias de evasão do parasito seriam de suma importância para o desenvolvimento ou não das diferentes formas clínicas no indivíduo infectado. Defeitos na estratégia de evasão poderiam definir uma resposta específica e, juntamente com a qualidade da resposta imune do organismo, determinar a extensão do dano celular (Gutierrez *et al.*, 2009). O problema desta teoria é que ela não explica porque na fase aguda, com alta parasitemia, os indivíduos raramente vão a óbito. Além disso, a dificuldade em se encontrar parasitos nos locais das lesões em pacientes crônicos também enfraquece essa teoria. Assim, outras hipóteses surgiram para tentar explicar a patogênese da doença de Chagas, uma vez que a patologia se desenvolve mesmo com a ausência de parasitos ou com baixa carga parasitária (Teixeira *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2011b).

### **3.2 Autoimunidade**

A teoria da autoimunidade sugere que a patogênese da doença gerada pelo *T. cruzi* esteja diretamente relacionada com a rejeição das células próprias do tecido do hospedeiro pelo seu sistema imunitário (Santos-Buch e Teixeira, 1974; Cunha-Neto *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 2011a). Essa teoria surgiu na década de 1990, quando foi demonstrado que resposta imune efetora contra proteínas do *T. cruzi*, reconhecem proteínas humanas como as miosinas cardíacas (Cunha-Neto *et al.*, 2006; Pereira, 2015), mediante mimetismo molecular. Esse mimetismo induziria a reação cruzada dos antígenos parasitários com as células imunes do indivíduo, levando a rejeição de células do tecido cardíaco na fase crônica do paciente chagásico (Cunha- Neto *et al.*, 1996, Leon e Engman, 2001).

Outro mecanismo de autoimunidade que pode estar implicado na patogênese da doença de Chagas é a ativação *bystander*, onde danos mecânicos gerados pelo *T. cruzi*, seguido por respostas imunitárias não específicas, poderiam resultar na liberação de muitos antígenos próprios em local rico em mediadores inflamatórios (Bonney e Engman, 2015). Estudos sugerem a possibilidade de dois mecanismos gerarem a

autoimunidade: mecanismos de citotoxicidade dependentes de anticorpos e ativação de células T autoreativas (Boney e Engman, 2008).

A genética do parasito e do hospedeiro estão diretamente relacionadas com a intensidade da ocorrência de mecanismos autoimunes. Há indivíduos que não desenvolvem a doença mesmo apresentando a infecção pelo *T. cruzi*. Alguns genes demonstram a cooperação no mecanismo da susceptibilidade ou resistência autoimune gerada pelo *T. cruzi* (Leon e Engman, 2001). Teixeira *et al.*, (2006b) observou em animais tratados com nitroderivados tripanocidas que as fibras cardíacas continuavam sendo rejeitadas por células efectoras do sistema imune da mesma forma que ocorria em animais não tratados. Isso reforçou a ideia da autoimunidade na doença de Chagas.

Outra hipótese para explicar a autoimunidade induzida pelo *T. cruzi* são as mutações resultantes da integração de sequências de minicírculos de kDNA do parasito no genoma do hospedeiro (Teixeira *et al.*, 2006b). Estudos realizados em aves e em mamíferos mostram que partes das sequências de minicírculos de kDNA integram em vários cromossomos dessas espécies (Nitz *et al.*, 2004; Simões-Barbosa *et al.*, 2006b; Hecht *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2011). Fato muito interessante descrito no modelo em aves (*Gallus gallus*), pois elas são refratárias para a infecção pelo *T. cruzi*, conseguindo eliminar os parasitos rapidamente através da resposta imune inata. Isso evidencia que realmente os fragmentos de kDNA encontrados são obtidos pela transferência de material genético entre as espécies (Teixeira *et al.*, 2011). Esse modelo eliminaria a persistência do parasito como causa para a patogênese da doença e reforça o papel do parasito na autoimunidade (Simões-Barbosa *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2006a; Teixeira *et al.*, 2011).

De interesse, foi mostrado que a progênie do hospedeiro infectado pode adquirir as sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* que serão integradas em seu genoma, através do mecanismo conhecido como transferência gênica vertical (TGV), que acontece via células germinativas que contém as mutações. Desta forma, integrações podem ser encontradas em organismos não infectados com o *T. cruzi*. Sabe-se que são partes das regiões variáveis dos minicírculos que integram no genoma do hospedeiro. Segmentos de minicírculos de kDNA do parasito foram encontrados frequentemente integrados em retrotransposons LINE-1 (do inglês *long interspersed element-1* ou elementos com sequências repetitivas longas) (Nitz *et al.*, 2004; Simões-Barbosa *et al.*, 2006; Sousa, 2012; Hecht *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2011).

Desta forma, através do mecanismo de TGV, o kDNA do *T. cruzi* que foi integrado em um indivíduo contaminado pelo parasito pode ser transmitido para sua progênie via células germinativas que contém as mutações (Simões-Barbosa *et al.*, 2006). Pela TGV essas mutações poderiam ser passadas para as gerações seguintes com o passar do tempo. Desta forma, integrações de sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* podem ser encontradas em indivíduos sem infecção ativa e sem contato prévio com o parasito. A inserção de material genético do *T. cruzi* no homem sugere a remodelagem do genoma. Isso pode resultar no surgimento de novas proteínas, na alteração da expressão gênica ou ainda no silenciamento de genes.

O estudo da autoimunidade induzida pelo *T. cruzi* serve para ampliação do conhecimento da patogênese da doença de Chagas e também para compreender melhor outras doenças infecciosas com componentes autoimunes semelhantes, buscando, assim, o desenvolvimento de possíveis tratamentos para estas patologias (Bonney e Engman, 2015).

#### **4. TRATAMENTO**

Os quimioterápicos usados para erradicar o parasito do organismo infectado são antigos e tóxicos para o paciente. Dentre eles, estão o Nifurtimox e o Benzonidazol (Teixeira *et al.*, 2006b). No Brasil, a única droga produzida para o tratamento dos pacientes é o Benzonidazol. Entretanto, o efeito desse medicamento no tratamento da doença depende da fase infectiva. Ele parece ter papel na diminuição da parasitemia na fase aguda, mas não apresenta benefício na progressão da lesão chagásica, sendo somente uma droga de nitroderivados com efeito anti-tripanosoma (WHO, 2012; Lauria-Pires *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2013).

Para um tratamento mais efetivo seria necessário conhecer mais profundamente os mecanismos envolvidos na resistência a medicamentos do *T. cruzi* e elucidar novos alvos para as drogas (Cuervo *et al.*, 2010). Com isso, o controle da infecção de Chagas caminha juntamente com os programas de controles de vetores, controle dos bancos de sangue e a descoberta de diagnósticos mais precisos. Além disso, há a necessidade de medidas de controles intensas em zonas nas quais as taxas de mortalidade e morbidade são altas (Martins-Melo *et al.*, 2016).

## 5. DIAGNÓSTICO

Existem diferentes técnicas utilizadas para a detecção do *T. cruzi*. Elas podem ser divididas em parasitológicas, sorológicas e moleculares. Entretanto, como a doença de Chagas apresenta um momento com elevada parasitemia e outro onde a presença de parasito é pouco perceptível no sangue periférico (fase aguda e crônica, respectivamente), o método de escolha para o diagnóstico deve levar em consideração a fase da patologia em que o paciente se encontra. Os testes mais utilizados para o diagnóstico do *T. cruzi*, em laboratórios de análises clínicas, são os imunológicos, realizados por meio de exames sorológicos indiretos (WHO, 2012). Entretanto, não existe um teste padrão-ouro para a detecção do parasito. Os estudos divergem bastante em relação a sensibilidade e especificidade dos diferentes métodos de diagnóstico. (WHO, 2012).

A padronização e validação de um método de diagnóstico específico para a doença de Chagas é fundamental. Um diagnóstico precoce e altamente sensível pode possibilitar uma melhor qualidade de vida para o indivíduo com a doença, antecipando seu tratamento na fase aguda com drogas tripanocidas e, na fase crônica, com medicações relacionadas às possíveis sintomatologias apresentadas. Além disso, os testes diagnósticos da infecção pelo *T. cruzi* podem ser usados durante estudos epidemiológicos, vigilância da transmissão vetorial, triagem em bancos de sangue e rastreamento de indivíduos infectados (WHO, 2012). O diagnóstico correto não é só uma prioridade para identificar os pacientes com infecção ativa, para que eles recebam o tratamento mais adequado, mas torna-se de suma importância para diminuir e prevenir o risco de transmissão da doença através de transfusão de sangue, transplante de órgãos (Duarte *et al.*, 2014) e até mesmo via sexual (Dias e Amato Neto, 2011; Ribeiro *et al.*, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde (2005a) a confirmação do diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve ser realizada utilizando pelo menos dois métodos sorológicos diferentes combinados e os resultados de ambos não podem ser divergentes. Isso porque somente uma técnica não é considerada suficientemente sensível e específica para o diagnóstico, pois podem apresentar reações cruzadas com outros organismos filogeneticamente semelhantes

(Duarte *et al.*, 2014). Entretanto, essa estratégia tem levado ao aumento dos resultados inconclusivos, o que dificulta o manejo clínico desses indivíduos, pois em alguns casos um teste sorológico mostra-se positivo e outro negativo.

O xenodiagnóstico, o microhematocrito e a hemocultura são utilizados para detectar a infecção na fase crônica, pois dependem da visualização do parasito nas fezes do triatomíneo ou no sangue, respectivamente. Entretanto, outros testes são mais indicados para o diagnóstico na fase crônica, como os moleculares, devido ao baixo número de parasitos circulantes. Recentemente, os métodos moleculares vêm sendo bastante utilizados para complementar o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*.

### **5.1 Diagnóstico parasitológico**

O diagnóstico parasitológico da doença de Chagas é baseado na demonstração de parasitos em tecidos e no sangue de indivíduos infectados. Esse tipo de diagnóstico é interessante durante a fase aguda, onde é possível detectar, através da observação em microscópio óptico, formas tripomastigotas do parasito em amostras de sangue. Nessa fase da doença os indivíduos infectados apresentam alta carga parasitária durante aproximadamente dois meses, podendo, nesse período, se observar os parasitos no sangue. As técnicas parasitológicas diretas mais utilizadas são o exame a fresco do sangue, a gota espessa e os métodos de concentração do parasito. (Brenner *et al.*, 2000; Murcia *et al.*, 2013).

Os testes parasitológicos indiretos são apropriados para a fase crônica da doença, devido ao baixo número de parasitos circulantes no sangue periférico. Os métodos mais usados são o xenodiagnóstico, a hemocultura e, eventualmente, a inoculação em animais de laboratório (Dias e Coura, 1997; Coura *et al.*, 2012). Esses testes são eficazes no diagnóstico de apenas cerca de 50% dos pacientes na fase crônica da doença de Chagas (Bronfen *et al.*, 1989; Dias e Coura, 1997; Galvão *et al.*, 1993).

## 5.2 Diagnóstico sorológico

Os métodos sorológicos são baseados na identificação de anticorpos específicos anti-*T. cruzi*. Com esses métodos é possível identificar indivíduos em qualquer fase da doença de Chagas e caracterizar em que estágio da doença eles se encontram. (Dias e Coura, 1997). A fase aguda é caracterizada por apresentar altas taxas de anticorpos IgM anti-*T. cruzi*. Contudo, pode haver um período de latência para o início da produção desses anticorpos (Dias e Coura, 1997). Na fase crônica existe a produção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. Existem três testes indiretos convencionais amplamente utilizados para o imunodiagnóstico: imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HI) e o teste imunoenzimático ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) (WHO, 2012). Grande parte das técnicas sorológicas usam lisados brutos do parasito para identificação como antígeno. Porém, as proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos aumentam a especificidade dos testes sorológicos (Meira *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2001).

Segundo a OMS (2012) a maioria dos testes disponíveis comercialmente apresentam 94 a 99,5% de sensibilidade e 94 a 96% de especificidade (**Tabela 1**). Esta informação está de acordo com a revisão sistemática de Granjon *et al.* (2016) cujos resultados indicam que o teste de ELISA comercial têm sensibilidade de aproximadamente 99,3% e especificidade de 97,5%. Porém, resultados duvidosos, falso-negativos ou falso-positivos devido à reações cruzadas com antígenos de outros microorganismos podem ocorrer (Amato-Neto *et al.*, 2009; Gadelha *et al.*, 2003; Granjon *et al.*, 2016). Os resultados inconclusivos e aqueles que apresentam reatividade baixa podem apresentar problemas na triagem de doadores em bancos de sangue e nas taxas de prevalência para a vigilância epidemiológica (Granjon *et al.*, 2016).

O diagnóstico sorológico da doença de Chagas e sua interpretação são complexos. Com isso, Granjon *et al.* (2016) desenvolveram uma matriz de proteína à base de ELISA multiplex para a confirmação da doença, mostrando ser uma técnica inovadora para diagnóstico confirmatório. Essa técnica utiliza 12 antígenos distintos apresentados sobre uma placa de 96 poços, permitindo uma melhor conclusão do estado de infecção do paciente. Isso mostra que a aplicação de novas técnicas é fundamental para a melhoria do diagnóstico da doença de Chagas.

### 5.3 Uso da biologia molecular

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) consiste na amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos. A biologia molecular, através da PCR, vem sendo utilizada no diagnóstico de diversas doenças, pois permite detectar pequenas quantidades de DNA do agente etiológico de determinada infecção em diversos tipos de amostras biológicas, como por exemplo, o sangue. Recentemente, os métodos moleculares vêm sendo bastante utilizados para complementar o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, devido as limitações de sensibilidade e especificidade dos métodos parasitológicos e sorológicos. Até o presente momento, há uma padronização da técnica de cPCR para a doença de Chagas. Entretanto, não existe uma validação dessa técnica, fazendo com que apresente níveis altamente variáveis de sensibilidade devido ao protocolo utilizado. Isso ocorre devido às variações no volume e concentração das amostras, aos métodos utilizados para a extração do DNA, aos iniciadores selecionados, ao tipo e qualidade dos reagentes, às condições dos ciclos térmicos, entre outros (Schijman *et al.*, 2011; Gilber *et al.*, 2013).

A PCR é mais sensível que os métodos parasitológicos e pode ser introduzida como método auxiliar para o diagnóstico da doença em pacientes com sorologia inconclusiva (Kirchhoff *et al.*, 1996; Gilber *et al.*, 2013). De fato, alguns estudos demonstram que a sensibilidade da PCR é superior em relação ao xenodiagnóstico e à hemocultura (Martínez *et al.*, 2013). Contudo, a relação de sensibilidade e especificidade em resultados sorológicos e moleculares é muito controversa, como demonstrado na **Tabela 1**. Isso ocorre porque a PCR apresenta níveis variáveis de sensibilidade em função do protocolo utilizado (Schijman e col, 2011). Em relação aos métodos sorológicos, eles apresentam reações cruzadas com outros organismos filogeneticamente semelhantes ao *T. cruzi* (Hoare, 1972). O desenvolvimento e a padronização de testes sorológicos de alta sensibilidade e especificidade para um diagnóstico preciso é um desafio (Paul, 1989). Assim, o desenvolvimento de técnicas de PCR para a detecção específica do DNA do *T. cruzi* é uma boa alternativa.

**Tabela 1. Comparação entre sensibilidade e especificidade nos métodos diagnósticos parasitários, moleculares e sorológicos para a doença de Chagas.**

Doença	Fonte	Demonstração parasitária		Detecção do DNA do parasito			Sorologia		
		Sensibilidade	Especificidade	Teste	Sensibilidade	Especificidade	Teste	Sensibilidade	Especificidade
Doença de Chagas	Sangue	>70% dos esfregaços realizados 15-30 dias após início dos sintomas (fase aguda)	~ 100%	PCR RT-PCR	~60% (em crianças)	Se feito corretamente, pode ser ~ 100%	HAI, IFI, ELISA, em fase crônica	94%-99,5% (kit-diferenças dependentes)	94-96% (kit-diferenças dependentes)

Adaptado de WHO (2012).

A utilização da PCR na rotina em análises clínicas e em bancos de sangue de lugares endêmicos e não endêmicos, auxiliando na triagem de doadores, para eliminar a ocorrência de resultados sorológicos falso-negativos, seria uma forma de minimizar a proliferação da doença de Chagas. Contudo, o alto custo e a procura pelas análises por esse método ainda limitam essa inserção. Devido a essas limitações, a PCR é mais utilizada em pesquisas científicas. Porém, essa realidade está sendo modificada. Nos bancos de sangue de áreas endêmicas os indivíduos assintomáticos da doença de Chagas com sorologia positiva e doadores com sorologia inconclusiva são muitas vezes identificados através da PCR (Gilber *et al.*, 2013; Granjon *et al.*, 2016).

Atualmente não existe um método padrão-ouro para o diagnóstico das infecções pelo *T. cruzi*. Os testes sorológicos são mais usualmente empregados em laboratórios de rotina, principalmente pelo fácil acesso e utilização de kits comerciais. Para fins de diagnóstico são necessários resultados concordantes em pelo menos dois testes imunológicos (OMS, 2005a). Isso acontece, pois nos métodos sorológicos podem ocorrer resultados falso-positivos devido a uma reação cruzada com espécies filogeneticamente semelhantes, como por exemplo, *Leishmania* sp. (Hoare, 1972). Inúmeros estudos (Valázquez *et al.*, 2014; Llano *et al.*, 2014; Cancino-Faure *et al.*, 2015; Castro-Sesquen *et al.*, 2016) compararam as técnicas imunológicas com as moleculares na detecção do *T. cruzi* e os resultados são bastante contraditórios.

É necessária a padronização da sorologia, para um diagnóstico mais específico, ao qual não apresente falsos-positivos (Paul, 1989). Por isso, a confirmação do diagnóstico pela detecção específica do DNA do parasito pela técnica de PCR é de suma importância para validar os resultados encontrados. De fato, desde o final da década de

80, testes moleculares tem sido propostos como uma alternativa para a detecção do *T. cruzi* (Moser *et al.*, 1989; Sturm *et al.*, 1989; Wincker *et al.*, 1994). Os métodos moleculares sendo mais específicos, sem ocorrer reação cruzada, podem ser usados não somente para complementar o diagnóstico, mas também como diagnóstico principal em diversas doenças (Gilber *et al.*, 2013).

### 5.3.1 Reações de PCR e o diagnóstico da doença de Chagas

Para aprimorar ou firmar o diagnóstico da doença de Chagas podem ser realizados PCR qualitativa (PCR clássica ou convencional, cPCR) ou PCR quantitativa (PCR em tempo real, qPCR). Assim, através das técnicas de PCR é possível a identificação do parasito no fluido biológico e a estimativa da carga parasitária quando realizada a qPCR. A PCR requer quantidades muito pequenas de DNA/cDNA, trazendo grandes vantagens de diagnóstico. Entretanto, existe a necessidade de adequação dos protocolos utilizados, desde a obtenção dos ácidos nucleicos até a reação de amplificação (Schijman *et al.*, 2011; Gilber *et al.*, 2013). A PCR trouxe novas implicações para o diagnóstico da doença de Chagas, pois com essa técnica é possível identificar pacientes infectados com o *T. cruzi* com sorologia duvidosa ou não reagente ao parasito (Andersson, 2004; Duffy *et al.*, 2013, Hecht *et al.*, 2010).

A cPCR é caracterizada por ser qualitativa, ou seja, mostra a amplificação de uma banda específica de DNA/cDNA, quando a amostra é positiva, de acordo com os iniciadores escolhidos para determinado patógeno. Essa técnica necessita de métodos para a visualização do alvo amplificado, como a eletroforese. A eletroforese consiste na separação de moléculas ionizadas em função de sua carga elétrica e de seu peso molecular. Ela pode ser feita em diferentes meios de suporte, como gel de poliacrilamida ou de agarose. A escolha do gel a ser utilizado depende dos objetivos e do tamanho dos fragmentos dos ácidos nucleicos que se deseja separar (Sambrook e Russel, 2001). Outros métodos para análise do produto de cPCR podem ser usados, como o *Southern blot* com posterior hibridização com sonda específica (Moser *et al.*, 1989). Assim, as bandas geradas pela amplificação do DNA/cDNA alvo com iniciadores específicos ficam mais evidentes quando expostas a um filme, aumentando a especificidade.

Entretanto, esses diferentes métodos necessários para a análise do produto amplificado torna a cPCR mais demorada e com maior possibilidade de contaminação devido a manipulação pós-amplificação, além do manuseio de produtos tóxicos necessários para a revelação das bandas, como o brometo de etídio. A qPCR, além de qualitativa, é quantitativa. Ou seja, permite não só reconhecer os casos positivos através da amplificação de quantidades pequenas de DNA/cDNA alvo, mas também quantificar a carga parasitária (Piron *et al.*, 2007). Com isso, permite monitorar a eficácia dos esquemas terapêuticos adotados no tratamento de pacientes em diversas doenças, inclusive na doença de Chagas (Cencig *et al.*, 2012). Teoricamente, uma grande vantagem dessa técnica é a anulação da necessidade de análises posteriores, como a eletroforese e hibridização. Tornando-se uma técnica precisa, específica e muito rápida quando comparada a cPCR (Schijman *et al.*, 2011).

Existem inúmeras variantes das técnicas de cPCR e qPCR, como a PCR multiplex, a RT-PCR (RT, do inglês, *reverse transcriptase*) e a *Nested-PCR*. O objetivo desta última é aumentar a especificidade e a sensibilidade da PCR, realizando duas amplificações. Na *Nested-PCR* duas amplificações são realizadas com temperaturas de anelamento distintas. A primeira com iniciadores mais externos, permitindo a amplificação de uma sequência maior de DNA alvo. Em seguida, o produto da PCR é reamplificado com iniciadores mais internos. Essas duas amplificações permitem a eliminação de produtos inespecíficos que ocorrem normalmente na primeira amplificação, sendo assim uma técnica mais específica (Marcon *et al.*, 2002). A *Nested-PCR* têm sido empregada para melhorar a detecção do DNA do *T. cruzi*, em amostras de humanos (Duarte *et al.*, 2014) e animais (Santana, 2015).

Para realizar o diagnóstico molecular da doença de Chagas pode-se amplificar sequências do DNA nuclear (nDNA) ou sequências do DNA do cinetoplasto (kDNA). Moser *et al.* (1989) descreveram o uso da cPCR para detectar o *T. cruzi* no inseto vetor e em hospedeiros mamíferos usando o nDNA como molde. Nesse estudo o produto de PCR foi detectado por eletroforese com bandas visualizadas por brometo de etídio ou por hibridação com uma sonda radiomarcada. As amplificações de PCR foram realizadas em 20 pg de DNA (equivalente ao DNA em cerca de 60 parasitos). Os resultados analisados com hibridização tiveram aumento de sensibilidade em níveis de 1/200 parasitos em comparação com o brometo de etídio. Sugerindo, em 1989, a alta sensibilidade da PCR com protocolos específicos em relação a outros métodos de detecção das infecções pelo *T. cruzi*.

Devido a integração do kDNA do *T. cruzi* no genoma humano, os iniciadores de nDNA talvez sejam um alvo mais satisfatório para o diagnóstico molecular das infecções pelo *T. cruzi*, pois gera uma amplificação sem interferência da integração e mostra somente a infecção ativa (Hecht *et al.*, 2010). Vários autores já utilizam o marcador de nDNA para o diagnóstico da infecção em animais e humanos, sem a necessidade da comparação com marcadores de kDNA (Dorn *et al.*, 2012; Gilber *et al.*, 2013; Fumadó *et al.*, 2014; Ndao *et al.*, 2014). Os principais marcadores moleculares utilizados para fins diagnósticos com utilização do nDNA do *T. cruzi* normalmente amplificam uma região de microssatélite, com repetições *in tandem* caracterizando 9% da região total do parasito (Vieira *et al.*, 2003). Os mais utilizados e denominados na literatura são: TcZ1/2, TcZ3/4; TC1/2 e Cruze1/2. Cada marcador apresenta uma diferenciação na sequência de bases e interagem com uma região mais interna ou mais externa do nDNA.

Os marcadores para o diagnóstico molecular da doença de Chagas direcionados para amplificação de minicírculos de kDNA são desenhados de maneira a amplificar exclusivamente regiões conservadas ou pedaços de regiões conservadas intercaladas por região variável (Hecht *et al.*, 2010). Como o kDNA representa 20 a 25% do DNA total do parasito, seus marcadores são muito utilizados. Entretanto, sua utilização pode provocar resultados falso-positivos por evidenciar a amplificação de sequências de minicírculos de kDNA integradas no genoma do hospedeiro, ao invés do DNA do *T. cruzi* parasitando o hospedeiro. Benevides (2014) mostrou a alta frequência de resultados positivos na cPCR usando marcadores moleculares para kDNA em indivíduos sem a infecção ativa, de área considerada não endêmica para a doença de Chagas. Isso mostra que os marcadores de kDNA não são adequados para o diagnóstico das infecções pelo *T. cruzi*. Apesar disso, inúmeros trabalhos utilizam o kDNA para o diagnóstico da doença de Chagas em diversas espécies (Jiménez-Coelho *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013; Castro-Sesquen *et al.*, 2013; Cominetti *et al.*, 2013; Jaramillo *et al.*, 2014). Na literatura, os marcadores mais utilizados para amplificação do kDNA de *T. cruzi* são denominados como 121/122 e S35/S36 com regiões alvos diferentes.

Messenger (2012) utilizou dez marcadores para amplificação de maxicírculos de kDNA de *T. cruzi*. Esses marcadores podem ser uma boa opção para diagnóstico porque, até o momento, não se mostrou a ocorrência da integração de maxicírculos no genoma dos hospedeiros.

## II JUSTIFICATIVA

Com a ausência de vacinas e de drogas eficientes em todas as fases da doença, o controle e a redução da prevalência da doença de Chagas dependem de programas de prevenção das infecções pelo parasito, assim como métodos de diagnósticos mais rápidos e precisos. Ainda não existe um teste padrão-ouro para o diagnóstico e nem mesmo uma validação de algum protocolo. O desenvolvimento de técnicas com maior sensibilidade e especificidade permitirá a detecção de um número maior de pessoas infectadas, inclusive daquelas que não apresentam sintomas clínicos ou que apresentam sorologia negativa (por títulos baixos de anticorpos) ou duvidosa. Desta forma, a principal contribuição deste estudo é a análise do método de biologia molecular mais efetivo para o diagnóstico das infecções pelo *T. cruzi*. Isto permitirá a detecção precoce das infecções, assim como o esclarecimento de diagnósticos duvidosos e casos de reações cruzadas (por ser uma técnica mais específica).

Entretanto, discrepâncias também ocorrem entre os métodos moleculares. A falta de um protocolo padrão causa divergências e dificuldades em se comparar os resultados, de acordo com os iniciadores, condição do ciclo a serem selecionados, entre vários outros fatores. A PCR quantitativa (qPCR) é uma técnica relativamente recente que apresenta vantagens em relação a PCR convencional (cPCR). A grande vantagem é não precisar visualizar o produto de PCR através da eletroforese, pois é uma técnica também quantitativa, sendo possível obter a carga parasitária do indivíduo infectado. Entretanto, toda técnica apresenta uma limitação e na qPCR é o limite de detecção estabelecido para a análise. Pode ocorrer uma variação no limite de detecção de um laboratório para o outro, mesmo analisando as mesmas amostras. Com isso, a revisão sistemática com foco na qPCR e os estudos experimentais baseados nesta técnica apresentam interesse, ampliando a visão do método para o diagnóstico da doença.

### **III OBJETIVOS**

#### **1. OBJETIVO GERAL**

O objetivo principal deste estudo é analisar publicações em periódicos que utilizam a qPCR para o diagnóstico em humanos, através de uma revisão sistemática e identificar o protocolo de qPCR de maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de infecções pelo *T. cruzi*.

#### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar, através de revisão sistemática, a produção científica que utiliza a qPCR como método de detecção do *T. cruzi* em amostras biológicas humanas.
- Sintetizar os resultados da produção científica selecionada de acordo com os critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos.
- Comparar os resultados de testes moleculares realizados em amostras iguais com dois métodos diferentes de extração de DNA.
- Desenhar e testar iniciadores que permitam a amplificação de regiões de maxicírculos do *T. cruzi*.
- Definir quais pares de iniciadores são mais adequados para a detecção do *T. cruzi*.
- Comparar cPCR e qPCR.
- Comparar experimentalmente a sensibilidade de diferentes protocolos de qPCR para diagnóstico da doença de Chagas.
- Avaliar o desempenho da qPCR no diagnóstico de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*.
- Comparar as curvas de dissociação com os fragmentos de DNA visualizados no gel de agarose.

## IV MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. REVISÃO SISTEMÁTICA (RS)

#### 1.1 Tipo de estudo

Foi realizado uma revisão sistemática (RS) da literatura com o objetivo de sintetizar os resultados de pesquisas relacionadas ao uso da qPCR na doença de Chagas. Assim, foram identificados, selecionados e avaliados criticamente, de maneira descritiva, estudos relevantes publicados até março de 2016 sobre o assunto. Nas produções estudadas, o maior interesse dessa pesquisa foi a evidência da utilização de marcadores moleculares de nDNA e kDNA em estudos com humanos.

#### 1.2 A formulação da pergunta

A questão da pesquisa foi estruturada pelos componentes do acrônimo PICO (onde P é a população, I é a intervenção, C é o controle e O é o desfecho) que contém informações sobre o estudo, intervenção, comparação dos grupos estudados e desfecho da pesquisa. As estratégias foram formuladas conforme a **Tabela 2**.

**Tabela 2: Questão da pesquisa**

Uso da qPCR na detecção do <i>T. cruzi</i> em amostras de humanos	
P	Amostras de indivíduos com a doença de Chagas, tratados e não tratados, em todas as fases da patologia.
I	Uso da qPCR com marcadores moleculares para kDNA
C	Uso da qPCR com marcadores moleculares para nDNA
O	Detecção do <i>T. cruzi</i>

PICO = P é a população, I é a intervenção, C é o controle e O é o desfecho.

Com isso, os critérios de inclusão foram publicações científicas experimentais com uso da qPCR na doença de Chagas humana em língua portuguesa, espanhola,

francesa ou inglesa. Esses critérios foram definidos de acordo com as seguintes perguntas:

1. O estudo trata de qPCR aplicada à doença de Chagas?
2. O estudo usa marcadores moleculares de nDNA ou kDNA?
3. O estudo é experimental?
4. O estudo foi realizado com humanos?
5. Os trabalhos foram escritos em inglês, espanhol, francês ou português?

Os critérios de exclusão foram: estudos de revisão e estudo de caso, trabalhos não publicados (exemplo: dissertações), trabalhos sem ligação com a doença de Chagas e com diagnósticos realizados por outros métodos que excluem a qPCR, e, por fim, publicações com a metodologia da qPCR não descrita. Desta forma, os critérios de exclusão foram definidos de acordo com as seguintes perguntas:

1. A publicação é um estudo de caso ou uma revisão?
2. O trabalho foi publicado em revista científica especializada?
3. O trabalho usa a qPCR com marcadores moleculares para nDNA ou kDNA de *T. cruzi*?
4. A metodologia da qPCR foi descrita ou pode ser encontrada através da referência citada?

O tipo de intervenção ou fenômeno de interesse da revisão foi delimitado como “qPCR com marcadores moleculares específicos para a detecção do *T. cruzi*”, advindos de estudos publicados até março de 2016.

Desta forma, a pergunta norteadora da revisão foi: Quais são os marcadores moleculares mais utilizados na qPCR no estudo da doença de Chagas humana?

### **1.3 Estratégia de coleta de dados**

Foi realizada pesquisa eletrônica por periódicos indexados nas bases de dados *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE), *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO) e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). A busca de publicações científicas em fontes de informação não é normalizada e os bancos de

dados possuem instrumentos específicos. Com isso, não se utiliza a mesma estratégia de busca para todos os bancos de dados. No MEDLINE, a pesquisa foi realizada no dia 26/03/16 com os seguintes termos: “*Chagas disease* qPCR”. Os detalhes de pesquisa (*Search details*) fornecidos foram: ("chagas disease"[MeSH Terms] OR ("chagas"[All Fields] AND "disease"[All Fields]) OR "chagas disease"[All Fields]) AND ("real-time polymerase chain reaction"[MeSH Terms] OR ("real-time"[All Fields] AND "polymerase"[All Fields] AND "chain"[All Fields] AND "reaction"[All Fields]) OR "real-time polymerase chain reaction"[All Fields] OR "qpcr"[All Fields]). Com essa busca foram encontrados 114 artigos.

Os descritores “Doença de Chagas Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real” foram usados para a pesquisa na BSV, que foi realizada no dia 27/03/16. Os detalhes da pesquisa fornecidos pelo portal foram: doença de chagas reação em cadeia da polimerase em tempo real AND (collection:("06-national/BR" OR "05-specialized") OR db:("LILACS" OR "MEDLINE")). Foram encontrados 33 artigos.

No SCIELO, a busca foi realizada no dia 28/03/16 com os seguintes termos de procura: “Chagas disease qPCR”. Apenas um artigo foi encontrado.

Além disso, referências citadas nos estudos analisados foram avaliadas com o objetivo de validar outras publicações que continham os critérios de inclusão estabelecidos. A literatura “cinza” não foi incluída, ou seja, dissertações, livros didáticos, entre outros trabalhos que não são artigos científicos.

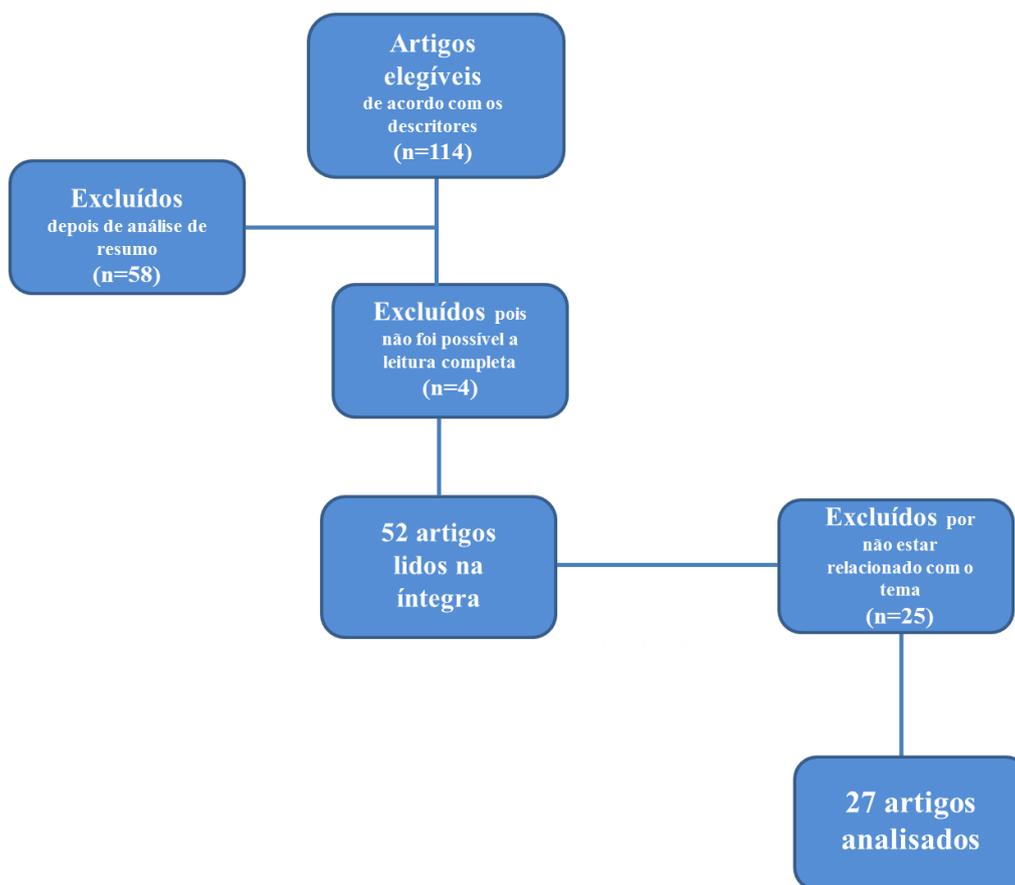
#### **1.4 Seleção de artigos e processos de extração de dados**

A coleta de dados foi realizada utilizando um instrumento de busca padronizado. Dois pesquisadores independentes fizeram a busca e seleção dos artigos, a partir dos descritores previamente estabelecidos. Os resumos que se enquadraram nos critérios de inclusão foram selecionados por ambos. Quando houve dúvida quanto à inclusão na RS de determinado artigo através da leitura do resumo, o mesmo foi lido integralmente pelos pesquisadores. Em caso de discordância entre os pesquisados sobre a inclusão ou exclusão de determinado artigo, houve uma discussão para se chegar a um consenso.

A seleção inicial dos estudos foi realizada usando um banco de dados no programa *World for Windows* para armazenar todos os artigos encontrados de acordo

com as primeiras estratégias de buscas mencionadas anteriormente. Além disso, foi criado um arquivo no programa *Excel for Windows* para organizar itens importantes para a análise, como: autor(es), títulos, ano, nome do periódico no qual o artigo foi publicado, métodos de extração do DNA, tipos de marcadores utilizados, técnica de qPCR usada, resultados principais, entre outros.

Os resultados das buscas de todas as bases foram somados. Os artigos duplicados foram removidos, restando as 114 publicações encontradas pelo MEDLINE. Em seguida, de forma independente, os pesquisadores realizaram a triagem dos artigos, descartando aqueles que não obedeciam aos critérios de inclusão. Ao final da triagem inicial e análises dos resumos, 56 artigos foram selecionados para a leitura integral. Após avaliação detalhada, 27 artigos corresponderam de forma satisfatória ao proposto pelo estudo de RS (**Figura 7**).



**Figura 7. Resultados das buscas da revisão sistemática.** Foram selecionados na busca inicial 114 artigos científicos. Após triagem dos artigos pelo título e resumos, restaram 56 artigos para leitura completa. Desses, quatro foram excluídos, pois apenas o resumo estava disponível e 25 foram eliminados por não estarem relacionados com o tema (qPCR na doença de Chagas). Assim, 27 artigos entraram na RS.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1 GRUPO AMOSTRAL**

#### **2.1.1 Amostras de *Trypanosoma cruzi***

Para avaliar o desempenho de diferentes protocolos de biologia molecular na detecção do *T. cruzi*, foram usadas amostras com concentrações variadas do parasito ( $10^6$  a  $10^4$  parasitos equivalente/mL, par. eq./mL) obtidas de culturas mantidas no Laboratório Interdisciplinar de Biociências (LabIBC) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

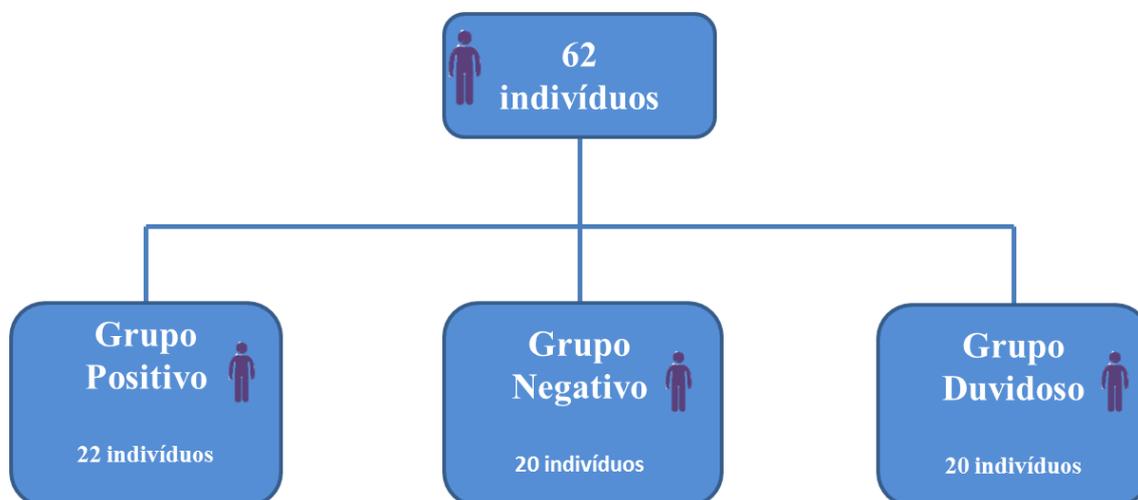
#### **2.1.2 Amostras humanas**

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília com os números de registro 378.359/2013 e 1.521.680/2016 (**ANEXO II**). Todos os indivíduos do estudo foram informados sobre os objetivos e procedimentos envolvidos na pesquisa. A participação voluntária foi confirmada após assinatura do Termo de consentimento Livre e Esclarecido (**ANEXO III**).

A população do estudo consistiu em um total de 62 indivíduos pertencentes a três grupos (**Figura 8**):

- 1) Grupo negativo: amostras de sangue que não apresentaram anticorpos anti-*T. cruzi* (n = 20). Os controles negativos foram representados por indivíduos não infectados e sem histórico epidemiológico para a doença de Chagas.
- 2) Grupo positivo: amostras de sangue com sorologia positiva para a doença de Chagas (n = 22). O diagnóstico imunológico foi considerado positivo quando apresentou resultados concordantes em pelo menos dois testes sorológicos diferentes.

- 3) Grupo duvidoso: amostras de sangue que apresentaram (i) títulos de anticorpos anti-*T.cruzi* negativos em uma técnica e positivos em outra ou (ii) resultado sorológico negativo e cPCR positiva para nDNA de *T. cruzi* (n = 20).



**Figura 8. Distribuição dos indivíduos nos grupos de estudo.** O fluxograma indica a quantidade de participantes em cada grupo: positivo, negativo e duvidoso.

Todos os membros do grupo positivo estavam na fase crônica da doença de Chagas. Em relação ao local de domicílio, todos residem no DF, tanto em regiões administrativas quanto na própria capital. O mesmo ocorre com o grupo negativo e grupo duvidoso.

## 2.2 CULTURA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT 10% (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor contendo 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina sob atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% e à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Antes da extração de DNA, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e foram diluídos com Meio *Eagle* Modificado por Dulbecco (DMEM) para a obtenção da concentração de 10<sup>8</sup> epimastigotas/mL. Os repiques foram realizados a cada 15 dias. Essas culturas foram homogeneizadas, 1 mL retirado e colocado em tubos de 15 mL, acrescidos de 4 mL de meio novo.

## **2.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO**

Primeiramente, cada voluntário do estudo foi devidamente cadastrado e identificado com um código de registro específico e individual do laboratório, ao qual somente os pesquisadores envolvidos possuem acesso. Em seguida, de cada indivíduo foi coletado de 4 a 10 mL de sangue periférico em dois tubos BD VACUETTE<sup>®</sup>, contendo 7,2 mg de ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA, do inglês, *Ethylenediaminetetraacetic Acid*) e logo após identificados com o código de registro respectivo. Nenhum sangue coletado foi conservado em guanidina.

## **2.4 EXTRAÇÃO DE DNA**

### **2.4.1 Extração do DNA do *Trypanosoma cruzi***

As formas epimastigotas do *T. cruzi* cultivadas em meio LIT foram centrifugadas a 1.500 xg por 15 minutos e o sedimento foi lavado e centrifugado duas vezes com PBS (20 mM Tris-HCl pH 7,2; 0,5 NaCl) a 1.500 xg por 15 minutos. Em seguida, foi ressuspensão em tampão de extração na concentração de  $5 \times 10^7$  células/mL de solução e mantido a 37°C. Após 1 hora de reação, foi adicionada Proteinase K na concentração final de 100 µg/mL e incubado por 12 horas a 37°C. Em seguida, foram feitas duas extrações com clorofane e uma com clorofil, respectivamente. Para a precipitação do DNA foi utilizado Etanol absoluto 100% (2,5V) gelado (4°C) e acetato de sódio 3M pH 4,7 (0,1V). Após precipitação, o DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado, e depois de totalmente seco, foi ressuspensão em tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0) e armazenado a -20 °C, conforme a descrição de Sambrook e Russel (2001).

## **2.4.2 Extração de DNA de células mononucleares do sangue periférico humano**

A extração de DNA genômico foi realizada a partir do sangue periférico dos voluntários do estudo. Três protocolos de extração de DNA foram utilizados: extração orgânica manual com fenol-clorofórmio, com o kit comercial com coluna com membrana de sílica *Mini Spin Plus* Biopur (Biometrix) e com o kit comercial sem coluna *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). As extrações com fenol-clorofórmio seguiram a metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001). As extrações com os kits seguiram as recomendações dos fabricantes.

Todas as amostras de DNA do grupo negativo foram obtidas com o kit de extração comercial da Promega. No grupo positivo, 12 amostras foram extraídas somente com o kit da Promega e 10 amostras tiveram o DNA extraído por dois métodos diferentes: kit comercial da Promega e kit comercial da Biopur. Isso foi feito objetivando a comparação dos resultados de testes moleculares realizados com DNA do mesmo indivíduo obtido a partir de dois métodos de extração diferentes. Em relação ao grupo duvidoso, 13 amostras de DNA foram obtidas com o kit comercial da Promega e sete através da extração com fenol-clorofórmio. Isso aconteceu, pois as sete amostras extraídas manualmente (sem kit) também foram utilizadas em outro estudo que demandava esse procedimento. Como o sangue que serviu para a obtenção do DNA com fenol-clorofórmio não passou por uma segunda extração, o método manual não será comparado aos outros.

### **2.4.2.1 Extração com o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit***

Neste protocolo de extração com o kit da Promega, 10 mL de sangue foram usados. A esse volume foi acrescentado 30 mL de solução de lise para células vermelhas, incubado em temperatura ambiente (TA) por 10 minutos e centrifugado a  $2.000 \times g$  por 10 minutos. Depois de descartar o sobrenadante, o sedimento restante foi ressuspenso e em seguida adicionado 10 mL do tampão de lise nuclear. A enzima RNase foi acrescentada nesta etapa com uma concentração final de  $20 \mu g/mL$ . O material foi incubado a temperatura de  $37^{\circ}C$  por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 3,3 mL de tampão de precipitação de proteína, homogeneizado em vórtex por 20 segundos e centrifugado a  $2.000 \times g$  por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril de 50 mL. Para precipitação do DNA, foi

acrescentado 10 mL de isopropanol à TA. A amostra foi centrifugada a 2.000 ×g por 1 minuto e o sobrenadante descartado. A lavagem do sedimento de DNA foi realizada com 10 mL de Etanol 70% gelado. Centrifugado a 2.000 ×g por 1 minuto e, em seguida, o etanol foi aspirado e o precipitado acondicionado durante 24 horas em capela de fluxo para evaporação do álcool. O DNA foi ressuspense com 800 µl de solução de rehidratação e mantido à temperatura de 4°C, por 24 horas. Por fim, a amostra foi armazenada a -20 °C até o momento de sua utilização.

Do total de 20 membros do grupo duvidoso, 10 deles tiveram o DNA extraído com o kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) de acordo com o protocolo acima, porém a obtenção do material genético foi feita a partir de 1 mL de sangue periférico. Por essa razão, o volume das soluções utilizadas durante o procedimento foi alterado (3 mL de solução de lise para células vermelhas, 1 mL do tampão de lise nuclear e 330 µL de tampão de precipitação de proteína). O DNA foi ressuspense em 150 µl de solução de rehidratação.

#### **2.4.2.2 Extração com o kit *Mini Spin Plus Biopur***

A extração realizada com o kit comercial com tecnologia baseada em sílica (Biopur) seguiu as orientações do fabricante. Dez amostras de DNA do grupo positivo foram obtidas com esse kit. De maneira resumida, os seguintes passos foram realizados: 200 µL de sangue total foram transferidos para um tubo eppendorf estéril de 1,5 mL adicionando 200 µL de solução de lise e 20 µL de Proteinase K. Após incubação de 15 minutos à 56°C foi adicionado 400 µL de tampão de ligação. Em seguida, o material foi transferido para o tubo de centrifugação com membrana de sílica e incubado por 1 minuto à TA. Após centrifugação de 13.000 ×g por dois minutos, o sobrenadante foi descartado com o tubo inferior e colocado um tubo filtro de coleta. Para lavagem da membrana contendo o DNA genômico foi primeiramente adicionado 500 µL da solução de lavagem I e centrifugado a 13.000×g por um minuto. Em seguida foram adicionados 800 µL de solução de lavagem II e novamente centrifugado a 13.000 ×g por um minuto. Para garantir a total eliminação do etanol presente nas soluções de lavagem, a amostra foi centrifugada em velocidade máxima por quatro minutos. Por fim, colocou-se o tubo filtro em um tubo de eluição de 1,5 mL e o DNA foi ressuspendido em 200 µL de tampão de eluição aquecido à temperatura de 56 °C. Após incubação à TA por um

minuto e centrifugação a  $8.000 \times g$  por um minuto, o DNA foi armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização.

#### **2.4.2.3 Extração manual com fenol-clorofórmio**

As extrações do DNA de sete membros do grupo duvidoso (7/20) foram realizadas com fenol-clorofórmio. Os leucócitos foram separados por gradiente de Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus (GE Healthcare), centrifugados a 5.000 rotações por minuto (rpm) por 30 minutos à TA. A fração obtida foi lavada uma vez com Tampão de Fosfatase Salina (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) 1X pH 7,4 (3,2 mM de fosfato dissódico [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ], 0,5 mM fosfato monopotássico [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ], 1,3 mM de cloreto de potássio [ $\text{KCl}$ ] e 135 mM de cloreto de sódio [ $\text{NaCl}$ ]) a 5.000 rpm por 15 minutos à TA. O sedimento obtido foi ressuspensão em tampão de extração (1mM *Hydroxymethyl Aminomethane* – Hidroximetilaminometano [Tris] ácido clorídrico [ $\text{HCl}$ ] pH 8,0; 0,1M EDTA pH 8,0 e *Sodium Dodecyl Sulfate* - Dodecil Sulfato de Sódio [SDS] 0,5%) com proteinase K (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). O material foi incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Em seguida, o material foi passado duas vezes com igual volume de Clorofane (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 25:24:1) e uma vez com igual volume de Clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1). Após centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos à TA, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril contendo 1 mL de etanol 100% gelado ( $4^{\circ}\text{C}$ ) e acondicionado por 12 horas a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , para precipitação do DNA. Posteriormente, o DNA foi sedimentado por centrifugação a 14.000 rpm por um minuto à TA. O precipitado foi submetido a duas lavagens com etanol 70% gelado e deixado secando em capela de fluxo, por 24 horas, para completa evaporação do álcool. O DNA foi ressuspensão em 500  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-EDTA (TE) (10M Tris-HCl pH 8,0 e 1M EDTA pH 8,0) e 1  $\mu\text{L}$  de Ribonuclease (RNase) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Após incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, o DNA obtido foi armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização.

### 2.4.3 Quantificação e análise do DNA extraído

As amostras de DNA extraídas pelos métodos mencionados foram quantificadas em equipamento de espectrofotometria NanoVue Plus (GE) com 2 µL de solução de DNA. Foi observado a razão entre as absorvâncias 260/280 nm para avaliar a pureza dos ácidos nucleicos. Valores inferiores a 1.8 indicam contaminação com proteína, prejudicando o rendimento da PCR. Para verificar a integridade do DNA de todas as amostras foi realizada cPCR para amplificação do gene específico constitutivo da  $\beta$ -actina. Os produtos da cPCR foram analisados em gel de agarose a 1,3% corado com brometo de etídio (0,5mg/mL) e observação na luz UV.

## 2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE CLÁSSICA

Objetivando verificar o limite de detecção do DNA do *T. cruzi* por PCR convencional (cPCR), diferentes pares de iniciadores foram usados, assim como diferentes formas de detecção dos produtos de PCR. Para isso, diferentes concentrações de *T. cruzi* foram usadas ( $10^6$  a  $10^4$  parasitos). Em todas as reações foram incluídos controles negativos, onde não foi colocado DNA. As características de todos os iniciadores utilizados nas reações de PCR estão na **Tabela 3**. Todas as reações de cPCR foram realizadas em triplicada em termociclador modelo My Cyclor™ (BioRad). Em todas as amplificações foram utilizados controles para dar validade e confiabilidade ao experimento. Foram usados dois controles negativos: (1) branco, onde não há DNA molde e (2) amostra de humano sem infecção pelo *T. cruzi*. Os controles positivos foram amostras com infecção pelo *T. cruzi* confirmada, previamente conhecidos e armazenados no banco de dados de amostras do LabIBC.

### 2.5.1 Amplificação do DNA nuclear (nDNA) do *Trypanosoma cruzi*

Para a amplificação das diferentes concentrações de *T. cruzi*, foi primeiramente realizada cPCR com o par de iniciadores Tcz 3 e Tcz 4, que amplifica uma região de

microsatélite específica do nDNA do parasito. O fragmento amplificado possui tamanho de aproximadamente 168 pb (**Tabela 3**).

**Tabela 3. Iniciadores específicos para *Trypanosoma cruzi* utilizados nas cPCRs e qPCRs.**

Iniciador alvo	Sequência	DNA	Fragmento amplificado	T (cPCR) *	Tm (qPCR) **
<b>S36</b>	5' GGTTTCGATTGGGGTTGGTG 3'	kDNA	250 pb	60	57
<b>67R</b>	5' GA(A/C)(G/C)CCCCTCCCAAACC 3'	kDNA	250 pb	60	57
<b>S34</b>	5'ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC 3'	kDNA	122 pb	60	60
<b>S67</b>	5'GGT TTT GGG AGG GG(G/C) (G/C)(T/G)TC 3'	kDNA	122 pb	60	60
<b>ND4</b>	5' ACCGGAAATGCATGTTGAAGTAA 3'	kDNA	344 pb	59	60
<b>ND4R</b>	5' TTGTTACGAACATGAATGATGAACT 3'	kDNA	344 pb	59	60
<b>COII</b>	5' ACCTACCCGGTTCTCTACTT 3'	kDNA	228 pb	58	----
<b>COIIR</b>	5' GTAGTTTCCAATGATATTGAGTGT 3'	kDNA	228 pb	58	----
<b>TcZ 3</b>	5' TGC ACT CGG CTG ATC GTT T 3'	nDNA	168 pb	57	60
<b>TcZ 4</b>	5'-ATT CCT CCA AGC AGC GGA TA 3'	nDNA	168 pb	57	60
<b>PON 1</b>	5' TGG CTT GGA GGA GTT ATT GT 3'	nDNA	250 pb	57	----
<b>PON 2</b>	5' AGG AGT GAC GGT TGA TCA GT 3'	nDNA	250 pb	57	----

\***T**: temperatura de anelamento em °C.

\*\* **Tm**: temperatura de dissociação em °C.

Os reagentes necessários para a reação foram: tampão de reação 10X (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8.4) e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, ambos da Invitrogen; 0,2 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 Und de Taq DNA Polimerase (Invitrogen); em um volume final de 25 µl. A seguinte condição de amplificação foi utilizada: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 40 segundos, anelamento a 57°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; uma extensão final a 72°C durante 7 minutos.

Em seguida, foi usado o par de iniciadores PON 1 e PON 2 que amplificam regiões repetitivas do nDNA do *T. cruzi* com amplicons de aproximadamente 250 pb (Requena *et al.*, 1992). Os reagentes necessários para a reação foram: tampão de reação 10X (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8.4) e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, ambos da

Invitrogen; 0,2 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 Und de Taq DNA Polimerase (Invitrogen); em um volume final de 25 µl. A seguinte condição de amplificação foi utilizada: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto; uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

### **2.5.2 Amplificação do DNA do cinetoplasto (kDNA) do *Trypanosoma cruzi***

As reações de amplificações do kDNA foram realizadas utilizando quatro pares de iniciadores. Dois deles amplificam regiões dos minicírculos de kDNA do *T. cruzi* (S36/67R e S34/S67). Os outros dois pares de iniciadores foram desenhados durante o presente trabalho pelos pesquisadores envolvidos nesta dissertação de mestrado visando a amplificação de regiões dos maxicírculos de kDNA do parasito (COII/COIIR e ND4/ND4R). Esses iniciadores foram desenhados a partir daqueles usados no estudo de Messenger *et al.* (2012).

#### **2.5.2.1 Desenho dos iniciadores de maxicírculos**

O desenho dos iniciadores de maxicírculos de kDNA de *T. cruzi* foi realizado com base no artigo de Messenger *et al.*, (2012). As sequências do artigo foram analisadas através do programa de pesquisa BLASTn, disponível no site do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para verificar a similaridade com o *T. cruzi* e outras espécies. Entretanto, algumas sequências tinham similaridade com *Leishmania sp.* As sequências que tinham grande similaridade com *T. cruzi* e sem reconhecimento com espécies filogeneticamente semelhantes ao mesmo foram inicialmente selecionadas.

Posteriormente, as sequências pré-selecionadas no artigo de Messenger *et al.* (2012) foram usadas para o desenho dos pares de iniciadores que flanqueiam as regiões de maxicírculos de kDNA de *T. cruzi*. Esse desenho foi feito com o auxílio do programa Primer-BLAST, disponível no site do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os seguintes critérios foram usados: tamanho final do produto amplificado até 500 pb, que é um tamanho compatível com a cPCR e aceito na qPCR; porcentagem de citosina e guanina (CG) no intervalo de 32 a

52% e temperatura média de anelamento entre 56 e 61°C, com diferença máxima de 1°C entre os iniciadores de cada par. Assim, definimos os nomes dos marcadores específicos de ND4/ND4R e COII/ COIIR. A nomenclatura estabelecida faz referência àquela usada no artigo de Messenger *et al.* (2012).

### 2.5.2.2 Condições da amplificação do DNA do cinetoplasto (kDNA) do *T. cruzi*

Os iniciadores S36 e 67R anelam especificamente nas regiões constantes dos minicírculos de kDNA e amplificam região conservada e variável dos mesmos, gerando uma banda de aproximadamente 250 pb (**Tabela 3**). Os reagentes necessários para a reação foram: tampão de reação 10X (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8.4) e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, ambos da Invitrogen; 0,2 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 Und de Taq DNA Polimerase (Invitrogen); em um volume final de 25 µL. Foi utilizada a seguinte condição de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto; uma extensão final a 72°C de 5 minutos.

O segundo par de iniciadores são chamados de S34 e S67. Eles se anelam especificamente nas regiões conservadas dos minicírculos de kDNA e geram uma banda de aproximadamente 122 pb (**Tabela 3**). Os reagentes necessários para a reação foram: tampão de reação 10X (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8.4) e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, ambos da Invitrogen; 0,2 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 Und de Taq DNA Polimerase (Invitrogen); em um volume final de 25 µL. A seguinte condição de amplificação foi usada: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto; uma extensão final a 72°C de 5 minutos.

Os iniciadores ND4 e ND4R anelam especificamente regiões dos maxicírculos de kDNA e geram uma banda de aproximadamente 344 pb (**Tabela 3**). Os reagentes necessários para a reação foram: tampão de reação 10X (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8.4) e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, ambos da Invitrogen; 0,2 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 Und de Taq DNA Polimerase (Invitrogen); em um volume final de 25 µl. Foi utilizada a seguinte condição de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 59°C

por 1 minuto, extensão a 72°C por 45 segundos; uma extensão final a 72°C de 5 minutos.

O segundo par de iniciadores para detecção específica de regiões dos maxicírculos de kDNA foi COII e COIIR (**Tabela 3**). Eles geram uma banda de aproximadamente 228 pb. Os reagentes necessários para a reação foram: tampão de reação 10X (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8.4) e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, ambos da Invitrogen; 0,2 µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 Und de Taq DNA Polimerase (Invitrogen); em um volume final de 25 µL. A seguinte condição de amplificação foi utilizada: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 30 segundos; uma extensão final a 72 °C de 5 minutos.

### **2.5.3 Visualização dos produtos amplificados por cPCR**

Os produtos de cPCR com os diferentes marcadores de nDNA e kDNA usando como molde as diferentes concentrações de *T. cruzi* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,3% corados com brometo de etídio a 0,5 mg/mL, utilizando tampão TAE 1X (Tris acetato 90 mM pH 8,0 e EDTA 25 mM). O restante do mesmo produto de cPCR de nDNA foi aplicado em gel de poliacrilamida 6% corado com solução de prata (AgNO<sub>3</sub>) a 0,2%, utilizando tampão TBE 1X (Tris base, Ácido bórico e EDTA 0,5M). Além dos produtos de cPCR, foi aplicado nos géis, marcador de peso molecular para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA. A análise dos géis foi realizada com transluminador de luz ultravioleta acoplado em sistema de aquisição de imagem (AlphaImager Mini).

## **2.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR)**

A qPCR foi realizada para verificação da performance na detecção do *T. cruzi* em comparação com a cPCR. Para isso, foi usado amostras com diferentes

concentrações de DNA do parasito. A qPCR também permitiu a quantificação absoluta do nDNA e o kDNA do *T. cruzi* em amostras de DNA humano dos grupos positivo, negativo e duvidoso. Diferentes pares de iniciadores foram usados (**Tabela 3**). As amostras com diferentes concentrações de *T. cruzi* também permitiram a elaboração de uma curva padrão para a quantificação absoluta de DNA de *T. cruzi* em amostras de DNA humano. Em todas as reações, foram incluídos dois controles negativos, um sem DNA (branco) e o outro com DNA de indivíduo não infectado. Além disso, foram incluídos controles positivos: uma amostra de *T. cruzi* e uma amostra de indivíduo infectado (sorologia positiva em dois testes imunológicos e cPCR positiva para nDNA).

Todas as amplificações foram realizadas em duplicata em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®), em termociclador StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). Em todas as reações de qPCR utilizou-se o fluoróforo SYBR Green, que se liga à fita dupla de DNA e, com excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, gera uma fluorescência verde. Os resultados foram calculados pelo programa StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems, CA, USA), levando em conta o número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectada. Através desse programa é possível obter a curva de amplificação (em inglês, *amplification plot*) das amostras, assim como a curva de dissociação (em inglês, *melt* ou *melting curve*). A curva de amplificação ilustra a variação de fluorescência ( $\Delta R_n$ , onde o  $R_n$  é a fluorescência do corante repórter dividida pela fluorescência do corante de referência passiva) em função do número de ciclos da qPCR.

Ao final dos ciclos de amplificação da qPCR, a curva de dissociação foi gerada realizando mudanças de temperatura que permitem que as fitas duplas formadas se dissociem em fita simples, provocando uma diminuição da fluorescência. Essa curva indica o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos fragmentos de DNA de suas sequências alvo temperatura de dissociação ou, em inglês, temperatura de *melting* ou  $T_m$ ). A  $T_m$  é a temperatura onde são encontradas 50% de fita dupla de DNA e 50% de fita simples. A curva de dissociação possibilita o controle de especificidade do fragmento amplificado (fragmentos de tamanhos diferentes possuem  $T_m$  distintas).

### 2.6.1 qPCR de nDNA do *Trypanosoma cruzi*

A amplificação do nDNA se deu a partir da combinação do par de oligonucleotídeos Tcz 3 e Tcz 4 (Ndao *et al.*, 2000). Utilizou-se a seguinte padronização: 200 ng do DNA molde humano, adicionando 0,2 $\mu$ M de Tcz3 e 0,2  $\mu$ M de Tcz4 e 10  $\mu$ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific/Fermentas, CA, USA), em um volume final de 20  $\mu$ L. A seguinte condição de amplificação foi usada: estabilização a 50°C por 2 minutos (devido a presença de dUTP no master mix); desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 10 segundos. Para a formação da curva de dissociação: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

### 2.6.2 qPCR de kDNA do *Trypanosoma cruzi*

A reação de amplificação quantitativa do kDNA se deu a partir da análise de três pares de iniciadores diferentes, que também foram utilizados na cPCR (dois permitindo a amplificação de minicírculos e um de maxicírculos). A qPCR foi realizada para as amostras humanas (grupo positivo, negativo e duvidoso) e para as amostras com diferentes concentrações de *T. cruzi*.

Os iniciadores S36 e 67R anelam especificamente nas regiões constantes dos minicírculos de kDNA e geram uma banda de aproximadamente 250 pb com seus catâmeros (**Tabela 3**). Para essa qPCR foi usada a seguinte padronização: 200 ng do DNA molde humano, adicionando 0,2 $\mu$ M de cada iniciador e 10  $\mu$ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific/Fermentas, CA, USA), em um volume final de 20  $\mu$ L. A seguinte condição de amplificação foi utilizada: estabilização a 50°C por 2 minutos (devido a presença de dUTP no master mix); desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 57°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 10 segundos. Para a formação da curva de dissociação: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

O segundo par de oligonucleotídeos utilizado foi S34 e S67 (**Tabela 3**). Eles anelam especificamente as regiões conservadas dos minicírculos de kDNA e geram uma banda de aproximadamente 122 pb. A amplificação dessa região do kDNA do parasito

requer 200 ng do DNA molde humano. As condições de amplificação foram as seguintes: estabilização a 50°C por 2 minutos (devido a presença de dUTP no master mix); desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 10 segundos. Para a formação da curva de dissociação: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

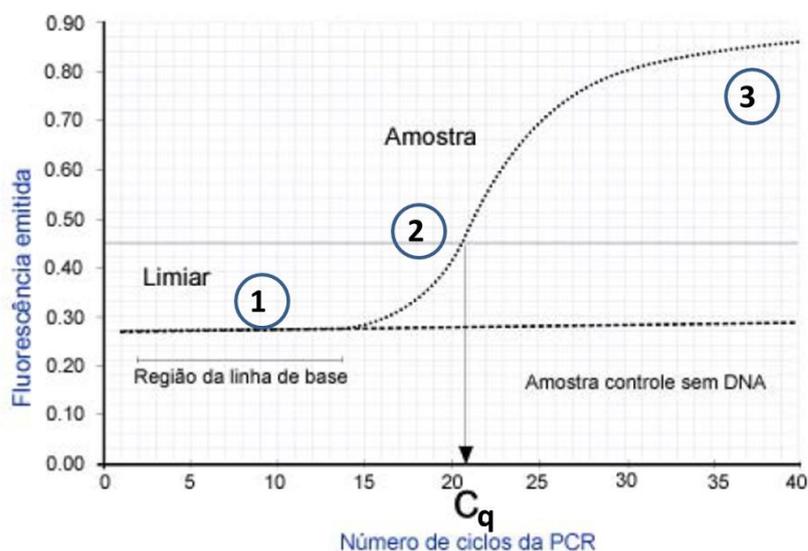
Além desses dois pares de iniciadores que amplificam regiões dos minicírculos de kDNA de *T. cruzi*, foi utilizado o par de iniciadores ND4 e ND4R que anelam especificamente regiões dos maxicírculos de kDNA e geram uma banda de aproximadamente 344 pb (**Tabela 3**). Para essa qPCR foi usada a seguinte padronização: 200 ng do DNA molde humano, adicionando 0,2µM de cada iniciador e 10 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific/Fermentas, CA, USA), em um volume final de 20 µL. A condição de amplificação foi a seguinte: estabilização a 50°C por 2 minutos (devido a presença de dUTP no master mix); desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 10 segundos. Para a formação da curva de dissociação: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

### 2.6.3 Curva padrão para quantificação absoluta

Para identificar o número de ciclos necessários para a detecção da fluorescência graças ao fluoróforo SYBR® Green e para determinar a concentração absoluta de uma amostra, é necessária uma curva padrão gerada pela relação dos valores de C<sub>q</sub> (do inglês, *quantification cycle*) e do logaritmo (log) do número de cópia inicial (os quais são inversamente proporcionais) (**Figura 9**). O C<sub>q</sub> é o ciclo a partir do qual a amplificação exponencial alcança uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (referência passiva do aparelho ou *background*).

Desta forma, para cada um dos diferentes alvos de nDNA e kDNA, foi realizado uma curva padrão a partir das diferentes concentrações de DNA de *T. cruzi*. A curva foi feita através de diluições seriadas de DNA do parasito (1:10) para obter amostras contendo 10<sup>6</sup> a 10<sup>4</sup> par. eq./mL. Para a validação das curvas foi necessário que

a eficiência apresentada estivesse entre 90 e 110%. As curvas padrões foram armazenadas e utilizadas para a quantificação das qPCRs através da utilização da equação da reta ( $y = ax+b$ ; onde  $y$  é o  $C_q$  da amostra;  $x$  é a quantidade do produto amplificado a ser calculada;  $a$  é o coeficiente angular da reta e  $b$  é o coeficiente linear).



**Figura 9. Curva de amplificação da qPCR ilustrando o seu  $C_q$ .** (1) Ilustra a linha basal, onde não há amplificação suficiente para ultrapassar o ruído de fluorescência; (2) Fase exponencial, onde a fluorescência dobra a cada ciclo, tornando-se capaz a detecção; (3) Fase platô, onde não existe mais aumento no produto de PCR. Adaptado de Novais *et al.*, 2004.

#### 2.6.4 Eletroforese em gel de agarose

Como já foi citado, uma das vantagens da qPCR é o fato da etapa de eletroforese ser desnecessária. Entretanto, no caso das amostras de humanos, em situações de dúvida quanto à especificidade da amostra amplificada (diferenças no padrão da curva de dissociação) foi realizada a análise eletroforética em gel de agarose 1,3% corado com brometo de etídio, permitindo a comparação das curvas de dissociação com os fragmentos de DNA visualizados no gel.

## V RESULTADOS

### 1. REVISÃO SISTEMÁTICA

Ao final de todas as etapas de triagem dos estudos, 27 artigos foram selecionados. A **Tabela 4** apresenta os trabalhos que entraram na RS, do mais recente ao mais antigo. Desses, 26 foram publicados em inglês e um em espanhol.

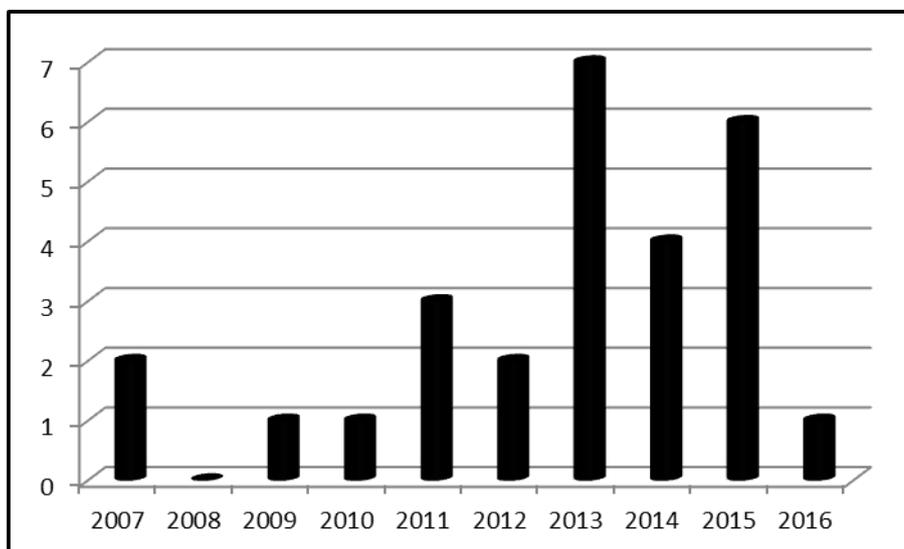
**Tabela 4. Artigos selecionados na revisão sistemática**

REFERÊNCIA	TÍTULO DO ARTIGO	PERIÓDICO	FATOR DE IMPACTO
Castro-Sesquen <i>et al.</i> , 2016	Use of a Chagas Urine Nanoparticle Test (Chunap) to Correlate with Parasitemia Levels in <i>T. cruzi</i> /HIV Co-infected Patients	PLOS Neglected Tropical Disease	4.446
Álvarez <i>et al.</i> , 2015	New scheme of intermittent benznidazole administration in patients chronically infected with <i>Trypanosoma cruzi</i> . A pilot short-term follow-up study in adult patients	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	4.476
Apt <i>et al.</i> , 2015	<i>Trypanosoma cruzi</i> burden, genotypes, and clinical evaluation of Chilean patients with chronic Chagas cardiopathy	Journal of parasitology research	2.027
Cancino-Faure <i>et al.</i> , 2015	Evidence of meaningful levels of <i>Trypanosoma cruzi</i> in platelet concentrates from seropositive blood donors.	Transfusion	----
Melo <i>et al.</i> , 2015	Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients.	Parasites e Vectors	3.234
Ramírez <i>et al.</i> , 2015	Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of <i>Trypanosoma cruzi</i> DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients	Journal of Molecular Diagnostics	4.851
Bianchi <i>et al.</i> , 2015	Follow-up of an Asymptomatic Chagas Disease Population of Children after Treatment with Nifurtimox (Lampit) in a Sylvatic Endemic Transmission Area of Colombia.	PLOS Neglected Tropical Disease	4.446
Benvenuti <i>et al.</i> , 2014	<i>Trypanosoma cruzi</i> persistence in the native heart is associated with high-grade myocarditis, but not with Chagas' disease reactivation after heart transplantation	The Journal of Heart and Lung Transplantation	6.65
Blanchet <i>et al.</i> , 2014	First report of a family outbreak of Chagas disease in French Guiana and posttreatment follow-up	Infection, Genetics and Evolution	2.591
Llano <i>et al.</i> , 2014	Evaluación preliminar de la prueba comercial Chagas ( <i>Trypanosoma cruzi</i> ) IgG-ELISA® en individuos colombianos.	Biomédica	0.549
Rojo <i>et al.</i> , 2014	Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on <i>Trypanosoma cruzi</i> ex vivo infection of human placental chorionic villi explants	Journal Acta Tropica	2.380
Apt <i>et al.</i> , 2013	Treatment of Chagas' disease with itraconazole: electrocardiographic and parasitological conditions after 20 years of follow-up	Journal of Antimicrobial Chemotherapy	5.313
Cura <i>et al.</i> , 2013	Early Molecular Diagnosis of Acute Chagas Disease After Transplantation With Organs From <i>Trypanosoma cruzi</i> -Infected Donors	American Journal of Transplantation	5.683

Duffy <i>et al.</i> , 2013	Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of <i>Trypanosoma cruzi</i> Satellite DNA in Blood Samples.	PLOS Neglected Tropical Disease	4.446
Jackson <i>et al.</i> , 2013	Serological and parasitological response in chronic Chagas patients 3 years after nifurtimox treatment	BMC Infectious Diseases	2.613
Moreira <i>et al.</i> , 2013	Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor <i>Trypanosoma cruzi</i> parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial	Journal Acta Tropica	2.380
Muñoz <i>et al.</i> , 2013	Evaluation of Nifurtimox Treatment of Chronic Chagas Disease by Means of Several Parasitological Methods	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	4.476
Bua <i>et al.</i> , 2013	How to Improve the Early Diagnosis of <i>Trypanosoma cruzi</i> Infection: Relationship between Validated Conventional Diagnosis and Quantitative DNA Amplification in Congenitally Infected Children	PLOS Neglected Tropical Disease	4.446
Castillo <i>et al.</i> , 2012	Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo <i>Trypanosoma cruzi</i> infection of human placental chorionic villi	Placenta	2.972
Qvarnstrom <i>et al.</i> , 2012	Sensitive and Specific Detection of <i>Trypanosoma cruzi</i> DNA in Clinical Specimens Using a Multi-Target Real-Time PCR Approach	PLOS Neglected Tropical Disease	4.446
Freitas <i>et al.</i> , 2011	Real-Time PCR in HIV/ <i>Trypanosoma cruzi</i> Coinfection with and without Chagas Disease Reactivation: Association with HIV Viral Load and CD4+ Level	PLOS Neglected Tropical Disease	4.446
Marcon <i>et al.</i> , 2011	<i>Trypanosoma cruzi</i> : parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients	Memórias do Instituto Oswaldo Cruz	1.592
Schijman <i>et al.</i> , 2011	International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of <i>Trypanosoma cruzi</i> DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients	PLOS Neglected Tropical Disease	4.446
Hidron <i>et al.</i> , 2010	Chagas Cardiomyopathy in the Context of the Chronic Disease Transition	PLOS Neglected Tropical Disease	4.446
Duffy <i>et al.</i> , 2009	Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients	PLOS Neglected Tropical Disease	4.446
Piron <i>et al.</i> , 2007	Development of a real-time PCR assay for <i>Trypanosoma cruzi</i> detection in blood samples	Journal Acta Tropica	2.380
Virreira <i>et al.</i> , 2007	Comparison of <i>Trypanosoma cruzi</i> Lineages and Levels of Parasitic DNA in Infected Mothers and Their Newborns	The American Society of Tropical Medicine and Hygiene	0.916

Pode-se verificar que dos 27 artigos da revisão, nove foram publicados no periódico *PLOS Neglected Tropical Disease*, três no *Journal Acta Tropica*, dois no *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, um nas revistas seguintes: *Placenta*, *Parasites & Vectors*, *Infection*, *Genetics and Evolution*, *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, *Transfusion*, *Journal of Parasitology Research*, *American Journal of Transplantation*, *Biomédica*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *Journal of Molecular Diagnostics*, *BMC Infectious Diseases*, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* e *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. O fator de impacto dessas

revistas variou entre 0.54 a 6.65. Os anos de publicação dos periódicos analisados variaram entre 2007 a 2016, sem nenhum artigo do ano 2008. A maioria dos estudos avaliados foram publicados nos últimos cinco anos (20/27): dois artigos publicados em 2012, sete em 2013, quatro em 2014 e seis em 2015 e um no ano de 2016. (**Figura 10**).



**Figura 10. Cronologia dos anos de publicação dos estudos da revisão sistemática.** Os maiores números de publicações ocorreram nos últimos cinco anos.

De acordo com um dos critérios de inclusão, os estudos selecionados na RS foram realizados com amostras de humanos. O método quantitativo se mostrou prevalente entre eles, ou seja, os estudos apontam uma frequência numérica de um determinado grupo ou população.

Em relação aos objetivos dos artigos, a maioria (19/27) utilizou qPCR para verificar a eficiência da técnica comparada com outro método, como o sorológico ou a cPCR e oito tiveram como finalidade a estimativa da carga parasitária.

A **Tabela 5** apresenta características de interesse dos estudos selecionados. A área geográfica de obtenção das amostras foi bastante variada, incluindo países endêmicos (como por exemplo, Argentina, Brasil e Bolívia) e não endêmicos (como por exemplo, Estados Unidos e Suíça) para a doença de Chagas. Os países que mais apareceram nos estudos foram Bolívia e Brasil, respectivamente. Entretanto, sete artigos não mencionam o local de origem das amostras biológicas.

**Tabela 5: Características de interesse dos estudos selecionados na revisão sistemática.**

REFERÊNCIA	ÁREA GEOGRÁFICA DE ORIGEM DA AMOSTRA	TAMANHO AMOSTRAL	IDADE EM ANOS DAS AMOSTRAS*	TIPO DE AMOSTRA BIOLÓGICA USADA NA qPCR	MÉTODO DE EXTRAÇÃO DO DNA
Castro-Sesquen <i>et al.</i> , 2016	Bolívia	55 pacientes com HIV (alguns infectados com <i>T. cruzi</i> ).	Não informado	Sangue	Não informado
Álvarez <i>et al.</i> , 2015	Argentina	20 chagásicos crônicos	18 a 60 (43 ± 7,9).	Sangue	Não informado
Apt <i>et al.</i> , 2015	Chile	50 indivíduos com cardiomiopatia chagásica crônica (grupo A) e 50 indivíduos sem cardiomiopatia (grupo B)	Grupo A: 30 a 81 Grupo B: 20 a 76	Sangue	Kit comercial QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)
Cancino-Faure <i>et al.</i> , 2015	Não informado	1201 doadores de sangue soropositivos para doença de Chagas (fase da doença não informada)	Não informado	Sangue total e outros componentes sanguíneos, como plasma e plaquetas	Kit comercial High Pure (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
Melo <i>et al.</i> , 2015	Brasil	40 chagásicos crônicos (22 mulheres e 18 homens)	18 a 73	Sangue e soro	Kit comercial QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA), adaptado.
Ramírez <i>et al.</i> , 2015	México, Guiana Francesa, Bolívia, Venezuela e Brasil	156 chagásicos agudos e crônicos	Não informado	Sangue	Kit comercial High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), adaptado.
Bianchi <i>et al.</i> , 2015	Colômbia	63 chagásicos (fase da doença não informada)	4 a 19	Sangue	Kit comercial Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)
Benvenuti <i>et al.</i> , 2014	Não informado	18 chagásicos crônicos com reativação da doença de Chagas (CDR) após transplante cardíaco e 16 indivíduos chagásicos sem CDR	Não informado	Sangue	Kit comercial QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)
Blanchet <i>et al.</i> , 2014	Guiana Francesa	Oito indivíduos da mesma família (fase da doença não informada)	Não informado	Sangue	Kit comercial DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
Llano <i>et al.</i> , 2014	Colômbia	99 chagásicos crônicos	21 a 83	Sangue	Kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit® (Roche, Mannheim, Germany).
Rojo <i>et al.</i> , 2014	Não informado	Não informado	Não informado	Sangue	Kit comercial Wizard Genomic DNA Purification

					Kit (Promega, USA)
Apt <i>et al.</i> , 2013	Chile	46 chagásicos onde foi evidenciado “cura” e 67 chagásicos na fase indeterminada da doença	Não informado	Amostras fecais de triatomíneos obtidas por xenodiagnóstico da população do estudo	Kit comercial FavorPrep Blood Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen Biotech Corp)
Cura <i>et al.</i> , 2013	Não informado	Seis indivíduos na fase aguda da doença de Chagas	Não informado	Sangue	Kit comercial High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) adaptado.
Duffy <i>et al.</i> , 2013	Venezuela, Bolívia e Argentina	Grupo 1: 16 chagásicos crônicos que foram sintomáticos na fase aguda Grupo 2: 63 chagásicos crônicos da Bolívia Grupo 3: 34 chagásicos crônicos da Argentina Grupo 4: 27 recém-nascidos de mães soropositivas	Não informado	Sangue	Kit comercial High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Indiana, USA), adaptado. QIAamp DNA Mini Kit (Não informa fabricante e país; feito somente para o grupo 4)
Jackson <i>et al.</i> , 2013	Suíça	37 chagásicos crônicos	Não informado	Sangue	Kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, San Diego, USA)
Moreira <i>et al.</i> , 2013	Não informado	150 chagásicos crônicos e 30 controles negativos (sem sorologia para doença de Chagas e de região não endêmica).	Não informado	Sangue	Kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) e método manual fenol-clorofórmio
Muñoz <i>et al.</i> , 2013	Chile	21 mulheres chagásicas crônicas	23 a 50	Sangue e amostras de xenodiagnóstico	Não informado
Bua <i>et al.</i> , 2013	Argentina	834 grávidas chagásicas crônicas e 51 crianças nascidas das mães chagásicas	Não informado	Sangue	Kit comercial Illustra blood Mini columns (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)
Castillo <i>et al.</i> , 2012	Não informado	Não informado	Não informado	Células das vilosidades coriônicas humanas (placenta)	Kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)
Qvarnstrom <i>et al.</i> , 2012	Estados Unidos	119 chagásicos (fase da doença não determinada)	Não informado	Sangue e tecido (cefalorraquidiano)	Kit comercial QIAamp blood mini DNA kit (Qiagen, Valencia, Calif.) para sangue total, DNeasy blood e DNA kit (Qiagen) para tecidos.
Freitas <i>et al.</i> , 2011	Brasil	57 chagásicos crônicos imunocompetentes e 34 chagásicos	A partir de 18	Sangue	Kit comercial QIAampTM DNA Mini Kit (Qiagen,

		crônicos portadores do HIV (29 sem reativação da doença de Chagas e cinco com reativação)			Hilden, Germany)
Marcon <i>et al.</i> , 2011	Brasil	13 chagásicos crônicos necropsiados.	Não informado	Tecido cardíaco	Kit comercial Qiagen DNeasy Tissue Kit (Qiagen)
Schijman <i>et al.</i> , 2011	Não informado	Amostras soronegativas com adição de diluições de <i>T. cruzi</i> (CLBrene), 32 chagásicos variados (fase indeterminada, crônicos, imunossuprimidos, transplantados de coração, apresentando forma cardíaca e ou digestiva) e 10 não-chagásicos	Não informado	Sangue	High Pure PCR (Roche Applied Science) e método manual fenol-clorofórmio.
Hidron <i>et al.</i> , 2010	Bolívia	394 chagásicos crônicos	Não informado	Sangue	Método manual: Fenol-Clorofórmio
Duffy <i>et al.</i> , 2009	Argentina	Grupo 1: 43 crianças chagásicas Grupo 2: três adultos chagásicos crônicos com cardiomiopatia.	Grupo 1: 15 dias a 18 anos Grupo 2: não informado	Sangue	Kit comercial QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) e método manual com fenol-clorofórmio.
Piron <i>et al.</i> , 2007	Bolivia, Argentina, Brasil, Honduras.	38 chagásicos crônicos	Não informado	Sangue	Kit comercial High Pure PCR Template Preparation kit (Roche, Basel, Switzerland)
Virreira <i>et al.</i> , 2007	Bolívia	36 recém-nascidos infectados pelo <i>T. cruzi</i> congenitamente e 15 mães chagásicas crônicas	Não informado	Sangue	Kit comercial QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)

\*A idade está indicada em anos. Entre parênteses está a média e o desvio-padrão, nos casos em que essa informação foi informada.

As populações dos estudos foram bastante heterogêneas, variando muito o tamanho amostral (de seis a 1201 indivíduos), o tipo de sujeito, a fase da doença de Chagas, a presença ou ausência do co-infecção com outro agente patológico, entre outros. De interesse, dos 27 estudos, dois deles não forneceram informações sobre o tamanho da população estudada (**Tabela 5**).

Das variáveis de interesse analisadas no presente estudo de RS, a idade foi aquela em que houve o maior número de lacunas. Dezenove trabalhos não disponibilizaram essa informação (**Tabela 5**). Ou seja, a caracterização da população nem sempre foi realizada.

A amostra biológica mais utilizada para obtenção do DNA foi o sangue (24/27). Em um dos artigos (Apt *et al.*, 2013) a extração de DNA foi realizada após o xenodiagnóstico em pacientes chagásicos. Como os ácidos nucleicos foram obtidos inicialmente do tecido humano, os pesquisadores consideraram que esse trabalho obedecia aos critérios de inclusão.

É sabido que o método de extração dos ácidos nucleicos pode afetar o desempenho da PCR (Moreira *et al.*, 2013). Por essa razão, procurou-se verificar os métodos utilizados para a obtenção do material molde para as qPCRs. Vinte estudos utilizaram apenas kits comerciais para a extração do DNA. Um trabalho realizou apenas a extração manual com a técnica fenol-clorofórmio. Porém, para a obtenção dos ácidos nucleicos, três artigos utilizaram tanto kits comerciais, quanto o método de extração manual. Dois deles realizaram a extração com fenol-clorofórmio e com o kit *QIAamp DNA Mini kit* (Schijman *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2013) e um estudo utilizou o kit *High Pure PCR* (Roche Applied Science), além do método manual fenol-clorofórmio (Duffy *et al.*, 2009). Curiosamente, quatro publicações não citaram o método de obtenção dos ácidos nucleicos (**Tabela 5**).

Apesar de quase todos os artigos utilizarem kits comerciais para extração do DNA, houve uma grande discrepância em relação à quantidade de sangue utilizado, mesmo entre aqueles que usaram o mesmo kit. Ocorreu variação na escolha da quantidade de sangue utilizada para a extração (entre 200 µl a 10 mL) e alguns autores nem citam a quantidade. Quase todos os estudos utilizaram o tubo EDTA para coleta com adição de guanidina para uma melhor preservação da amostra.

Na **Tabela 6** é possível observar que o método de detecção da qPCR mais usado foi o sistema de sonda de hidrólise TaqMan. Esse sistema foi usado 19 vezes, enquanto o agente ligante de DNA SYBR Green foi usado apenas nove vezes. Notar que dois

artigos utilizaram o TaqMan e o SYBR Green e um não mencionou o método de detecção da fluorescência.

Em relação aos protocolos de qPCR usados, eles foram extremamente variados no que diz respeito à temperatura de ciclagem, quantidade de DNA molde, tipo de reagente, entre outros. A **Tabela 6** traz informações a respeito do DNA alvo das qPCRs, assim como os pares de iniciadores utilizados.

Em relação aos marcadores moleculares, a maioria das publicações (24/27) utilizaram iniciadores permitindo a amplificação do nDNA do *T. cruzi*, usando TcZ 1 e 2, TcZ 3 e 4 e Cruzei 1 e Cruzei 2. Quatro artigos fizeram análises com marcadores específicos tanto para nDNA, quanto para kDNA. Três estudos usaram somente minicírculos de kDNA e um não mencionou o tipo de marcador utilizado (**Tabela 6**).

Apesar de todos os estudos da revisão serem de base experimental, os métodos de abordagem, protocolos, marcadores selecionados e análises estatísticas pela qual eles foram realizados apresentam-se de forma heterogênea.

**Tabela 6: DNA alvo amplificado, iniciadores utilizados e sistema de detecção da qPCR realizadas nos estudos selecionados na revisão sistemática.**

REFERÊNCIA	DNA AMPLIFICADO	INICIADORES	SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES (5' 3')	TAMANHO DO PRODUTO	SISTEMA DE DETECÇÃO
Castro-Sesquen <i>et al.</i> , 2016	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	166 pb	TaqMan
Álvarez <i>et al.</i> , 2015	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	Não informado	TaqMan
	kDNA	Não informado			
Apt <i>et al.</i> , 2015	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	Não informado	Não informado	TaqMan
Cancino-Faure <i>et al.</i> , 2015	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	Não informado	Não informado	TaqMan
Melo <i>et al.</i> , 2015	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	Não informado	TaqMan
Ramírez <i>et al.</i> , 2015	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	Não informado	TaqMan
	kDNA	Não informado	Não informado		
Bianchi <i>et al.</i> , 2015	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	Não informado	TaqMan
Benvenuti <i>et al.</i> , 2014	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	Não informado	166 pb	TaqMan
Blanchet <i>et al.</i> , 2014	kDNA	32F 148R	TTTGGGAGGGCGTTCA ATATTACACCAACCCCAATCGAA	Não informado	TaqMan
Llano <i>et al.</i> , 2014	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	166 pb	TaqMan
Rojo <i>et al.</i> , 2014	nDNA	TcZ F TcZ R	GCTCTTGCCACAMGGGTGC CAAGCAGCGGATAGTTCAGG	182 pb	SYBR Green
Apt <i>et al.</i> , 2013	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	Não informado	TaqMan
Cura <i>et al.</i> , 2013	kDNA	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado
Duffy <i>et al.</i> , 2013	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	Não informado	TaqMan
Jackson <i>et al.</i> , 2013	nDNA	TcZ 3 TcZ 4	TGCACTCGGCTGATCGTTT ATTCTCCAAGCAGCGGATA	Não informado	TaqMan
Moreira <i>et al.</i> , 2013	nDNA	Cruzi1 Cruzi2 Sat Fw	Não informado	Não informado	SYBR Green e TaqMan

		Sat Rv Diaz 7 Diaz 8 TcZ 1 Sat Rv			
	kDNA	kDNA Fw kDNA Rv			
Muñoz <i>et al.</i> , 2013	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	Não informado	TaqMan
Bua <i>et al.</i> , 2013	nDNA	Sat Fw Sat Rv	GCAGTCGGCKGATCGTTTTTCG TTCAGRGTGTTTGGTGTCCAGTG	Não informado	SYBR Green
Castillo <i>et al.</i> , 2012	nDNA	TcZ F TcZ R	GCTCTTGCCCACAMGGGTGC CAAGCAGCGGATAGTTCAGG	182 pb	SYBR Green
Qvarnstrom <i>et al.</i> , 2012	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	Não informado	TaqMan
	kDNA	32F 148R	TTTGGGAGGGGCGTTCA ATATTACACCAACCCCAATCGAA		
Freitas <i>et al.</i> , 2011	nDNA	TcZ 1	Não informado	Não informado	SYBR Green
		TcZ 2 TcZ 3 TcZ 4	TGCTGCAGTCGGCTGATCGTTTTTCGA CAAGCTTGTTTGGTGTCCAGTGTGTGA		
Marcon <i>et al.</i> , 2011	nDNA	TcZ 1 TcZ 2 TcZ 3 TcZ 4	CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG TGCTGCASTCGGCTGATCGTTTTTCGA CARGSTTGTTTGGTGTCCAGTGTGTGA	Não informado	SYBR Green
		TcZ F TcZ R Cruzi 1 Cruzi 2	GCTCTTGCCCACAMGGGTGC CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA		
Hidron <i>et al.</i> , 2010	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	166 pb	TaqMan
Duffy <i>et al.</i> , 2009	nDNA	Sat Fw Sat Rv	GCAGTCGGCKGATCGTTTTTCG TTCAGRGTGTTTGGTGTCCAGTG	Não informado	SYBR Green
Piron <i>et al.</i> , 2007	nDNA	Cruzi 1 Cruzi 2	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	166 pb	TaqMan
Virreira <i>et al.</i> , 2007	kDNA	S35 S36	Não informado	Não informado	SYBR Green

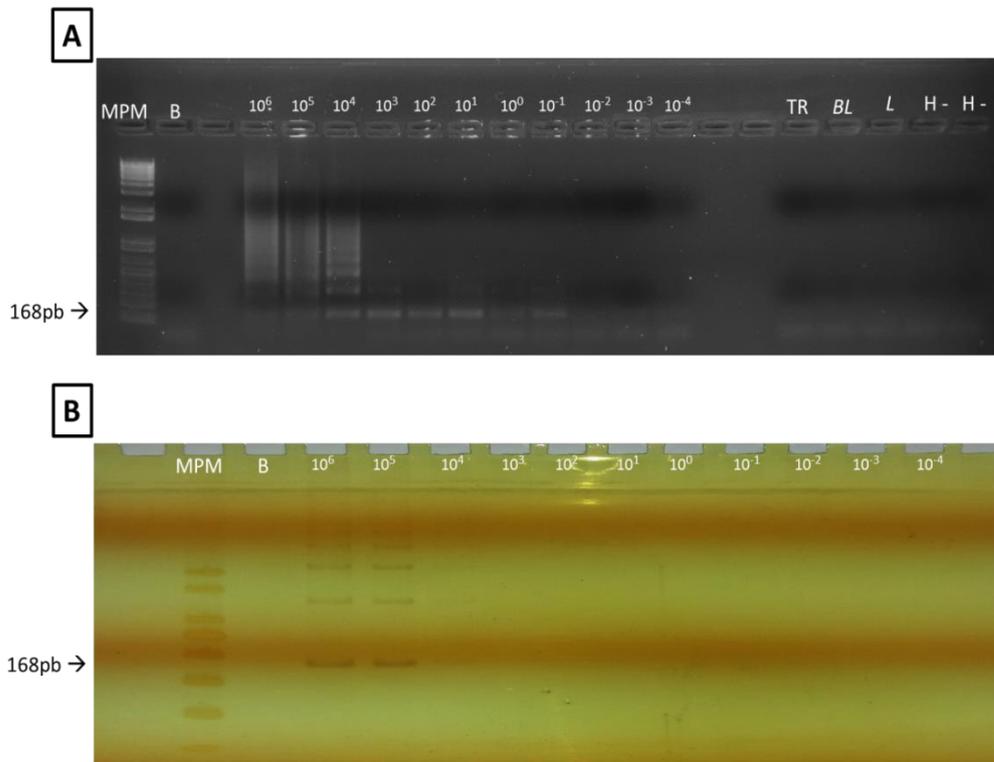
## 2. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR)

### 2.1 Detecção do *T. cruzi* por cPCR

#### 2.1.1 Amplificação de nDNA

Para a amplificação do nDNA do *T. cruzi*, foram usados os oligonucleotídeos TcZ3/TcZ4 e PON1/PON2. Os produtos das amplificações das cPCRs, usando como molde diferentes concentrações do parasito, foram detectados por eletroforese em gel de agarose e em gel de poliacrilamida.

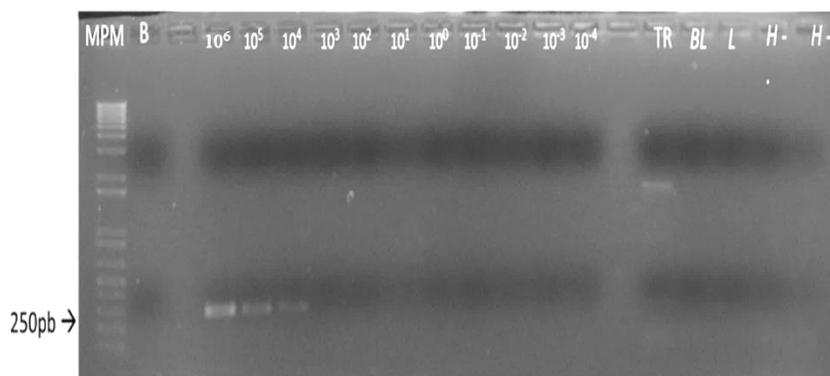
Na **Figura 11 A**, pode ser observado o resultado positivo da reação de cPCR com os pares de iniciadores TcZ3/TcZ4, com banda no gel de agarose (aproximadamente 168 pb) e seus catâmeros até a amostra de *T. cruzi* com concentração de  $10^{-4}$  par. eq./mL. No gel de poliacrilamida, o mesmo produto de cPCR só foi observado nas três amostras mais concentradas ( $10^6$  a  $10^4$  par. eq./mL) (**Figura 11 B**). Com isso, o marcador TcZ3/TcZ4 para amplificação de nDNA de *T. cruzi* é mais visualizado em gel de agarose do que em poliacrilamida.



**Figura 11. Produtos da amplificação de cPCR de amostras com diferentes concentrações de *T. cruzi* com marcador TcZ3/TcZ4. A:** Gel em agarose corado com brometo de etídio do produto de cPCR das amostras de *T. cruzi* ( $10^6$  a  $10^4$  par. eq./mL). **B:** Gel em poliacrilamida do produto de cPCR corado com nitrato de prata do produto de cPCR das amostras de *T. cruzi* ( $10^6$  a  $10^4$  par. eq./mL). A banda esperada possui 168 pb. MPM: marcador de peso molecular, B: branco. TR: *T. rangeli*, BL: *Blastocrithidia*, L: *Leishmania* e H-: amostra humana negativa.

O gel de poliacrilamida obteve uma resolução bem inferior quando comparado com o gel de agarose, e por isso, se optou realizar em análises posteriores somente em gel de agarose.

As amplificações com os marcadores PON1/PON2, resultando em fragmentos com aproximadamente 250 pb, detectaram em gel de agarose bandas na altura esperada nas amostras de *T. cruzi* com as concentrações de  $10^6$ ,  $10^5$  e  $10^4$  par. eq./mL (**Figura 12**). A amplificação gerada pelo controle *T. rangeli* é inespecífica, pois a banda não está na altura esperada.



**Figura 12. Produtos da amplificação de cPCR de amostras com diferentes concentrações de *T. cruzi* com marcador PON1/PON2.** Gel de agarose corado com brometo de etídio do produto de cPCR das amostras de *T. cruzi* ( $10^6$  a  $10^{-4}$  parasitos). A banda esperada possui 250 pb. MPM: marcador de peso molecular, B: branco, TR: *T. rangeli*, BL: *Blastocrithidia*, L: *Leishmania* e H-: amostra humana negativa.

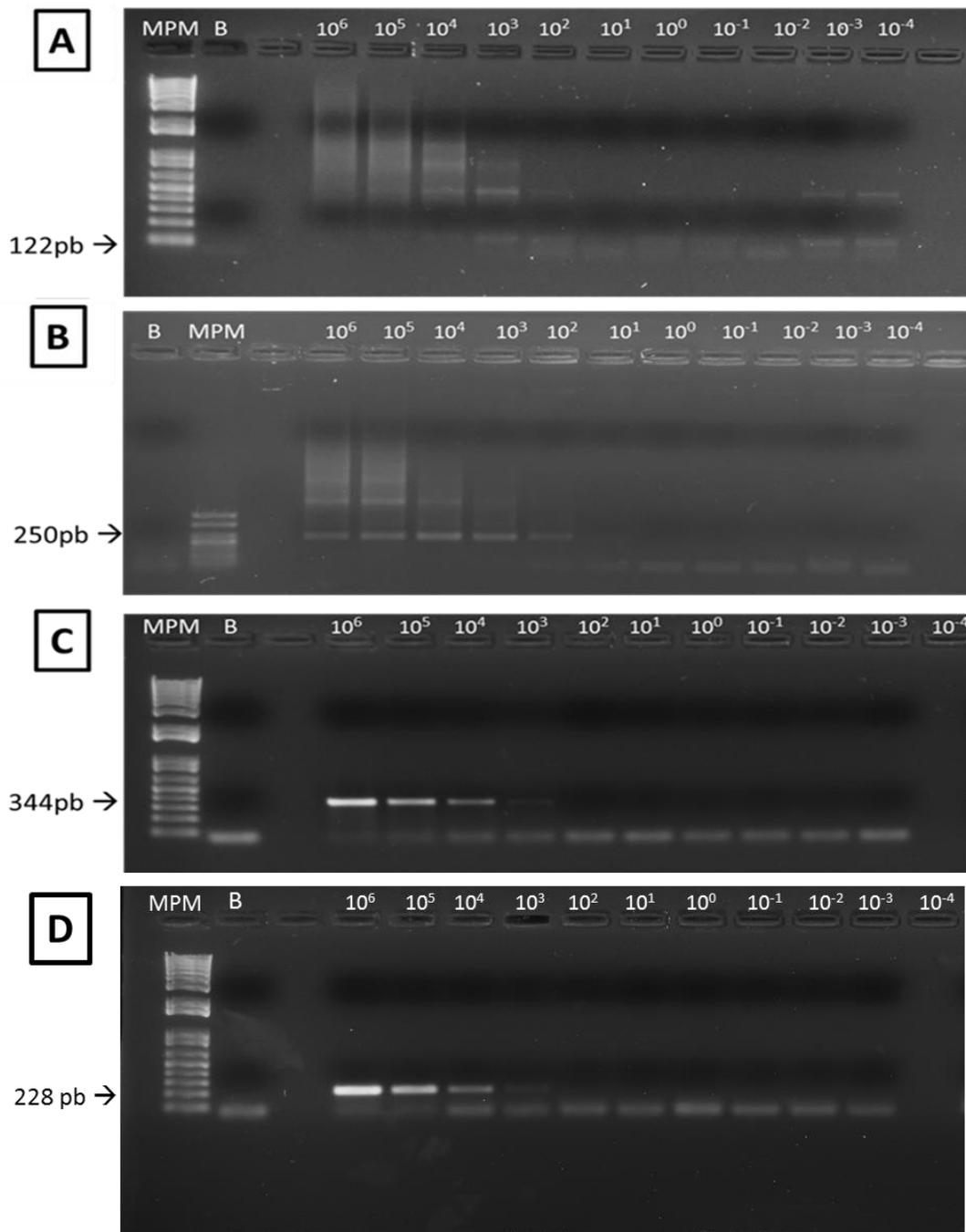
### 2.1.2 Amplificação de kDNA

As análises moleculares das amostras de *T. cruzi* utilizando o kDNA foram realizadas com os marcadores de minicírculos S36/67R e S34/S67 e com os marcadores de maxicírculo ND4/ND4R e COII/COIIR (**Figura 13**). Para visualização do produto de PCR, foi realizada somente eletroforese em gel de agarose.

O marcador S34/S67 amplificou todas as amostras com as diferentes concentrações do parasito e mostrou a presença de seus catâmeros nas amostras mais concentradas (**Figura 13 A**). A análise desse marcador precisa ser feita com cuidado, porque as bandas são facilmente confundidas com excesso de iniciador na reação de cPCR, por apresentar uma banda baixa (aproximadamente 122 pb). O marcador S36/67R (aproximadamente 250 pb) amplificou até a concentração de  $10^2$  par. eq./mL (**Figura 13 B**).

Os pares de iniciadores para maxicírculos ND4/ND4R (aproximadamente 344 pb) amplificaram o *T. cruzi* até o ponto  $10^3$  par. eq./mL (**Figura 13 C**), assim como o COII/COIIR (aproximadamente 228 pb) (**Figura 13 D**).

Observa-se então que para kDNA, o iniciador que identificou mais amostras foi o S34/S67 (todas as concentrações testadas), seguido do S36/67R (as cinco amostras mais concentradas) e do ND4/ND4R e do COII/COIIR (ambos amplificaram as quatro amostras mais concentradas).



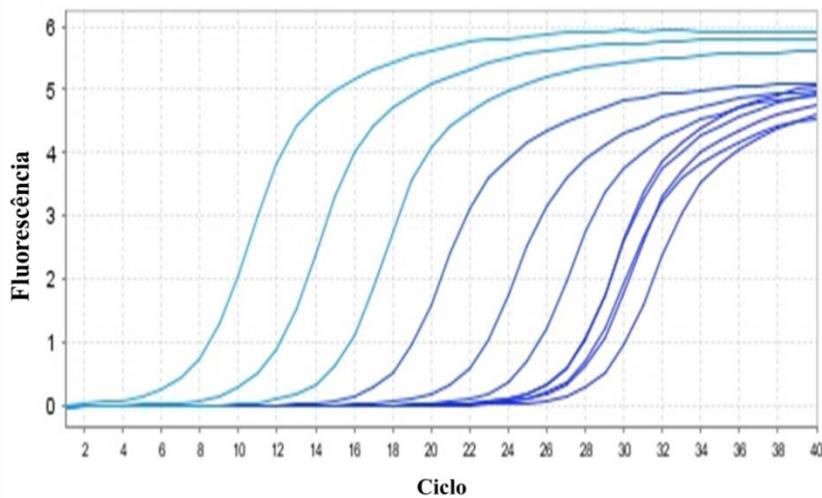
**Figura 13. Produtos da amplificação de cPCR de amostras com diferentes concentrações de *T. cruzi* com marcadores de kDNA. A:** Gel de agarose do produto de cPCR com diferentes concentrações de *T. cruzi* ( $10^6$  a  $10^{-4}$  par. eq./mL) com marcador de minicírculo S34/S67. **B:** Gel de agarose do produto de cPCR com diferentes concentrações de *T. cruzi* ( $10^6$  a  $10^{-4}$  par. eq./mL) com marcador de minicírculo S35/67R. **C:** Gel de agarose do produto de cPCR com diferentes concentrações de *T. cruzi* ( $10^6$  a  $10^{-4}$  par. eq./mL) com o marcador de maxicírculos ND4/ND4R. **D:** Gel de agarose do produto de cPCR com diferentes concentrações de *T. cruzi* ( $10^6$  a  $10^{-4}$  par. eq./mL) com o marcador de maxicírculos COII/COIIR. O marcador S34/S67 amplificou todas as amostras ( $10^6$  a  $10^{-4}$  par. eq./mL), o S36/67R, amplificou cinco amostras ( $10^6$  a  $10^2$  par. eq./mL) e os marcadores ND4/ND4R e COII/COIIR amplificaram quatro amostras ( $10^6$  a  $10^3$  par. eq./mL). As bandas esperadas possuem 122 pb, 250 pb, 344 pb e 228 pb, respectivamente. MPM: marcador de peso molecular, B: branco.

## 2.2 Detecção do *T. cruzi* por qPCR

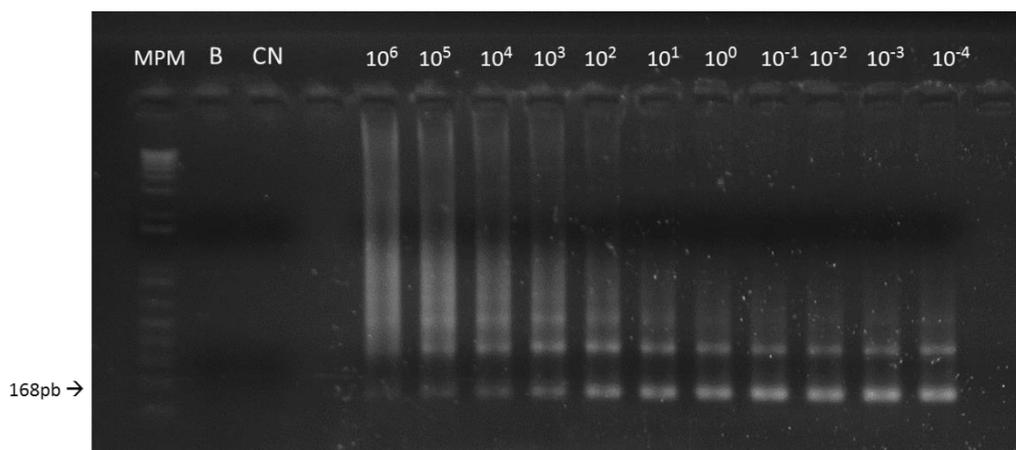
Para comparar os resultados da cPCR com a qPCR, os pares de iniciadores com melhor performance na detecção do *T. cruzi* pela técnica convencional foram testados no método quantitativo. As amostras de *T. cruzi* com diferentes concentrações de DNA possibilitou a construção das curvas padrão que permitiram a quantificação absoluta do nDNA das amostras de humanos. Os dados das qPCRs foram analisados pelo software StepOne v2.3 (Applied Biosystems, CA, USA). Além disso, os produtos de qPCR foram analisados eletroforéticamente para confirmar a amplificação específica e para permitir a comparação com os géis da cPCR.

### 2.2.1 Amplificação do nDNA

A partir dos resultados da cPCR, foi decidido realizar a qPCR para nDNA apenas com os iniciadores TcZ3 e TcZ4 (**Tabela 3**). Essa qPCR usando como molde as amostras de *T. cruzi* com diferentes concentrações de DNA possibilitou a construção da curva padrão para posterior quantificação absoluta do nDNA das amostras de humanos. Todas as amostras de *T. cruzi* amplificaram na qPCR, como pode ser observado na curva de amplificação gerada pelo software StepOne v2.3 (Applied Biosystems, CA, USA) (**Figura 14**) e pela fotografia do gel de agarose. Este último apresentou banda na altura esperada em todas as amostras testadas (aproximadamente 168 pb) (**Figura 15**).

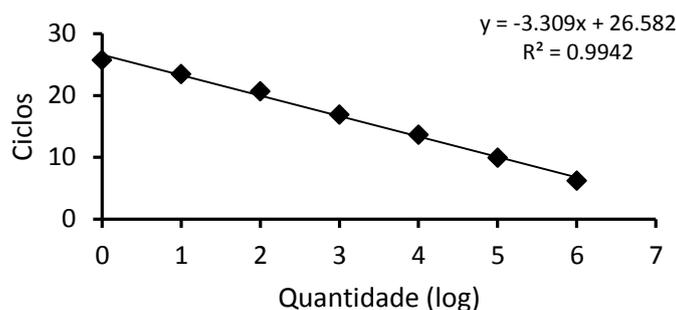


**Figura 14. Curva de amplificação linear da qPCR das amostras de *T. cruzi*.** Diluições seriadas do parasito foram realizadas permitindo a obtenção de amostras contendo  $10^6$  a  $10^4$  par. eq./mL. O gráfico mostra a amplificação das 11 concentrações de DNA de *T. cruzi*.



**Figura 15. Produtos da amplificação de qPCR de amostras com diferentes concentrações de *T. cruzi* com marcador TcZ3/TcZ4.** Gel de agarose corado com brometo de etídio do produto de qPCR das amostras de *T. cruzi* ( $10^6$  a  $10^4$  par. eq./mL). A banda esperada possui 168 pb. MPM: marcador de peso molecular, B: branco, CN: controle negativo.

Entretanto, para a geração da curva padrão foram considerados apenas os pontos  $10^6$  a 1 parasito/mL, pois isso permitiu a obtenção de uma curva com 100,5% de eficiência (inclinação da reta = -3,31 e  $R^2 = 0,99$ ) (**Figura 16**). A eficiência de 100% indica que o material genético é duplicado a cada ciclo de qPCR.

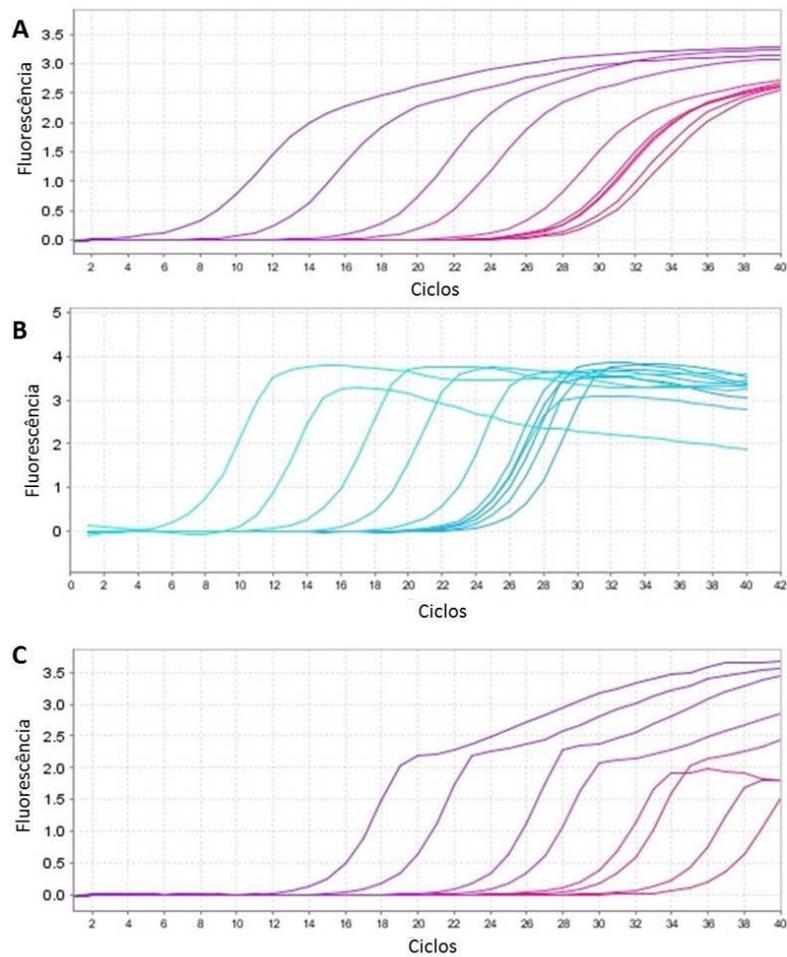


**Figura 16.** Curva padrão de nDNA gerada a partir da amplificação de amostras de *T. cruzi* com diferentes concentrações. À direita do gráfico está a equação da reta e o coeficiente de regressão linear ( $R^2$ ). A eficiência da curva foi de 100,5%. Os losangos pretos representam cada amostra de *T. cruzi* ( $10^6$  a 1 parasito/mL, em log 6 a 0 par. eq./mL).

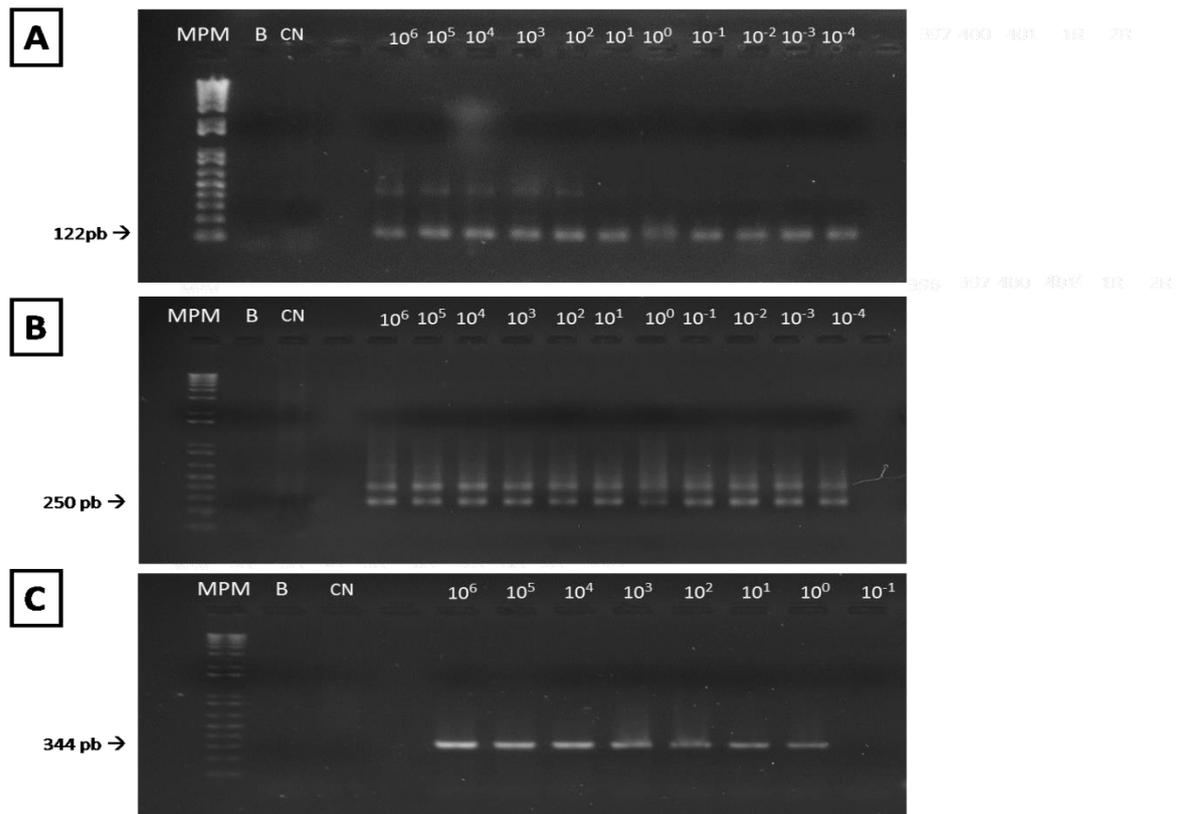
### 2.2.2 Amplificação do kDNA

As amostras de *T. cruzi* com concentrações variadas de parasito foram amplificadas por qPCR com os marcadores S36/67R, S34/S67 e ND4/ND4R. Todos os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio após eletroforese.

A **Figura 17** mostra as curvas de amplificação das diferentes concentrações de *T. cruzi* amplificadas com os três pares de iniciadores de kDNA. Pode-se perceber que os marcadores S34/S67 e os S36/67R amplificaram a mesma quantidade de amostras (até a concentração de  $10^{-4}$  par. eq./mL) (**Figura 17 A e B**). Já os marcadores de maxicírculos ND4/ND4R apresentaram positividade na qPCR até a concentração de  $10^{-1}$  par. eq./mL (**Figura 17 C**). Para os marcadores de minicírculos, esse resultado pôde ser confirmado pelas imagens do gel de agarose obtido através da eletroforese, com a visualização de bandas nas alturas esperadas (aproximadamente 122 pb e 250 pb, respectivamente) (**Figura 18 A e B**). Curiosamente, para o ND4/ND4R no gel foi possível visualizar banda na altura esperada (aproximadamente 344 pb) somente até a amostra de *T. cruzi* com concentração de  $10^0$  par. eq./mL (**Figura 18 C**). Todas as amostras com as diferentes concentrações do parasito amplificadas com os marcadores S36/67R mostraram a presença de catâmeros (**Figura 18 B**). Com os iniciadores S34/S67, os catâmeros foram visualizados apenas nas amostras mais concentradas (**Figura 18 A**).

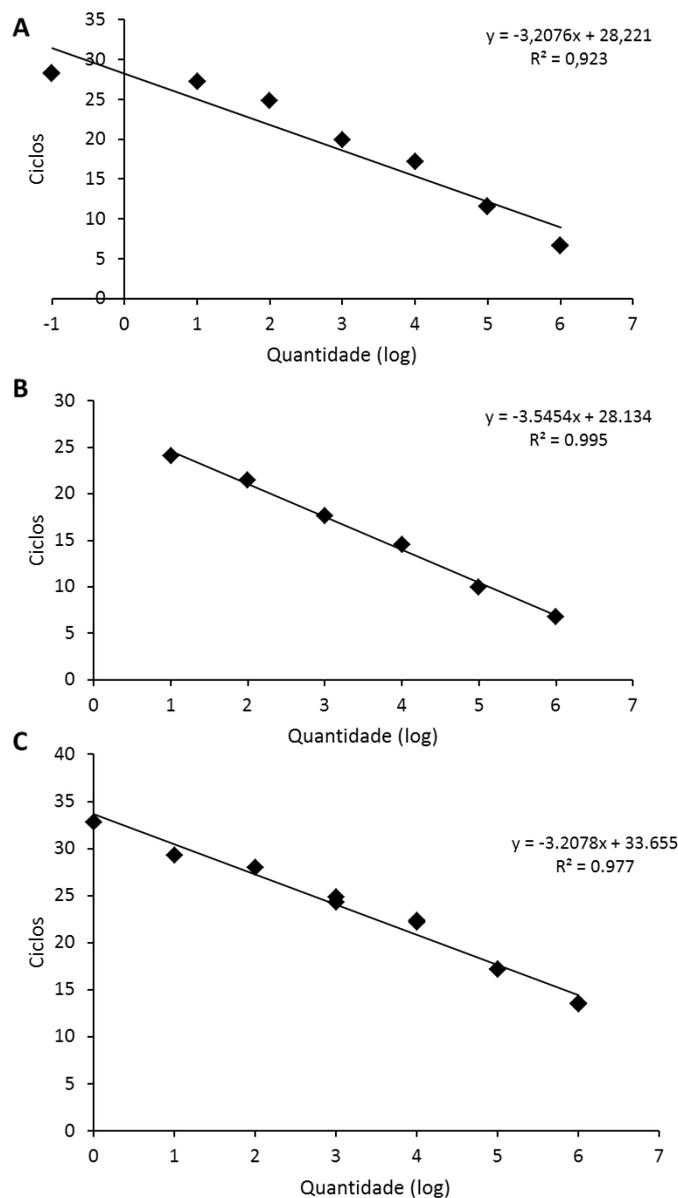


**Figura 17. Curva de amplificação linear das qPCRs de kDNA das amostras de *T. cruzi*.** O gráfico mostra a curva de amplificação das amostras de *T. cruzi* que foram amplificadas com iniciadores específicos. **A:** Amplificação com os iniciadores S34/S67. **B:** Amplificação com os iniciadores S35/S36. **C:** Amplificação com os iniciadores ND4/ND4R. Diluições seriadas do parasito foram realizadas permitindo a obtenção de amostras contendo  $10^6$  a  $10^4$  par. eq./mL.



**Figura 18. Produtos da amplificação de qPCR de amostras com diferentes concentrações de *T. cruzi* com marcadores de kDNA. A:** gel de agarose corado com brometo de etídio do produto de qPCR com diferentes concentrações de *T. cruzi* com os marcadores de minicírculos S34/S67 ( $10^6$  a  $10^{-4}$  par. eq./mL) **B:** gel de agarose corado com brometo de etídio do produto de qPCR com diferentes concentrações de *T. cruzi* com os marcadores de minicírculos S36/67R ( $10^6$  a  $10^{-4}$  par. eq./mL) . **C:** gel de agarose corado com brometo de etídio do produto de qPCR com diferentes concentrações de *T. cruzi* com os marcadores de maxicírculos ND4/ND4R ( $10^6$  a  $10^{-1}$  par. eq./mL). As bandas esperadas possuem 122 pb, 250 pb e 344 pb respectivamente. MPM: marcador de peso molecular, B: branco, CN: controle negativo.

Para a construção da curva padrão com a eficiência desejada (entre 90 e 110%) para cada um dos marcadores de kDNA usados na qPCR, algumas amostras de *T. cruzi* foram excluídas. A **Figura 19** ilustra as curvas padrão obtidas para cada um dos marcadores moleculares. A eficiência das curvas foi de 105, 95.8 e 106.2% para S36/67R, S34/S67 e ND4/ND4R, respectivamente.



**Figura 19. Curvas padrão de kDNA geradas a partir da amplificação de amostras de *T. cruzi* com concentrações variadas e diferentes iniciadores. A:** Curva padrão para o kDNA com os iniciadores S34/S67. **B:** Curva padrão para o kDNA com os iniciadores S36/67R. **C:** Curva padrão para o kDNA com os iniciadores ND4/ND4R. À direita dos gráficos estão a equação da reta e o coeficiente de regressão linear ( $R^2$ ). A eficiência das curvas foi de 105; 95,8 e 106,2%, respectivamente. Os losangos pretos representam cada amostra de *T. cruzi* ( $10^6$  a  $10^{-1}$  parasito/mL em A;  $10^6$  a 10 parasito/mL em B e  $10^6$  a 1 parasito/mL em C).

### 3. COMPARAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA HUMANO

Sabe-se que o método de extração influencia na qualidade e rendimento dos ácidos nucleicos obtidos e que servirão de molde para as reações de PCR. Desta forma,

a análise de dois métodos de extração de DNA com kits comerciais (Biopur e Promega) foi realizada para dez amostras do grupo positivo por qPCR.

A extração com o kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) permitiu a obtenção de quantidades maiores de DNA (97 a 4251 ng/μl) em comparação ao kit Biopur (17,5 a 35 ng/μl) (**Tabela 7**). Segundo Bienvenu *et al.* (1999) o rendimento da extração pode ser calculado através da relação entre a quantidade de DNA obtido e o volume inicial de sangue utilizado. A extração de DNA com o kit da Promega foi realizada com 10 mL de sangue total com EDTA, enquanto que no Biopur com apenas 0,2 mL (equivalente a 200 μL). O rendimento final da extração foi similar entre os dois kits (0.10 com o kit da Promega e 0.12 com o da Biopur).

A qualidade do DNA, avaliada através da razão entre as absorbâncias 260/280 nm foi semelhante. A integridade do DNA analisada pela corrida eletroforética do produto da cPCR de β-actina também foi equivalente.

**Tabela 7: Quantidade de DNA obtido nas amostras do grupo positivo com extração realizada pelos kits comerciais Promega e Biopur.**

AMOSTRAS POSITIVAS	QUANTIDADE* (KIT PROMEGA)	QUANTIDADE* (KIT BIOPUR)
<b>420</b>	428,0	22,5
<b>421</b>	308,0	18,5
<b>422</b>	353,0	17,5
<b>425</b>	599,5	35,0
<b>426</b>	259,5	23,5
<b>427</b>	4.251,0	32,5
<b>428</b>	371,5	21,0
<b>430</b>	374,5	22,0
<b>431</b>	97,0	25,0
<b>432</b>	123,0	22,0

\*Unidade de medida: ng/μl.

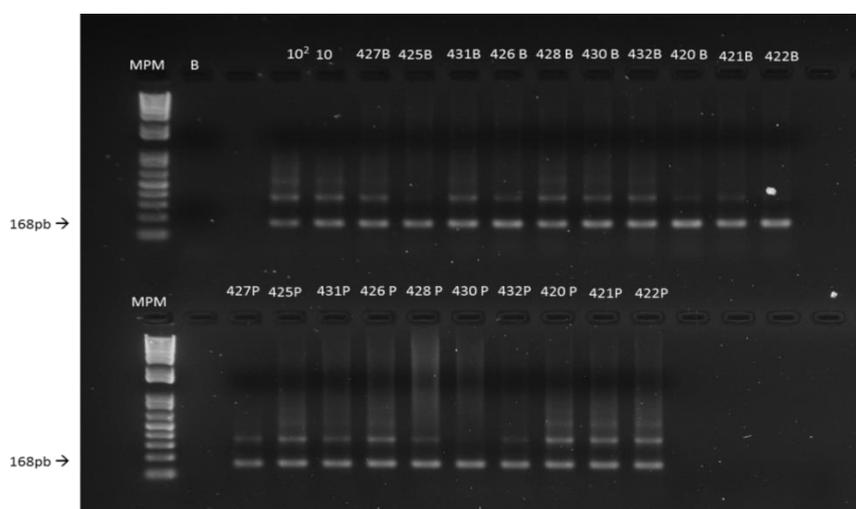
A carga parasitária variou bastante de um método para o outro, não apresentando um padrão (**Tabela 8**).

**Tabela 8: Cargas parasitárias das amostras do grupo positivo com DNA extraído pelos kits comerciais Promega e Biopur (dados da qPCR com marcadores TcZ3/TcZ4).**

AMOSTRAS POSITIVAS	CARGA PARASITÁRIA* (KIT PROMEGA)	CARGA PARASITÁRIA* (KIT BIOPUR)
420	17.01	3.38
421	19.52	3.38
422	17.78	1.46
425	8.23	0.04
426	11.01	2.18
427	0.22	4.74
428	0.08	2.18
430	0.11	0.35
431	0.33	0.04
432	0.06	0.35

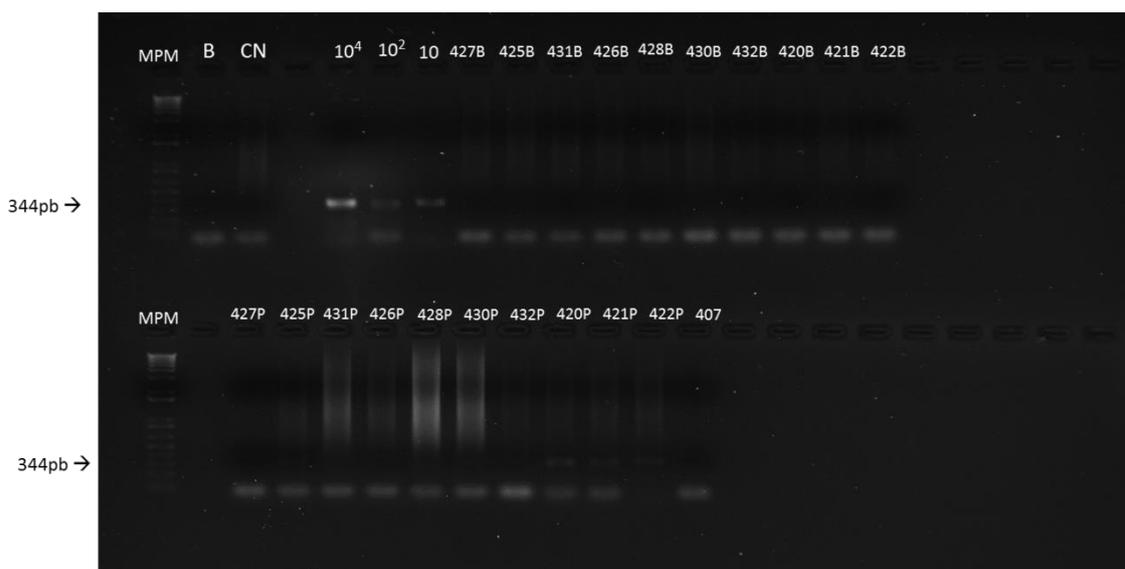
\*Número de parasitos/200ng DNA.

Nos géis de agarose, os produtos amplificados das qPCRs de todas as amostras extraídas pelos dois kits apresentaram bandas na altura esperada. O gel de agarose do produto de qPCR das amostras extraídas com o kit da Promega e da Biopur com o marcador específico de nDNA (TcZ 3/4) mostra o mesmo padrão de banda. Ou seja, o rendimento do DNA não influenciou na análise (**Figura 20**). O mesmo resultado foi observado para os pares de iniciadores de minicírculos de kDNA (S36/67R e S34/S67).



**Figura 20. Eletroforese do produto de qPCR com marcador TcZ3/TcZ4 para as amostras do grupo positivo extraídas com dois métodos diferentes.** Gel de agarose corado com brometo de etídio do produto de qPCR de amostras pertencentes ao grupo positivo. Amostras extraídas com o kit Biopur: na parte superior, 427B até 422B. Amostras extraídas com o kit Promega: na parte inferior, 427P até 422P. MPM: marcador de peso molecular, B: branco, 10<sup>2</sup> e 10: DNA do *T. cruzi*. B depois das amostras significa Biopur e o P depois das amostras significa Promega.

Na qPCR de ND4/ND4R, algumas amostras tiveram diferenças quando o produto foi analisado por gel de agarose após eletroforese. Na **Figura 21** observa-se, por exemplo, a ausência de banda específica e ausência de rastro nas amostras 430 e 428 extraídas com o kit Biopur (indicado pela letra B após o número da amostra), mas há forte rastro quando as mesmas amostras foram extraídas com o kit Promega (430P e 428P).



**Figura 21. Eletroforese do produto de qPCR com marcador ND4/ND4R para as amostras do grupo positivo extraídas com dois métodos diferentes.** Gel de agarose corado com brometo de etídio do produto de qPCR de amostras pertencentes ao grupo positivo. Amostras extraídas com o kit Biopur: na parte superior, 427B até 422B. Amostras extraídas com o kit Promega: na parte inferior, 427P até 422P. MPM: marcador de peso molecular, B: branco, CN: controle negativo, 10<sup>4</sup>: DNA do *T. cruzi*. B depois das amostras significa Biopur e o P depois das amostras significa Promega.

#### 4. DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DA qPCR EM HUMANOS

A segunda parte do trabalho experimental consistiu em avaliar o desempenho diagnóstico da qPCR em uma população com sorologia positiva, duvidosa ou negativa para a doença de Chagas. Para isso, foram realizadas qPCRs para amplificação do nDNA e do kDNA com diferentes pares de iniciadores usando como molde amostras de DNA humano (resumo dos resultados, **ANEXO I**). Devido à baixa especificidade do SYBR Green, que se intercala em qualquer fragmento de DNA dupla fita, a análise da

curva de dissociação foi realizada para todas as amostras (mesmo para as amostras de *T. cruzi*).

#### **4.1 Emprego da qPCR com marcadores específicos para nDNA para identificação das infecções ativas pelo *T. cruzi***

Como o marcador TcZ3/TcZ4 amplificou na cPCR um maior número de amostras (visualizadas em gel de agarose), esse marcador foi escolhido para a realização das qPCRs com DNA humano, o qual permite a identificação da infecção ativa pelo parasito.

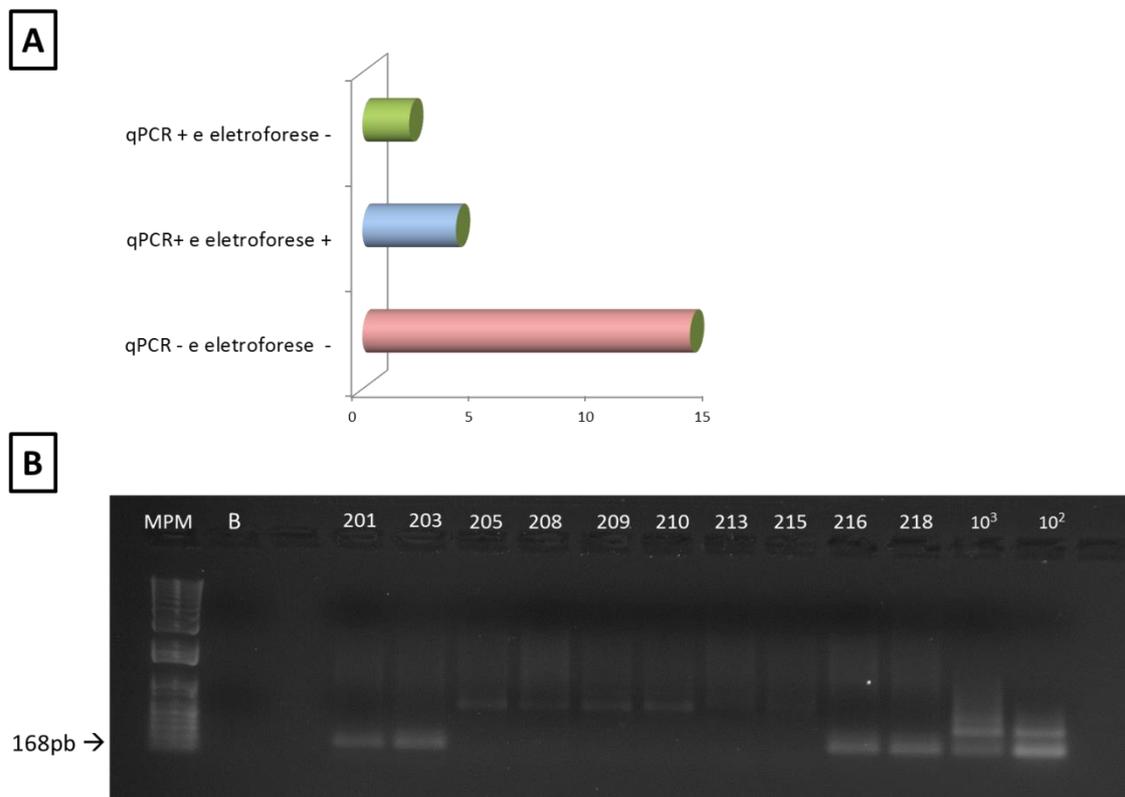
##### **4.1.1 Grupo negativo**

Das 20 amostras dos indivíduos pertencentes ao grupo negativo, a qPCR de nDNA foi realmente negativa para 14 sujeitos (70%). Seis indivíduos tiveram resultados positivos (30%), com carga parasitária extremamente baixa (de 0.01 a 0.06 parasitos/200ng de DNA).

Considerando os seis indivíduos com resultados positivos na qPCR de nDNA, a análise eletroforética assegurou esse resultado apenas para quatro amostras, onde o resultado positivo na qPCR foi confirmado pela visualização de banda na altura esperada (amostras 201, 203, 216 e 218 na **Figura 22 B**). Para as outras duas amostras com resultados positivos na qPCR (fruto da análise dos dados e gráficos fornecidos pelo software StepOne v2.3, *Applied Biosystems*, CA, USA), não foi possível verificar banda no gel de agarose (amostras 205 e 210 na **Figura 22 B**). É interessante notar que para algumas amostras é possível observar banda no gel de agarose, entretanto, essas não estão na altura esperada e provavelmente são resultados de uma amplificação inespecífica (amostras 205, 208, 209, 210, 213 e 215 da **Figura 22 B**).

A análise da curva de dissociação revelou que a fluorescência deve ser emitida em torno da temperatura de 80.7°C (temperatura de fusão) quando a amplificação é específica para nDNA com os iniciadores TcZ3/TcZ4. Para a grande maioria das amostras deste grupo, mesmo aquelas com resultados negativos na qPCR, a curva de

dissociação foi gerada pelo termociclador, sempre na temperatura de fusão esperada e com gráficos apresentando pico único.

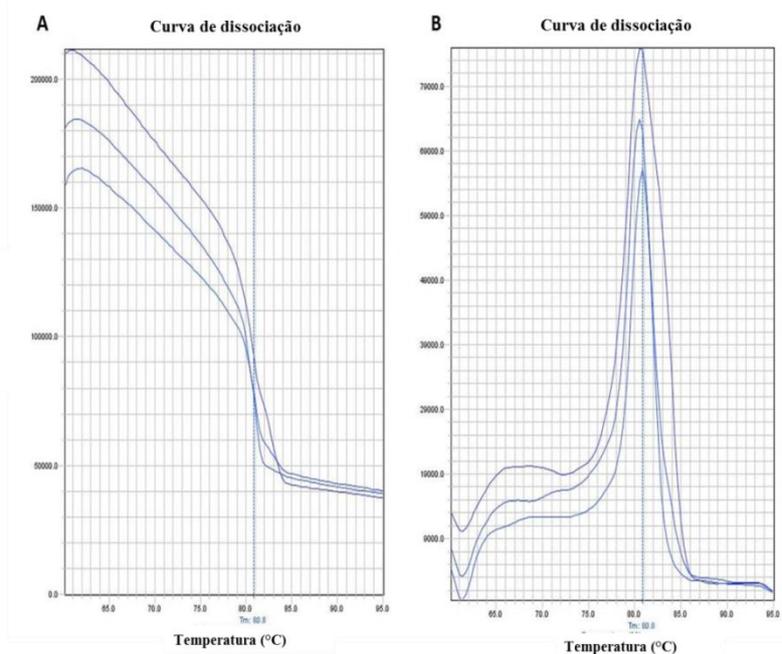


**Figura 22. Resultados da qPCR do grupo negativo usando o marcador TcZ3/TcZ4.** A: Gráfico comparando os resultados fornecidos pelo termociclador StepOne Real-time PCR (*Applied BioSystems*, CA, USA) com aqueles obtidos pela análise eletroforética do produto de qPCR. Quatorze indivíduos foram negativos na qPCR e na eletroforese (cone rosa), quatro foram positivos na qPCR e na eletroforese (cone azul) e dois sujeitos tiveram resultados discordantes (positivos na qPCR e negativos na eletroforese) (cone verde). B: Gel de agarose corado com brometo de etídio do produto de qPCR de algumas amostras do grupo negativo. Observa-se que quatro amostras (201, 203, 216 e 218) foram positivas na qPCR e na eletroforese com banda na altura esperada (aproximadamente 168 pb), enquanto que as amostras 205 e 210 foram positivas na qPCR e negativas na eletroforese, não apresentando banda na altura esperada. MPM: marcador de peso molecular, B: branco, 10<sup>3</sup> e 10<sup>2</sup>: amostras de *T. cruzi* funcionando como controles positivos.

#### 4.1.2 Grupo positivo

Dos 22 indivíduos pertencentes ao grupo positivo, todos tiveram amplificação do nDNA do *T. cruzi*, caracterizando infecção ativa. A carga parasitária variou de 0.06 a

19.52 parasitos/200ng de DNA. A análise da curva de dissociação confirmou a amplificação específica do DNA alvo em todas as amostras desse grupo. A **Figura 23** ilustra as curvas de dissociações de uma amostra de *T. cruzi* e duas amostras do grupo positivo.



**Figura 23. Padrão da curva de dissociação obtida na qPCR com iniciadores de nDNA. A:**Curvas de dissociação normalizadas. **B:** Curvas de dissociação derivadas. Amotras: *T. cruzi*, 428 Promega e 430 Promega.

#### 4.1.3 Grupo duvidoso

Dos 20 indivíduos do grupo duvidoso, seis (30%) foram nDNA positivos com o par de iniciadores TcZ3/TcZ4, identificando a infecção ativa. A carga parasitária foi extremamente baixa (variando de 0.01 a 0.07 parasitos/200ng de DNA), como nas amostras do grupo negativo que tiveram resultados positivos. A análise da curva de dissociação e do gel de agarose confirmou os resultados da qPCR.

## **4.2 Emprego da qPCR com marcadores específicos para kDNA para identificação do *T. cruzi***

As ampliações pelas qPCRs com os marcadores específicos S36/67R e S34/S67 permitem detectar sequências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi*. Desta forma, o desempenho da qPCR na detecção do kDNA do parasito foi testado em uma população com sorologia positiva, duvidosa ou negativa para a doença de Chagas.

A utilização dos oligonucleotídeos ND4/ND4R, que amplificam regiões dos maxicírculos de kDNA do *T. cruzi* é um ponto de destaque neste trabalho. Esses iniciadores foram desenhados no Laboratório Interdisciplinar em Biociências pela equipe envolvida nesta dissertação. A qPCR com os iniciadores COII/COIIR não foi realizada devido às dificuldades de padronização.

As análises moleculares utilizando esses três conjuntos de iniciadores foram realizados para os 62 indivíduos pertencentes a este trabalho. Os métodos foram feitos em duplicata e os resultados foram validados após todos os controles (negativo, positivo e DNA do *T. cruzi*) apresentarem resultados consistentes. A presença de bandas específicas na eletroforese é um resultado positivo e a ausência representa a não detecção do DNA alvo.

### **4.2.1 Amplificação de regiões dos minicírculos de kDNA**

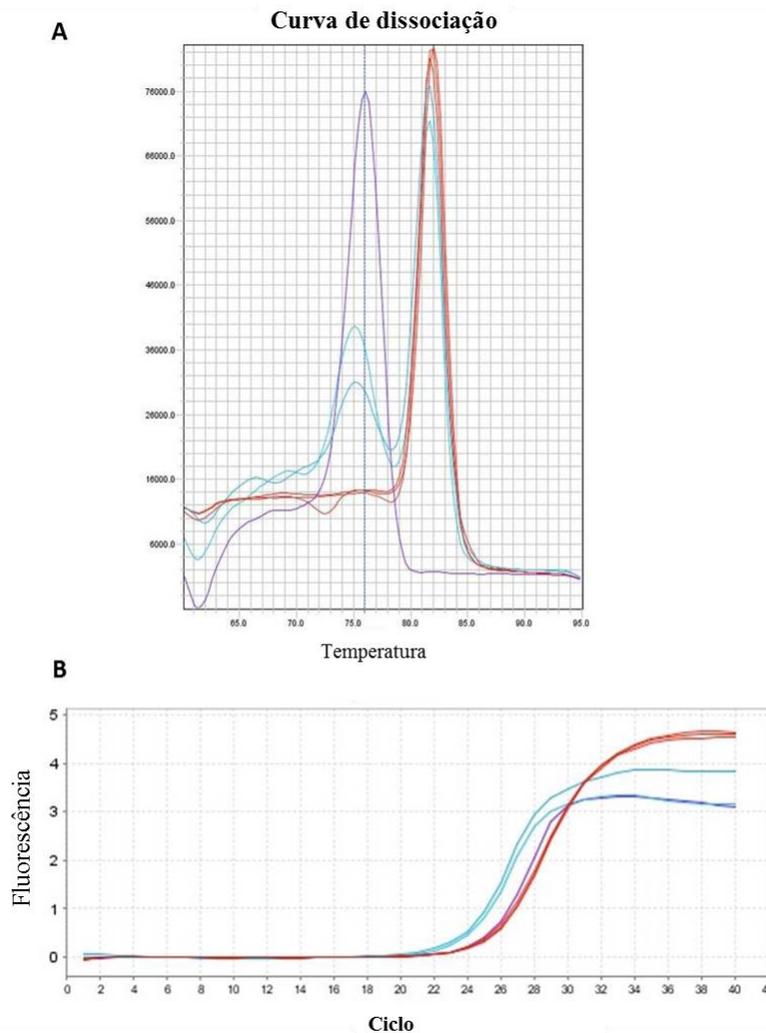
#### **4.2.1.1 Grupo negativo**

Todos os indivíduos do grupo negativo (n = 20) foram positivos nas qPCR que amplificam sequências de minicírculos de kDNA através dos iniciadores S36/67R e S34/S67. É importante notar que 14 desses indivíduos tiveram resultados negativos na qPCR de nDNA. A integração de sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma do hospedeiro já está bem documentada, desta forma, esse resultado já era esperado. Para maiores esclarecimentos, a curva de dissociação foi analisada, pois alterações na composição das sequências resultam em mudanças na T<sub>m</sub>. Em caso de integração é esperado que esse fenômeno ocorra, pois a região amplificada conterá DNA do parasito misturadas ao genoma humano.

#### 4.2.1.1.1 Amplificação de minicírculos de kDNA com os iniciadores S36/67R

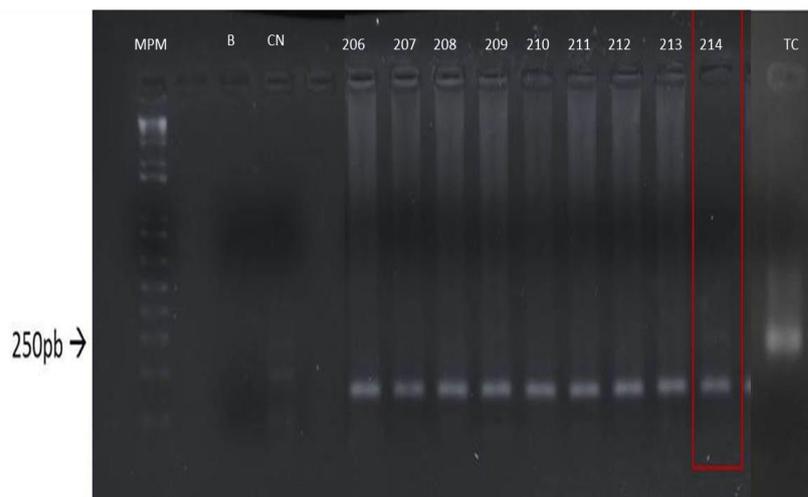
A **Figura 24 A** apresenta as curvas de dissociação de uma das amostras de *T. cruzi* que serviu para gerar a curva padrão, de três amostras do grupo negativo e duas amostras do grupo positivo após amplificação com os iniciadores S36/67R. É possível notar que nas amostras do grupo positivo, apresentadas na figura, existe a formação de duplo-pico. Enquanto que nas amostras do grupo negativo existe somente o segundo pico em local não esperado. A maioria das amostras do grupo negativo apresentaram esse padrão: pico da curva de dissociação em local não esperado.

A possibilidade do duplo-pico estar associado à formação de dímeros de iniciadores foi descartada, pois a curva de amplificação mostra a existência do mesmo padrão de amplificação para todas as amostras (conforme padrão esperado) (**Figura 24 B**).



**Figura 24. Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S36/67R.** **A:** Curvas de dissociação derivadas. Em roxo: amostra de *T. cruzi* ilustrando a curva de dissociação esperada. Em azul: duas amostras do grupo positivo mostrando o duplo-pico. Em vermelho: três amostras do grupo negativo ilustrando pico inicialmente não esperado. **B:** Curvas de amplificação linear mostrando o mesmo padrão de amplificação para todas as amostras. Em roxo: amostra de *T. cruzi*. Em azul: duas amostras do grupo positivo. Em vermelho: três amostras do grupo negativo.

No gel de agarose foi possível visualizar banda em todas as amostras do grupo negativo. Como esperado, após a análise da curva de dissociação, todas as amostras apresentaram banda em altura diferente da esperada (aproximadamente 250 pb) (**Figura 25**). Para as amostras que apresentaram duplo-pico na curva de dissociação (o primeiro no local esperado e o segundo em temperatura não esperada) foi possível a observação de duas bandas (por exemplo, a amostra negativa 214 ilustrada na **Figura 25**).

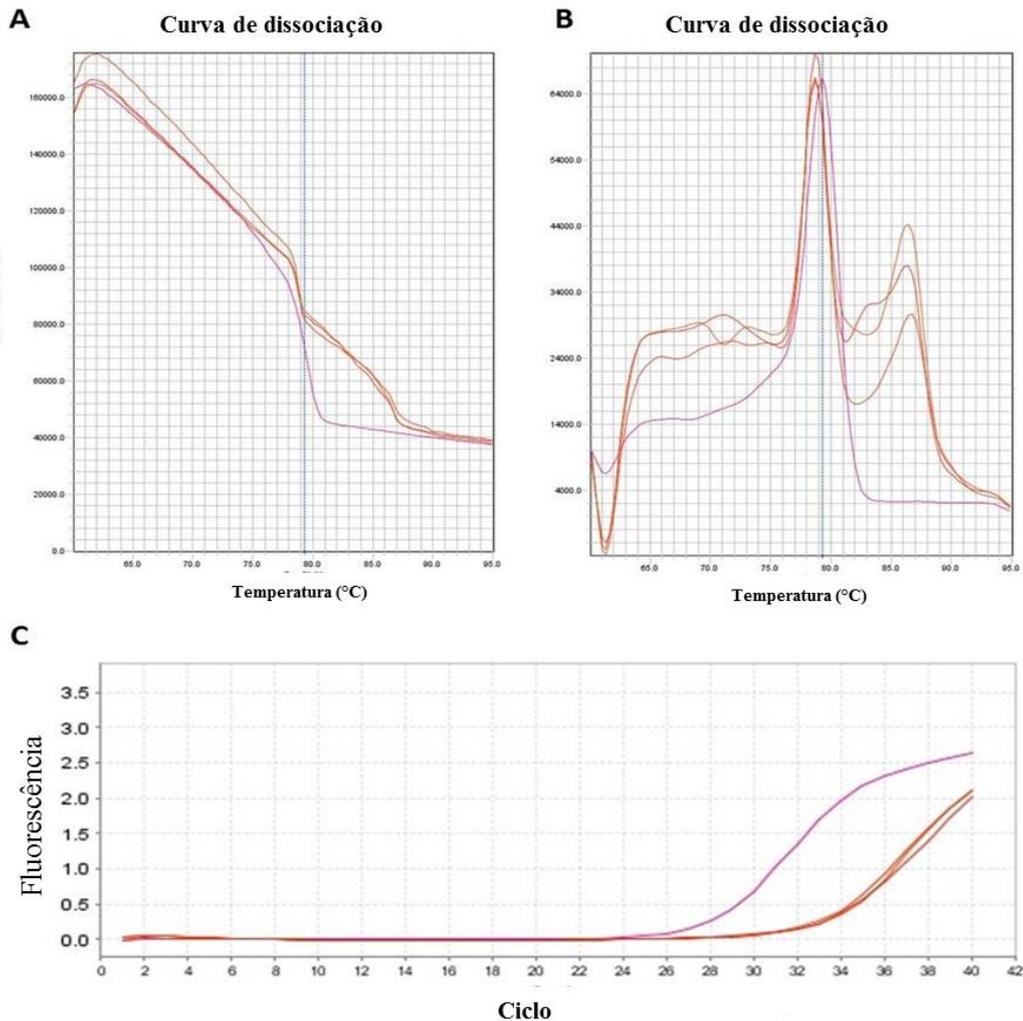


**Figura 25. Eletroforese do produto de qPCR de amostras do grupo negativo com marcador S36/67R.** Gel de agarose corado com brometo de etídio do produto de qPCR das amostras pertencentes ao grupo negativo. O retângulo vermelho indica amostra em que foi possível observar o duplo-pico na curva de dissociação gerada pelo software StepOne v2.3 (*Applied Biosystems*). No gel de agarose é possível visualizar duas bandas, a primeira bem clara na altura esperada (aproximadamente 250 pb) e segunda mais baixa. MPM: marcador de peso molecular, B: branco, CN: controle negativo, 206 a 214: amostras do grupo negativo, TC: *T. cruzi*.

#### 4.2.1.1.2 Amplificação de minicírculos de kDNA com os iniciadores S34/S67

Como dito anteriormente, todas as amostras do grupo negativo tiveram resultados positivos nas qPCR realizadas com os iniciadores S34/S67. As curvas de dissociação também foram avaliadas. Com esse par de iniciadores foi observado duplo-pico em todas as amostras desse grupo. A **Figura 26** ilustra o padrão observado na curva de dissociação. Mais uma vez, a possibilidade do duplo-pico estar associado à formação de dímeros de iniciadores foi descartada, pois a curva de amplificação mostra a existência do mesmo padrão de amplificação (duplo-pico) para todas as amostras (controle e amostras experimentais) (**Figura 26 C**).

No gel de agarose também foi observado bandas na altura não esperada nas amostras do grupo negativo.



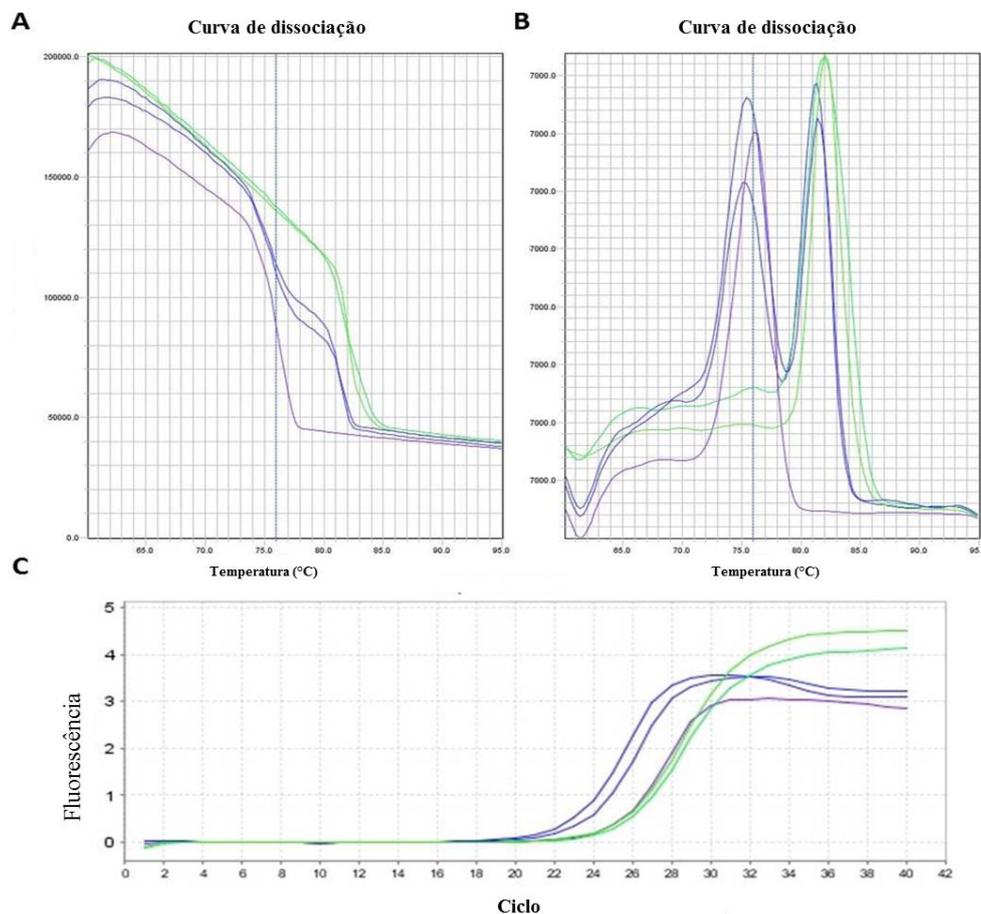
**Figura 26. Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S34/S67.** **A:** Curvas de dissociação normalizadas. Em rosa: duas amostras de *T. cruzi* ilustrando a temperatura de dissociação esperada ( $T_m = 79.28^\circ\text{C}$ ). Em vermelho e amarelo: três amostras do grupo negativo. Observe o padrão diferenciado (curva de dissociação com duplo-pico, um em local esperado e outro em local não esperado). **B:** Curvas de dissociação derivadas. Em rosa: duas amostras de *T. cruzi* ilustrando a curva de dissociação esperada. Em vermelho e amarelo: três amostras do grupo negativo mostrando o duplo-pico. **C:** Curvas de amplificação linear. Em roxo: duas amostras de *T. cruzi*. Em vermelho e amarelo: três amostras do grupo negativo. Essas últimas apresentaram o mesmo padrão na curva de amplificação, porém nota-se que a amplificação ocorre bem mais tardiamente ( $C_q$ s de 31.9, 32.4 e 32.5 x 27.2 para a amostra de *T. cruzi*).

Uma diferença notável em relação aos marcadores S36/67R e S34/S67 foi em relação a carga parasitária quantificada para o grupo negativo. Esta foi bem maior com os primeiros iniciadores, variando de 0.96 a 5.64 parasitos/200ng DNA. Com o par S34/S67 a carga parasitária variou de 0.01 a 0.35 parasitos/200ng DNA.

## 4.2.1.2 Grupo positivo

### 4.2.1.2.1 Amplificação de minicírculos de kDNA com os iniciadores S36/67R

Todas as amostras do grupo positivo amplificaram com o marcador S36/67R. As curvas de dissociação mostraram amostras com duplo-pico e amostras com pico no local não esperado (**Figura 27**). A possibilidade do duplo-pico estar associado à formação de dímeros de iniciadores foi descartada, pois a curva de amplificação mostra a existência do mesmo padrão de amplificação para todas as amostras (controle e amostras experimentais) (**Figura 27 C**).

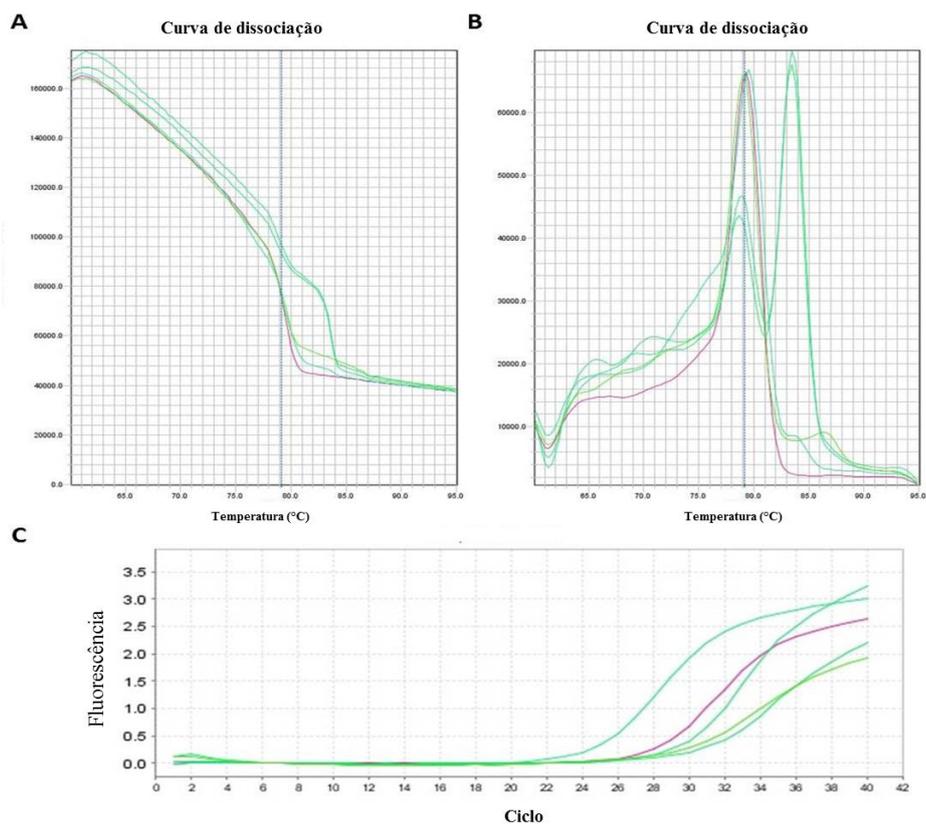


**Figura 27.** Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S36/67R. **A:** Curvas de dissociação normalizadas. Em roxo: amostra de *T. cruzi* ilustrando a temperatura de dissociação esperada ( $T_m = 75.9^\circ\text{C}$ ). Em azul e verde: quatro amostras do grupo positivo. Observe o padrão diferenciado. **B:** Curvas de dissociação derivadas. Em roxo: amostra de *T. cruzi* ilustrando a curva de dissociação esperada. Em azul: duas amostras do grupo negativo mostrando o duplo-pico. Em verde: duas amostras do grupo positivo mostrando pico em local não esperado. **C:** Curvas de amplificação linear mostrando o mesmo padrão de amplificação para todas as amostras. Em roxo: amostra de *T. cruzi*. Em azul e verde: quatro amostras do grupo negativo.

No gel de agarose algumas amostras apresentaram banda na altura esperada (aproximadamente 250 pb), outras apresentaram duas bandas, sendo uma delas inespecífica (aproximadamente 250 pb e 150 pb) e houve amostras que apresentaram apenas uma banda abaixo do esperado (com cerca de 150 pb).

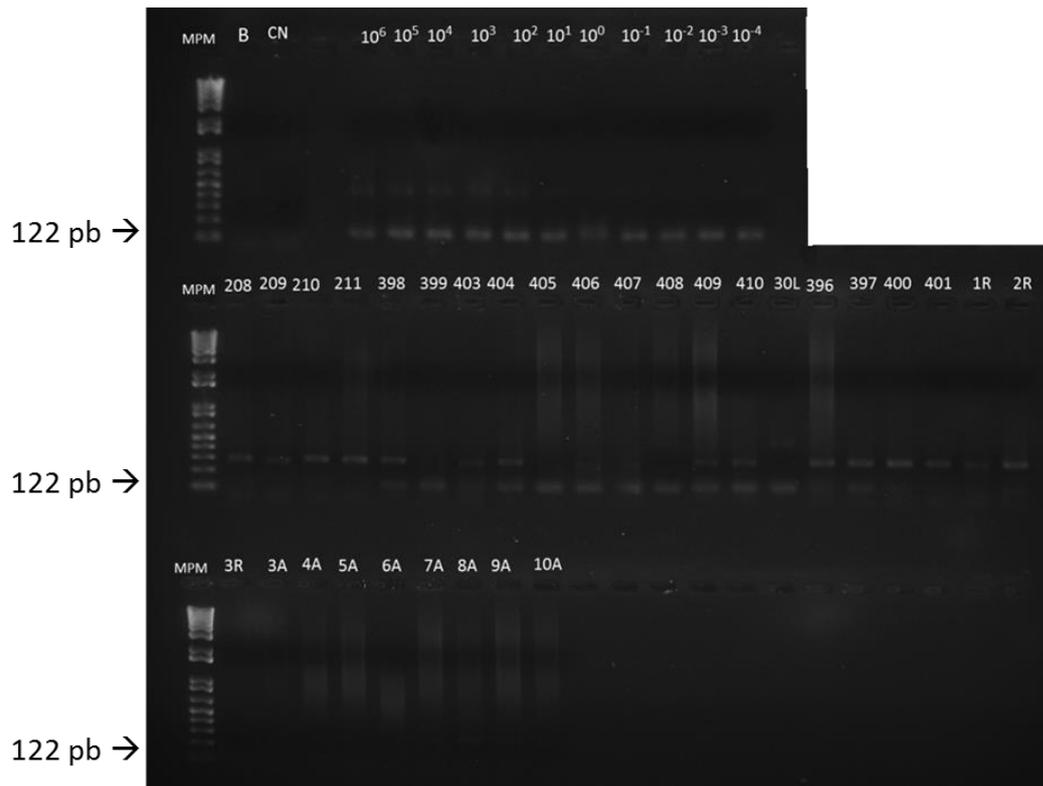
#### **4.2.1.2.2 Amplificação de minicírculos de kDNA com os iniciadores S34/S67**

Todas as amostras do grupo positivo amplificaram com o marcador S34/S67. As curvas de dissociação mostraram amostras com pico na temperatura esperada (em torno de 79.2°C), indicando a amplificação do kDNA do *T. cruzi* e também amostras com duplo-pico, o segundo deles em temperatura não esperada. A **Figura 28** ilustra parte desses resultados. A possibilidade do duplo-pico estar associado à formação de dímeros de iniciadores foi descartada, pois a curva de amplificação mostra a existência do mesmo padrão de amplificação para todas as amostras (controle e amostras experimentais) (**Figura 28 C**).



**Figura 28. Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S34/S67.** A: Curvas de dissociação normalizadas. Em roxo: amostra de *T. cruzi* ilustrando a temperatura de dissociação esperada ( $T_m = 79.28^\circ\text{C}$ ). Em verde: quatro amostras do grupo positivo. Observe o padrão diferenciado em duas delas. B: Curvas de dissociação derivadas. Em roxo: amostra de *T. cruzi* ilustrando a curva de dissociação esperada. Em verde: quatro amostras do grupo positivo. Duas apresentam pico na temperatura esperada e duas apresentam o duplo-pico. C: Curvas de amplificação linear mostrando o mesmo padrão de amplificação para todas as amostras. Em roxo: amostra de *T. cruzi*. Em verde: quatro amostras do grupo positivo.

A análise eletroforética dos produtos de qPCR mostraram amostras com banda na altura esperada (aproximadamente 122 pb) e também amostras com duas bandas, uma na altura esperada e outra banda mais alta, com aproximadamente 300 pb. A **Figura 29** mostra a fotografia de um gel de agarose do produto de qPCR com os iniciadores S34/S67 de amostras dos grupos negativo, positivo e duvidoso, onde é possível visualizar amostras com banda única no local esperado, assim como amostras com duas bandas, caracterizadas por duplo-pico na curva de dissociação.



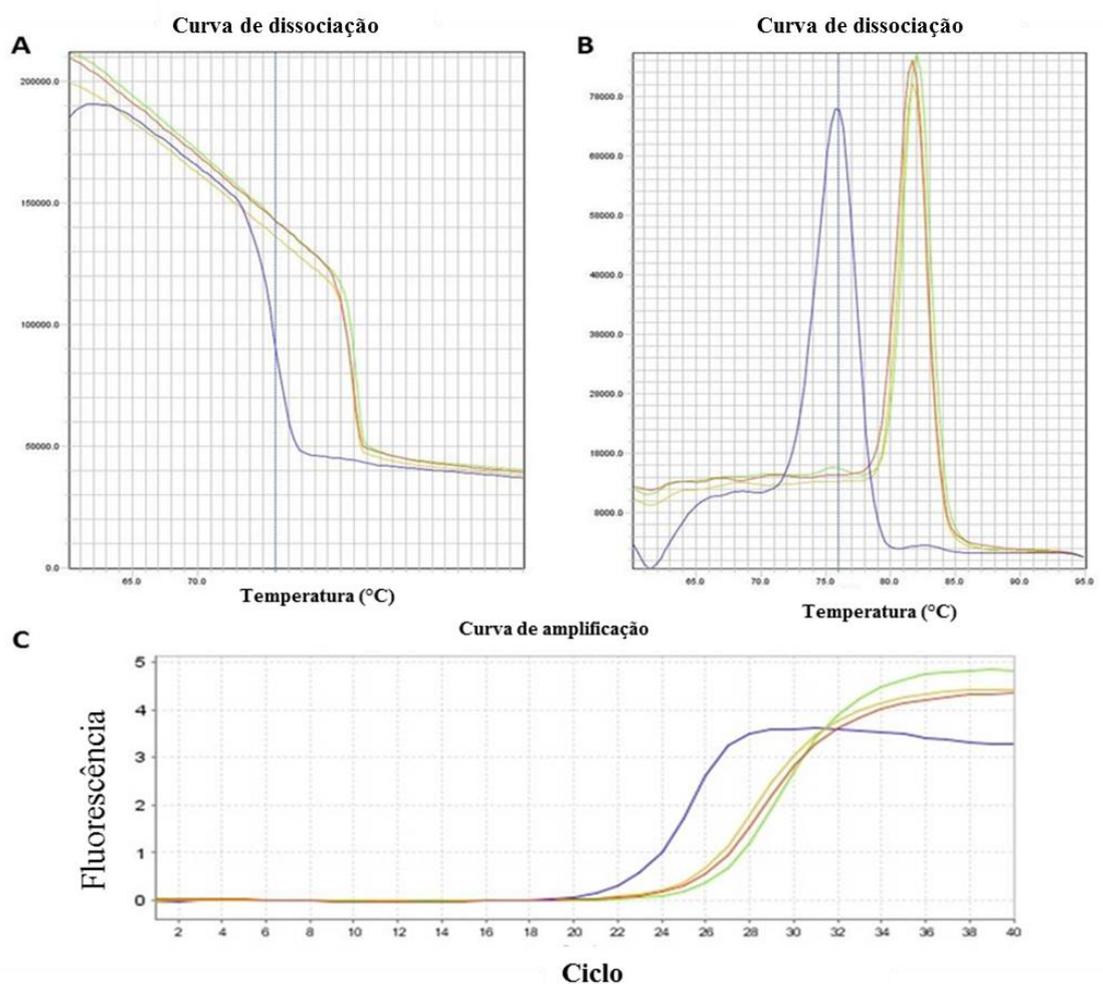
**Figura 29. Eletroforese do produto de qPCR com marcador S34/S67.** Gel de agarose corado com brometo de etídio do produto de qPCR das amostras dos grupos negativo, positivo e duvidoso onde é possível observar os padrões de banda encontrados. MPM: marcador de peso molecular, B: branco, CN: controle negativo,  $10^6$  a  $10^{-4}$ : amostras com diferentes concentrações de *T. cruzi*, amostras do grupo negativo (208, 209, 210 e 211), positivo (403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 30L, 396) e duvidoso (397, 400, 401, 1R, 2R, 3R, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 9A e 10A).

### 4.2.1.3 Grupo duvidoso

#### 4.2.1.3.1 Amplificação de minicírculos de kDNA com os iniciadores S36/67R

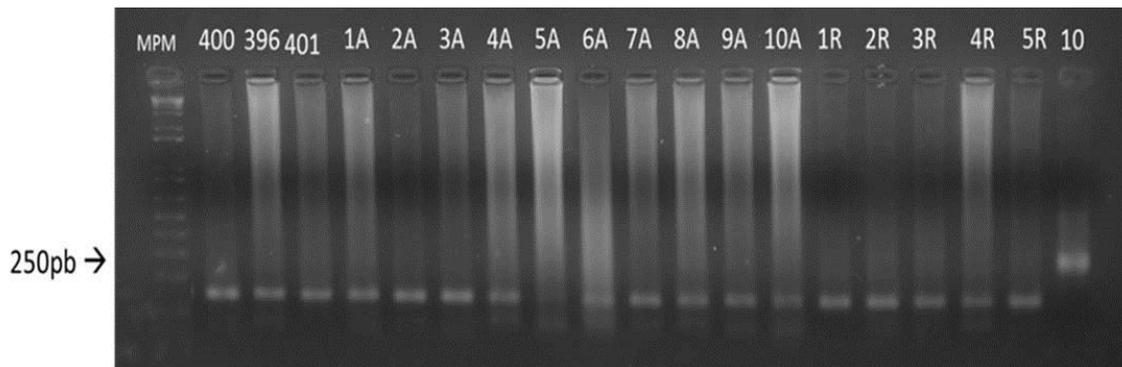
Todas as amostras do grupo duvidoso tiveram resultado positivo na qPCR com S36/67R, sendo possível, então, a quantificação da carga parasitária. Esta variou entre 0.03 e 5.83 parasitos/200ng DNA.

Pela análise da curva de dissociação pôde ser visto que todas as amostras desse grupo apresentaram pico único em temperatura diferente da esperada. Isso pode ser facilmente observado na **Figura 30 B**. Mais uma vez, a formação de dímeros de iniciadores foi descartada, pois a curva de amplificação mostra a existência do mesmo padrão de amplificação para todas as amostras (**Figura 30 C**).



**Figura 30.** Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S36/67R do grupo duvidoso. **A:** Curvas de dissociação normalizadas. Em azul: amostra de *T. cruzi*. Em amarelo, vermelho e verde: três amostras do grupo duvidoso. Observe o padrão diferenciado. **B:** Curvas de dissociação derivadas. Em azul: amostra de *T. cruzi* ilustrando a temperatura de dissociação esperada ( $T_m = 75.94^\circ\text{C}$ ). Em amarelo, vermelho e verde: três amostras do grupo duvidoso com pico em temperatura não esperada. **C:** Curvas de amplificação linear mostrando o mesmo padrão de amplificação para todas as amostras. Em azul: amostra de *T. cruzi*. Em amarelo, vermelho e verde: três amostras do grupo duvidoso.

O padrão visto na curva de dissociação pôde ser confirmado no gel de agarose, onde todas as amostras do grupo duvidoso apresentaram banda mais baixa em relação a altura esperada (aproximadamente 250 pb) (**Figura 31**).

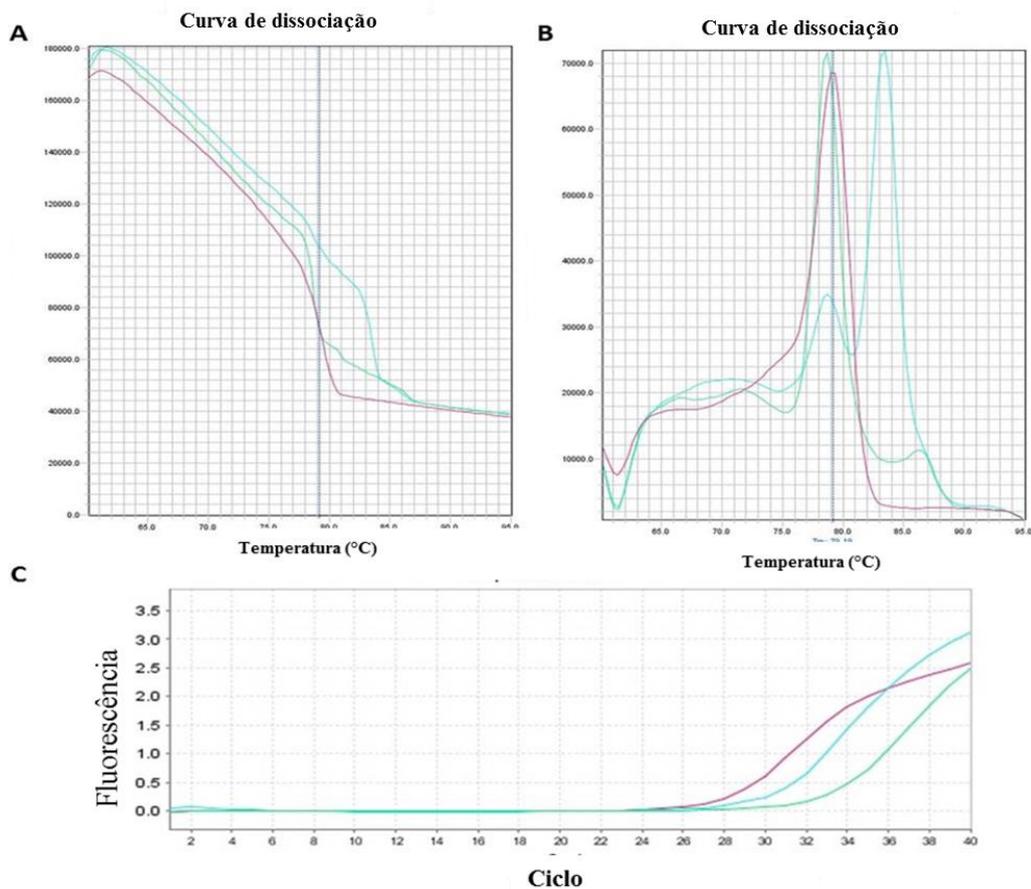


**Figura 31. Eletroforese do produto de qPCR das amostras duvidosas com marcador S36/67R.** Gel de agarose corado com brometo de etídio do produto de qPCR das amostras pertencentes ao grupo duvidoso. MPM: marcador de peso molecular, 400, 396, 401, 1A a 10A, 1R a 5R: amostras do grupo duvidoso, 10: amostras de *T. cruzi*.

#### 4.2.1.3.2 Amplificação de minicírculos de kDNA com os iniciadores S34/S67

Das 20 amostras do grupo duvidoso, exceto uma não amplificou com o iniciador S34/S67. Essa amostra também teve resultado negativo na qPCR de nDNA (Tcz 3/4) e na qPCR de kDNA com os iniciadores ND4/ND4R.

As curvas de dissociação mostraram algumas amostras com duplo-pico e outras com o pico na temperatura esperada (**Figura 32 A,B**). O duplo-pico não ocorreu devido a formação de dímeros de iniciadores, pois a curva de amplificação mostra a existência do mesmo padrão de amplificação para todas as amostras analisadas, incluindo controles (**Figura 32 C**).



**Figura 32. Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S34/S67 do grupo duvidoso. A:** Curvas de dissociação normalizadas. Em roxo: amostra de *T. cruzi* ilustrando a temperatura de dissociação esperada ( $T_m = 79.19^\circ\text{C}$ ). Em azul e verde: duas amostras do grupo duvidoso. **B:** Curvas de dissociação derivadas. Em roxo: amostra de *T. cruzi* ilustrando a curva de dissociação esperada. Em azul: amostra do grupo duvidoso mostrando o duplo-pico. Em verde: amostra do grupo duvidoso mostrando pico no local esperado. **C:** Curvas de amplificação linear mostrando o mesmo padrão de amplificação para todas as amostras. Em roxo: amostra de *T. cruzi*. Em azul e verde: duas amostras do grupo duvidoso.

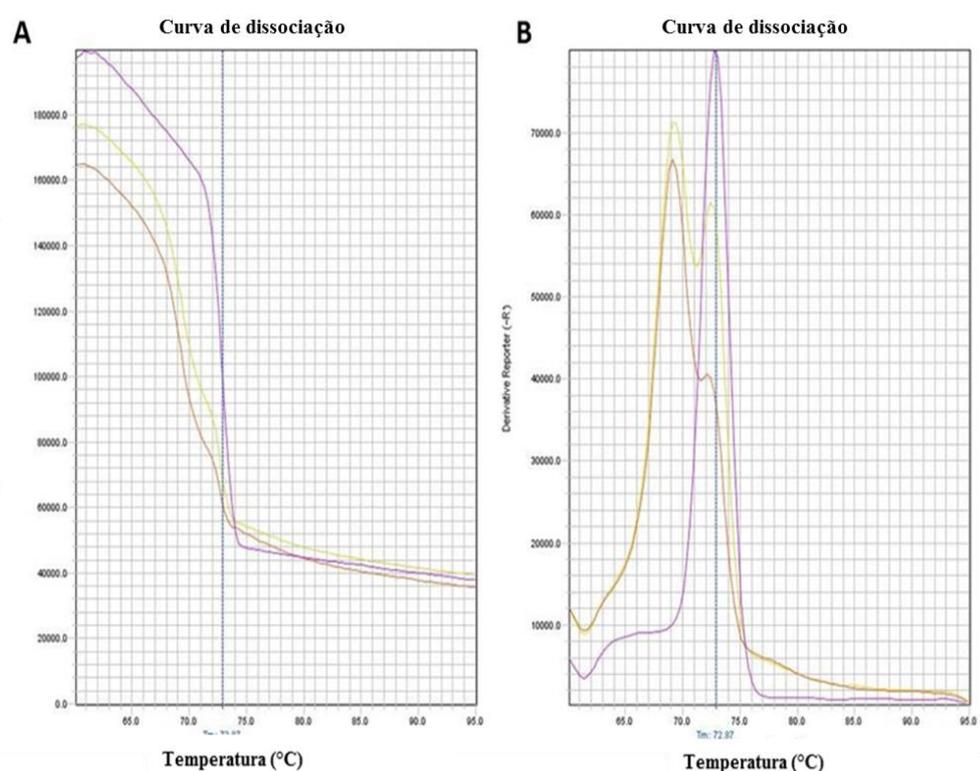
Os resultados da análise eletroforética em gel de agarose concordaram com o observado nas curvas de dissociação. Desta forma, houve amostras que apresentaram banda na altura esperada (aproximadamente 122 pb), amostras em que foi possível visualizar somente uma banda acima do esperado (com cerca de 200 pb) e amostras com os dois padrões de banda.

## 4.2.2 Amplificação de regiões dos maxicírculos de kDNA

### 4.2.2.1 Grupo negativo

No grupo negativo, oito amostras tiveram resultados positivos para os maxicírculos de kDNA de *T. cruzi*. Destas, três também foram positivas para nDNA.

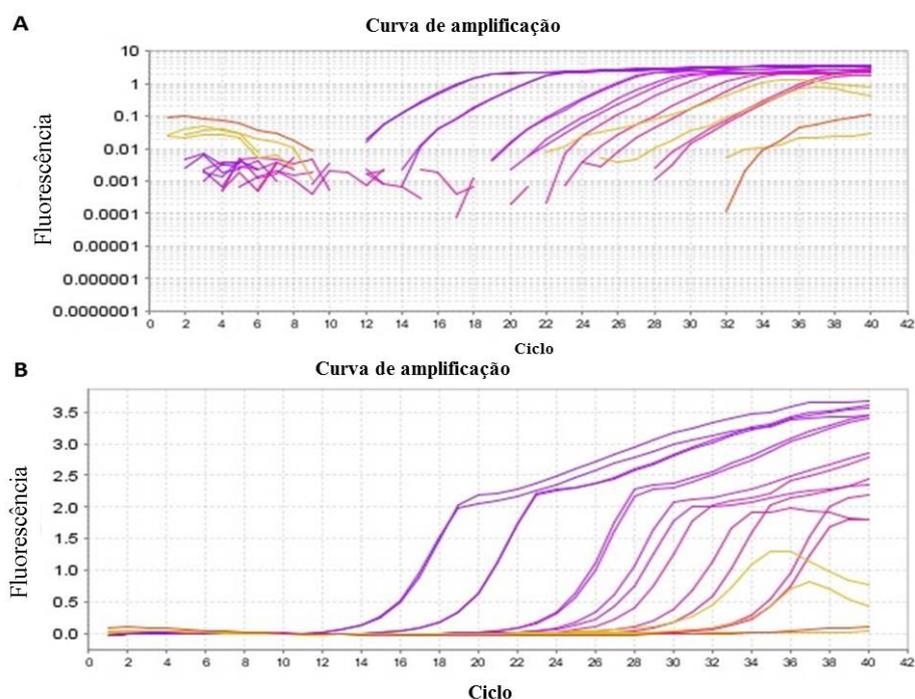
As curvas de dissociação também foram avaliadas. Com esse iniciador foi observado amostras com duplo-pico, assim como pico em temperatura não esperada. A **Figura 33** ilustra isso.



**Figura 33.** Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de maxicírculos kDNA ND4/ND4R para o grupo negativo. **A:** Curvas de dissociação normalizadas. Em rosa: amostra de *T. cruzi* ilustrando a temperatura de dissociação esperada ( $T_m = 72.87^\circ\text{C}$ ). Em vermelho e amarelo: duas amostras do grupo negativo. Observe o padrão diferenciado. **B:** Curvas de dissociação derivadas. Em rosa: amostra de *T. cruzi* ilustrando a curva de dissociação esperada. Em vermelho e amarelo: duas amostras do grupo negativo mostrando o duplo-pico.

A **Figura 34** permite a comparação das curvas de amplificação das amostras de *T. cruzi* utilizadas para gerar a curva-padrão com amostras do grupo negativo. Embora a curva com escala logarítmica mostre as amostras de *T. cruzi* e amostras do grupo negativo com o padrão de amplificação esperado (**Figura 34 A**), na análise da curva

linear observa-se um padrão de amplificação um pouco diferenciado, mesmo para as amostras de *T. cruzi* (**Figura 34 B**).



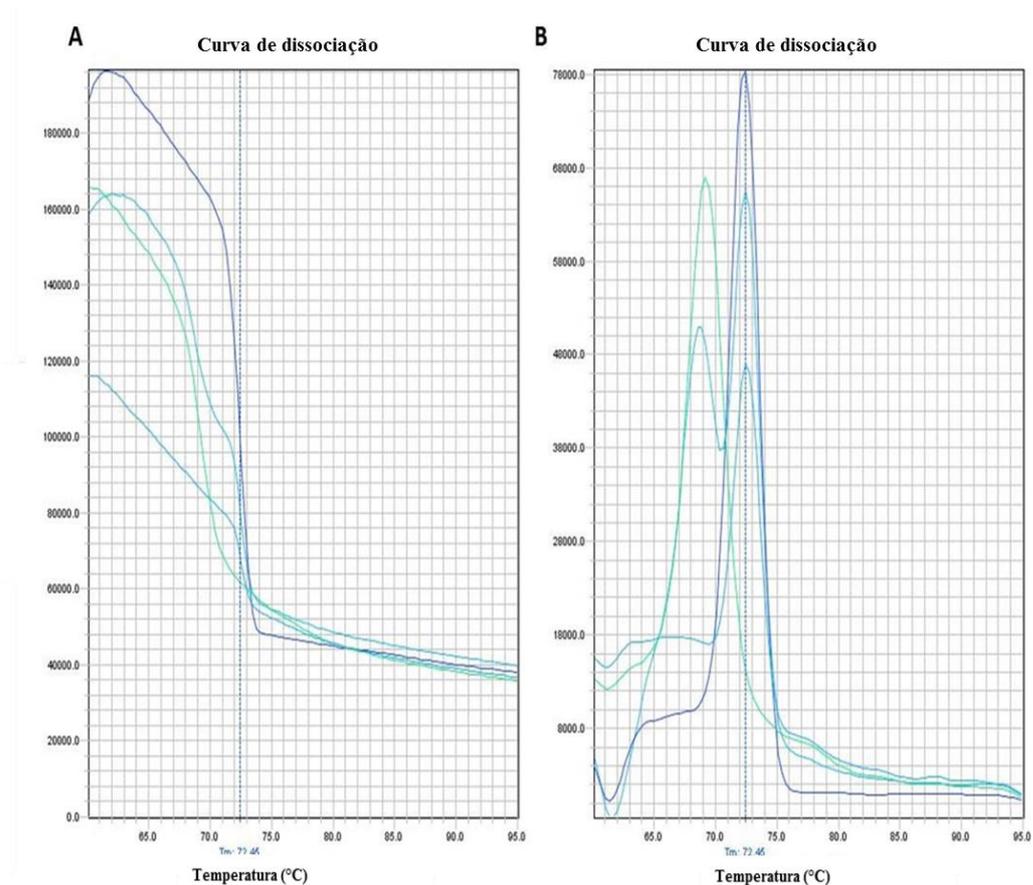
**Figura 34. Análise das curvas de amplificação da qPCR com os iniciadores de minicírculos kDNA S34/S67 do grupo negativo.** **A:** Curvas de amplificação em logarítmico. Em roxo: amostras com concentrações variadas de *T. cruzi* ( $10^6$  a  $10^{-4}$  par. eq./mL). Em amarelo e vermelho: quatro amostras do grupo duvidoso. Mostrando padrão esperado. **B:** Curvas de amplificação linear mostrando padrão diferente do esperado. Em roxo: amostras com concentrações variadas de *T. cruzi* ( $10^6$  a  $10^{-4}$  par. eq./mL). Em amarelo e vermelho: quatro amostras do grupo duvidoso.

Os resultados do gel de agarose foram concordantes com as análises da curva de dissociação.

#### 4.2.2.1 Grupo positivo

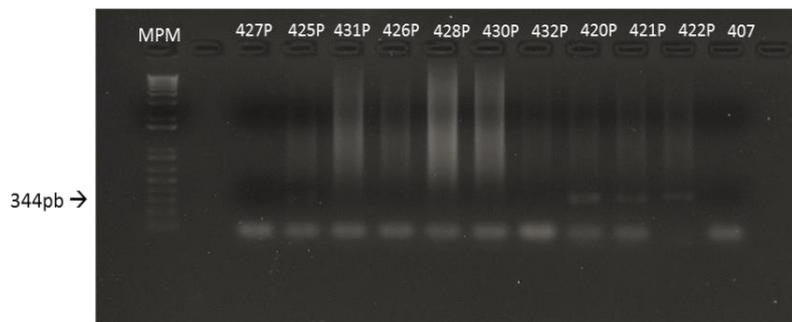
Nas amostras do grupo positivo, 14 indivíduos (14/22) amplificaram com o iniciador ND4/ND4R. A carga parasitária variou de 0.11 a 36.12 parasitos/200 ng DNA.

As curvas de dissociação mostraram os três modelos já vistos: pico na temperatura esperada, duplo-pico e pico no local não esperado (**Figura 35**).



**Figura 35.** Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de maxicírculos kDNA ND4/ND4R para o grupo positivo. **A:** Curvas de dissociação normalizadas. Em azul escuro: amostras de *T. cruzi* ilustrando a temperatura de dissociação esperada ( $T_m = 72.45^\circ\text{C}$ ). Em azul e verde: três amostras do grupo positivo. Observe o padrão diferenciado. **B:** Curvas de dissociação derivadas. Em azul escuro: amostras de *T. cruzi* ilustrando a curva de dissociação esperada. Em azul e verde: três amostras do grupo positivo mostrando pico em local esperado, duplo-pico e pico em temperatura não esperada.

Os resultados do gel de agarose foram concordantes com as análises da curva de dissociação. Algumas amostras apresentaram rastro importante, como pode ser observado na **Figura 36**.

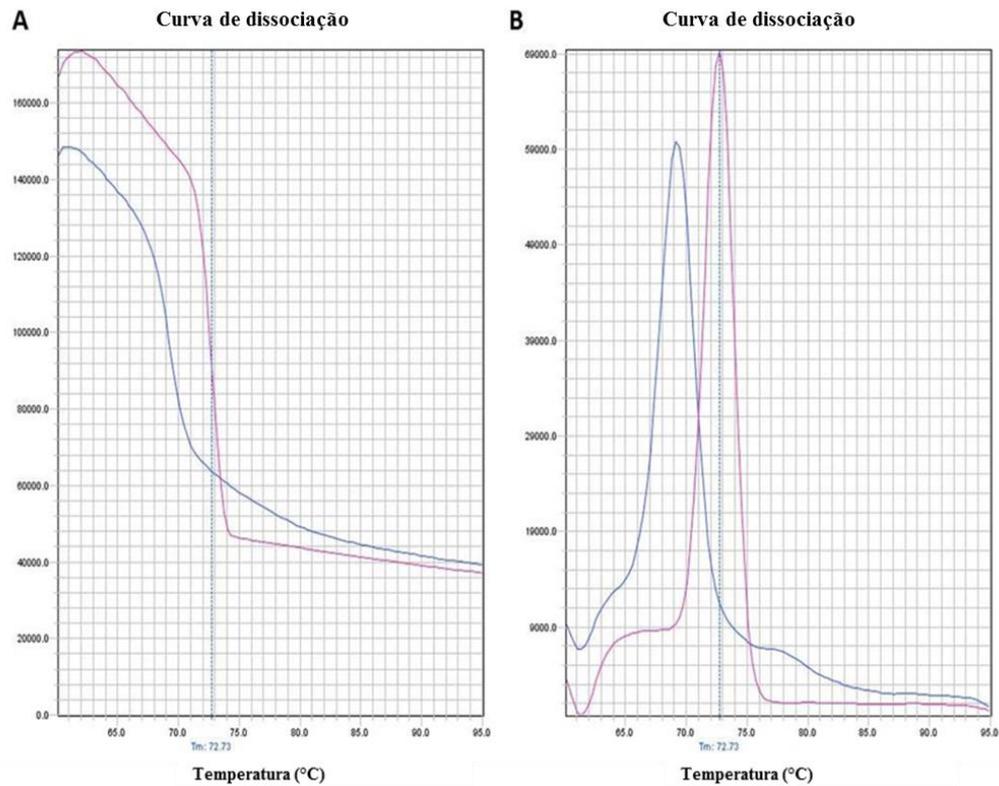


**Figura 36. Eletroforese do produto de qPCR de amostras positivas com iniciador de maxicírculo ND4/ND4R.** Gel de agarose corado com brometo de etídio do produto de qPCR das amostras pertencentes ao grupo positivo. MPM: marcador de peso molecular. Os números correspondem a amostras do grupo positivo. Nota-se amostras com banda na altura prevista (aproximadamente 344 pb), amostras sem banda específica e amostras com forte rastro. A banda mais baixa que pode ser visualizada corresponde a excesso de iniciador na reação.

#### 4.2.2.3 Grupo duvidoso

A amplificação com o par de iniciadores ND4/ND4R ocorreu somente em duas amostras do grupo duvidoso. Estas foram negativas na amplificação do nDNA e positivas para os outros marcadores de kDNA.

A curva de dissociação indicou amostras com pico em temperatura não esperada. Um exemplo disso pode ser visto na **Figura 37**.



**Figura 37. Análise das curvas obtidas na qPCR com os iniciadores de maxicírculos kDNA ND4/ND4R do grupo duvidoso.** **A:** Curvas de dissociação normalizadas. Em rosa: amostra de *T. cruzi* ilustrando a temperatura de dissociação esperada ( $T_m = 72.73^\circ\text{C}$ ). Em azul: amostras do grupo duvidoso com resultado positivo na qPCR. Observe o padrão diferenciado em duas delas. **B:** Curvas de dissociação derivadas. Em rosa: amostra de *T. cruzi* ilustrando a curva de dissociação esperada. Em azul: amostra do grupo duvidoso com resultado positivo na qPCR.

Os resultados do gel de agarose foram concordantes com as análises da curva de dissociação. Algumas amostras que tiveram resultados negativos não apresentaram banda, mas apresentaram rastro importante.

## VI DISCUSSÃO

### 1. REVISÃO SISTEMÁTICA

A revisão sistemática (RS) caracteriza-se como uma síntese de estudos primários, possuindo objetivos, materiais e métodos explicitados, conduzidos por uma metodologia clara e de fácil reprodução (Greenhaalgh, 1997). A principal característica da RS é a capacidade de agrupar grande quantidade de resultados de pesquisas, permitindo a observação e discussão das diferenças encontradas nas pesquisas que possuem o mesmo objetivo geral (Bernardo *et al.*, 2004). A RS busca uma avaliação crítica das informações disponíveis. Com isso, se fundamenta em planejamento e documentos protocolados. Nesta dissertação, a RS teve como foco os estudos que fizeram uso da qPCR na doença de Chagas humana. Isso permitiu identificar as diferentes metodologias que vem sendo utilizadas em pesquisa e no diagnóstico das infecções pelo *T. cruzi*.

A metodologia adotada permitiu a busca extensiva por pesquisas científicas abordando o tema. Entretanto, não foram incluídos estudos não publicados e literatura cinza (dissertações de mestrado e doutorado, por exemplo). Assim, foram selecionados e avaliados 27 artigos. A decisão de buscar apenas trabalhos publicados pode ter impedido a inclusão de um número maior de estudos que poderiam complementar os resultados.

Um dos critérios de inclusão adotado para a triagem dos estudos foi a necessidade das publicações científicas experimentais usarem a qPCR apenas na doença de Chagas humana, sendo então, eliminados os trabalhos com os vetores e outros animais. O trabalho de Apt *et al.* (2013) usou como material biológico amostras fecais de triatomíneos obtidas por xenodiagnóstico de indivíduos contaminados pelo *T. cruzi*. Nós consideramos que este trabalho estava de acordo com os critérios de inclusão, pois o xenodiagnóstico é um teste parasitológico onde o inseto vetor age como um meio de cultura que amplifica e detecta as infecções pelo *T. cruzi* em diferentes mamíferos, como o homem (Saavedra *et al.*, 2016).

A maioria dos artigos selecionados possui ano de publicação recente, demonstrando interesse crescente sobre o uso da qPCR como método complementar diagnóstico para a doença de Chagas. Além disso, nota-se que é um assunto considerado de relevância para a comunidade científica, uma vez que os artigos selecionados foram

publicados em revistas indexadas, algumas delas com alto fator de impacto (este variou de 0.54 a 6.65).

Nem todos os estudos selecionados na RS obedecem as diretrizes para publicação de trabalhos envolvendo a qPCR. Existem alguns trabalhos de referência sobre as informações mínimas para publicação de experimentos de qPCR (MIQE), do inglês *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments*) (Bustin *et al.*, 2009; Bustin *et al.*, 2010; Johnson, Nolan e Bustin, 2013; Johnson *et al.*, 2014). O MIQE foi idealizado para auxiliar a comunidade científica na realização e publicação de trabalhos com qPCR, trazendo a sequência de passos que deve ser realizada para obtenção de dados consistentes e confiáveis (Taylor e Mrkusich, 2014). Bustin *et al.* (2013) ressaltam a falta de transparência e a ausência de informações técnicas fundamentais nas publicações sobre qPCR. Essa escassez pôde ser facilmente observada durante a RS. Alguns estudos encontrados nas bases de dados não entraram na revisão, pois não descreviam a metodologia da qPCR ou não citavam a fonte onde ela poderia ser encontrada. Além disso, entre os estudos selecionados, observou-se a carência de informações técnicas em muitos deles, como por exemplo: três não apresentaram o método de extração dos ácidos nucléicos e três não mencionaram os iniciadores utilizados. Ambos os fatores podem alterar os resultados da qPCR.

A ausência de um protocolo padronizado ficou evidente. De fato, a literatura mostra que vários protocolos de qPCR são usados para amplificação do DNA do *T. cruzi* e os resultados são bastante divergentes, principalmente quando se compara a sensibilidade com outros métodos de diagnóstico. Entretanto, pesquisas envolvendo grupos internacionais têm sido realizadas objetivando a validação e padronização da qPCR para melhor detecção do *T. cruzi* em amostras de sangue humano (Qvarnstrom *et al.*, 2012; Schijman *et al.*, 2011). Através da RS não foi possível eleger o melhor protocolo e método a ser utilizado para a identificação das infecções pelo *T. cruzi*.

Entre as várias condições relevantes para a qualidade dos resultados das técnicas moleculares estão o volume de sangue processado, o procedimento de extração de DNA e a região do DNA do *T. cruzi* a ser amplificado (Piron *et al.*, 2007). O volume de sangue utilizado na extração de DNA variou nos 27 artigos. Este fator pode interferir na positividade da PCR (Marcon, 2001).

Em relação ao protocolo de extração de DNA, diversos protocolos são descritos na literatura. A maioria dos estudos que entraram na RS utilizaram kits comerciais para

a obtenção dos ácidos nucleicos. Contudo, há grande variação na escolha do kit e no tipo de extração (com ou sem membrana de sílica). Um estudo analisado na RS (Moreira *et al.*, 2013) comparou a eficiência da qPCR utilizando DNA obtido da extração com kit (QIAamp DNA Mini Kit) e da extração manual com fenol-clorofórmio. Esta última resultou em maior quantidade de DNA, mas as triplicatas no método de qPCR apresentaram mais variações (desvio padrão elevado), talvez devido a maior quantidade de agentes que podem inibir a reação de amplificação, como o próprio fenol-clorofórmio, que pode inibir a ação enzimática (Sambrook *et al.*, 1989). Essa pouca reprodutibilidade pode limitar o uso desse tipo de extração de DNA na qPCR. A extração com o kit foi realizada usando um protocolo adaptado pelos autores. Esta apresentou maior rendimento que o protocolo original, mostrando-se mais efetivo (Moreira *et al.*, 2013). Assim, fica evidente que o protocolo utilizado influencia de forma direta o resultado de métodos moleculares.

Para a detecção do *T. cruzi*, as PCRs realizadas geralmente possuem como alvo o kDNA localizado nos minicírculos ou o nDNA, ambos presentes em múltiplas cópias no parasito (Coura e Borges-Pereira, 2011; Degraeve *et al.*, 1988) o que permite a aplicação da técnica de PCR. A utilização do nDNA para detecção do *T. cruzi* foi descrita inicialmente por Moser *et al.* em 1989. Desde então, iniciadores que permitem a amplificação deste material genômico vem sendo muito utilizados. Dos 27 artigos que entraram na RS, 20 utilizaram oligonucleotídeos que permitem a amplificação do nDNA, três trabalharam com a amplificação de minicírculos de kDNA e quatro autores utilizaram ambos. De interesse, nenhum trabalho utilizou marcadores específicos para amplificação de regiões de maxicírculos de kDNA de *T. cruzi*. Mais uma vez, os diferentes protocolos utilizados constituem um problema para comparação entre os resultados dos estudos.

Os sistemas de detecção predominantes foram a sonda de hidrólise TaqMan e o SYBR Green, sendo o primeiro o mais usado (59,25% dos artigos). A sonda TaqMan tem como característica a detecção de sequências específicas do DNA amplificado, enquanto o SYBR Green é um agente intercalante que se liga a qualquer fita dupla, sendo, portanto, menos específico. Pela facilidade de uso e baixo custo, esse sistema é uma boa alternativa desde que sejam tomados os cuidados necessários na interpretação dos resultados, pois é necessário verificar se a fluorescência não é consequência de dímeros dos iniciadores ou de produtos inespecíficos, o que pode superestimar a quantificação do DNA alvo (Novais e Pires-Alves, 2004).

Alguns autores realizaram a PCR clássica e a em tempo real e compararam os resultados obtidos. Benvenuti *et al.* (2014), por sua vez, utilizou marcadores específicos para kDNA na cPCR e nDNA na qPCR. Neste trabalho (mencionado anteriormente), a técnica de cPCR mostrou-se mais sensível. Entretanto, usando apenas o kDNA como marcador, Hidron *et al.* (2010) concluíram que a qPCR foi capaz de identificar mais casos positivos que a cPCR. Os resultados de Muñoz *et al.* (2013), que compararam diferentes testes moleculares para avaliação da eficácia do tratamento da doença de Chagas, foram nesse sentido, embora tenham usado o nDNA nas ampliações de qPCR. Eles indicaram que a qPCR de nDNA foi mais eficaz, detectando o *T. cruzi* em 86% dos casos, enquanto a cPCR de kDNA detectou apenas 57% deles. A leitura dos artigos que comparam a PCR convencional com a quantitativa não permite concluir com segurança qual método apresenta maior especificidade, embora sugiram que a qPCR é a melhor alternativa.

Algumas pesquisas também compararam os resultados de testes sorológicos com de qPCR. As conclusões também foram divergentes, principalmente em estudos que indicam soroconversão após tratamento com droga tripanocida. No estudo de Jackson *et al.* (2013), após tratamento com Nifurtimox, 75.7% pacientes positivos no ELISA apresentaram significativa redução nas concentrações de anticorpos anti-*T. cruzi*. As cPCRs de nDNA realizadas após tratamento foram todas negativas, enquanto que a qPCR de nDNA detectou apenas um caso positivo. Os autores sugerem a soroconversão após terapia medicamentosa. Hidron *et al.*, (2010), por sua vez, identificaram 64% dos indivíduos do estudo como positivos para infecção por *T. cruzi* detectada por sorologia. Destes, 43% tiveram resultados positivos na cPCR de kDNA e 82% tiveram resultados positivos na qPCR de nDNA. Neste trabalho a qPCR apresentou maior especificidade em relação à sorologia e à cPCR. Llano *et al.*(2014) usaram a qPCR como métodos confirmatório de diagnóstico. Eles realizaram qPCR de nDNA em quatro indivíduos com resultados sorológicos contraditórios e concluiu que três deles estavam realmente infectados pelo *T. cruzi*.

Desta forma, os estudos analisados na RS trouxeram informações relevantes sobre o uso da qPCR na doença de Chagas. Entretanto, é difícil eleger o método, os iniciadores ou o sistema de detecção mais sensível e específico, pois a literatura diverge bastante. A RS apontou a carência de protocolos padronizados para a identificação das infecções pelo *T. cruzi* e a necessidade de mais estudos sobre a utilização da qPCR na doença de Chagas.

## 2. ANÁLISE EXPERIMENTAL

### 2.1 ASPECTOS GERAIS

Os métodos de diagnóstico da doença de Chagas vêm sendo foco de muitos estudos nos últimos anos, justamente pelas discordâncias existentes entre eles (Murcia *et al.*, 2010; Zulantay *et al.*, 2011; Schijman *et al.*, 2011; Murcia *et al.*, 2013; Fumadó *et al.*, 2014; Guevara *et al.*, 2014). Tal discordância foi observada neste trabalho, onde vários indivíduos tiveram resultados divergentes nos métodos moleculares e sorológicos. Por exemplo, no grupo duvidoso, alguns indivíduos tiveram os resultados inconclusivos pela análise sorológica, mas apresentaram amplificação por marcadores específicos. Assim, os achados presentes neste estudo reforçam a necessidade de técnicas de diagnóstico mais efetivas que possam ser utilizadas em laboratórios de análises clínicas como padrão-ouro para identificação das infecções pelo *T. cruzi*.

O presente estudo sugere que o diagnóstico por métodos moleculares, quando realizado com cautela, pode garantir resultados mais confiáveis que os sorológicos. Os testes mostraram que o marcador molecular específico para nDNA do *T. cruzi* foi capaz de amplificar o DNA de 33 indivíduos dos diferentes grupos estudados, mostrando a infecção ativa dos mesmos. Os testes com os marcadores moleculares específicos para identificação de regiões de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* amplificaram em 100% dos indivíduos estudados, fato que pode estar associado à integração de sequências de de kDNA do parasito no genoma humano. Isso já foi demonstrado, por exemplo por Hecht *et al.* (2010). Diferentemente, os marcadores moleculares específicos para amplificação dos maxicírculos de kDNA foram capazes de identificar apenas 22 indivíduos como positivos. Portanto, o presente trabalho documenta a necessidade de um diagnóstico mais sensível e específico para a doença de Chagas, evitando a utilização de marcadores moleculares de minicírculos de kDNA.

## 2.2 USO DA qPCR PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Diversas etapas dos protocolos para diagnóstico por biologia molecular da doença de Chagas foram avaliadas em nosso estudo, a iniciar pelo método de extração do DNA, fator que influencia diretamente o rendimento da qPCR (Nacham *et al.*, 2016; Saavedra *et al.*, 2016). De fato, a obtenção de DNA puro e de alta qualidade é pré-requisito para análises moleculares. Inúmeros protocolos são descritos e um grande número de kits comerciais foi desenvolvido com o objetivo de eliminar contaminantes que podem prejudicar o desempenho da técnica de biologia molecular que será posteriormente realizada (Bienvenu *et al.*, 1999). Já foi demonstrado por PCR que a sensibilidade de detecção do DNA alvo pode ser diferente em função do kit comercial utilizado (Yoshikawa *et al.*, 2011).

No presente estudo foram usadas três técnicas de extração: manual com solvente orgânico (fenol-clorofórmio), kit comercial com coluna com membrana de sílica e kit comercial sem coluna. Como as amostras de DNA obtidas com fenol-clorofórmio não passaram por outro tipo de extração, os dados não podem ser facilmente usados para comparação.

Neste trabalho, a extração com fenol-clorofórmio gerou maiores quantidades de DNA quando comparado às outras técnicas usadas. Esse resultado também foi obtido por Moreira *et al.* (2013). Entretanto, o uso deste método requer cuidado, pois os reagentes são bastante tóxicos. Por essa razão não é o procedimento de escolha quando se trabalha com um grande número de amostras.

No grupo positivo, dez amostras de sangue foram extraídas duas vezes utilizando dois kits comerciais diferentes. Verificamos que maiores quantidade de DNA foram isoladas com kit que não utiliza coluna. Entretanto, o rendimento final, dado pela relação quantidade de DNA obtido/volume inicial de sangue, foi equivalente. Em relação à qualidade e pureza do DNA isolado, ambos tiveram bons resultados, com a relação da taxa de absorbância em 260 nm e 280 nm próxima a 1.8. Cada kit comercial possui suas especificidades gerando certas vantagens e desvantagens. Dessa forma, quando se procura grandes quantidades de DNA, este trabalho sugere que a melhor opção sejam os kits sem coluna, pois eles geralmente permitem a extração de volumes maiores de amostra. Mesmo quando não há muito material biológico inicial é possível a utilização desses kits adaptando o volume de alguns reagentes do kit, como a diminuição da quantidade do tampão de eluição. Isso pode permitir a obtenção de DNA

mais concentrado (Duffy *et al.*, 2013; Vital, 2014). Outra opção é a escolha de um kit comercial mais adaptado para pequenas quantidades de amostra. Ao se escolher o método de extração de ácidos nucleicos deve-se levar em consideração a origem do material biológico (sangue, tecido, entre outros), o tipo de material genético (nuclear, mitocondrial, características gênicas do organismo, entre outros), o número de cópias do alvo a ser amplificado e o método de biologia molecular que será posteriormente utilizado (Bienvenu *et al.*, 1999).

Em estudos conduzidos por alguns autores, o uso da qPCR se mostrou mais eficiente no diagnóstico da doença de Chagas do que a técnica de cPCR (Hidron *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2013; Piron *et al.*, 2007). Nesse estudo foi observado que algumas amostras do grupo duvidoso que possuíam cPCR negativa tiveram resultados positivos na qPCR. Além de permitir a análise da carga parasitária, a qPCR apresenta uma maior sensibilidade para a identificação do *T. cruzi* que a cPCR (Piron *et al.*, 2007). A vantagem da qPCR é a possibilidade de detecção de indivíduos com baixa carga parasitária. Isso pode não acontecer na cPCR, onde a visualização da banda no gel é uma análise subjetiva. Entretanto, alguns autores como Apt *et al.* (2015) sugeriram que a sensibilidade das reações de amplificação convencional e quantitativa sejam semelhantes. Esses autores mostraram que a cPCR e qPCR foram positivas em 80% e 86%, respectivamente, em indivíduos com cardiomiopatia chagásica. No grupo de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* na fase crônica da doença sem a cardiomiopatia chagásica, a taxa de positividade tanto da cPCR, quanto da qPCR, foi de 70%.

Nas cPCRs de nDNA realizadas com concentrações diferentes de *T. cruzi*, o iniciador com o melhor limite de detecção no presente estudo foi o TcZ3/TcZ4, amplificando todas as amostras ( $10^6$  a  $10^4$  par. eq./mL). Verificando a amplificação das mesmas amostras com os marcadores específicos de minicírculos de kDNA, o que obteve maior sensibilidade foi o S34/S67 que também detectou o parasito em todas as concentrações testadas. Os iniciadores S35/67R foram capazes de amplificar as cinco amostras *T. cruzi* mais concentradas. Em relação às cPCRS realizadas com iniciadores de maxicírculos especialmente desenhados para este estudo, o ND4/ND4R e o COII/COIIR tiveram desempenho semelhantes, com sensibilidade para detecção até a concentração de  $10^3$  par. eq./mL.

Em relação à qPCR, todas as amostras de *T. cruzi* testadas ( $10^6$  a  $10^4$  par. eq./mL) foram positivas para nDNA e para os minicírculos de kDNA, tanto com o par de iniciadores S36/67R quanto com o S34/S67. Diferentemente do que ocorreu com os

iniciadores para regiões de maxicírculos de kDNA (ND4/ND4R) que detectaram o *T. cruzi* apenas até a concentração de 1 par. eq./mL. No trabalho de Ramírez *et al.* (2015) com indivíduos com doença de Chagas crônica, a sensibilidade da técnica de qPCR usando nDNA e kDNA foi semelhante (80.69% e 84.14%, respectivamente) como observado no presente estudo. Entretanto, Ramírez *et al.* (2015) evidenciaram que treze amostras tiveram resultados discordantes na qPCR, sendo nove positivas para kDNA e negativas para nDNA. Os autores sugeriram que essa divergência poderia estar relacionada com a baixa quantidade de parasito nessas treze amostras. Hecht *et al.*, (2010) demonstraram discrepância nos resultados moleculares de descendentes de cinco famílias com genitores positivos para a infecção ativa para doença de Chagas. Foi observado que indivíduos com ausência de nDNA de *T. cruzi* eram positivos para kDNA. A clonagem e sequenciamento dos produtos de PCR permitiram explicar o fenômeno. Os autores demonstraram a integração de sequências de minicírculos de kDNA nos indivíduos analisados. Por essa razão, pode-se dizer que iniciadores que amplificam o DNA nuclear do parasito são melhores para a detecção das infecções pelo *T. cruzi*, pois essa região do genoma do parasito não se integra no genoma do hospedeiro. No presente estudo, o par de iniciadores TcZ3/TcZ4 foi mais sensível e mais específico na detecção do *T. cruzi* sendo uma boa opção para o diagnóstico das infecções ativas. Moser *et al.* em 1989 já destacaram o interesse na utilização do nDNA como sequência alvo ideal para a amplificação do DNA do *T. cruzi*.

Neste aspecto, o desenho de iniciadores específicos para regiões de maxicírculos de kDNA representa uma inovação para o diagnóstico da doença de Chagas. Diferentemente do que ocorre com o minicírculo de kDNA, a literatura não evoca a integração de sequências de maxicírculos de *T. cruzi* no genoma do hospedeiro. Entretanto, a demora na padronização do método de qPCR com iniciadores de maxicírculos não permitiram a obtenção de resultados definitivos. As amplificações de regiões de maxicírculos observadas em amostras negativas para nDNA sugerem a integração desta região do genoma do *T. cruzi* no homem. Por essa razão, estamos fazendo um esforço em melhorar as reações de qPCR com os iniciadores de maxicírculos para sequenciar os produtos e verificar através de análise de bioinformática a especificidade da amplificação e integração ou não no genoma humano. Dessa forma, maiores esforços devem ser realizados para viabilizar o uso de iniciadores de maxicírculos para o diagnóstico da doença de Chagas, que traria como vantagem a utilização de um marcador que não forma catâmeros.

Apesar da grande vantagem do método de qPCR ser a anulação da necessidade de análises posteriores, como a eletroforese (Schijman *et al.*, 2011), nosso estudo demonstrou que em alguns casos a falta dessa etapa provoca resultados errôneos no diagnóstico das infecções pelo *T. cruzi*. A análise eletroforética combinada com a avaliação das curvas de dissociação e de amplificação obtidas na qPCR permitem um diagnóstico mais preciso. Entretanto, nenhum estudo com o método de qPCR realiza essa etapa posterior. Esse fato fica evidente na RS: dos 27 artigos analisados, nenhum deles realizou a análise eletroforética dos produtos amplificados. De interesse, os duplos-picos recorrentes na curva de dissociação, que poderiam representar a formação de dímeros de marcadores específicos ou a formação de produtos inespecíficos, foram descartados após verificação eletroforética. Moraes (2016) identificou que o acúmulo das integrações de kDNA no genoma do hospedeiro propencia a formação de um segundo pico na curva de dissociação. Isso foi observado neste estudo, onde todos os sujeitos tiveram amplificação positiva para minicírculos de kDNA (com os oligonucleotídeos S34/S67 e S36/67R).

Neste contexto, é de extrema importância a discussão sobre o uso do kDNA como alvo preferencial para amplificação por PCR. Devido ao elevado número de cópias, os minicírculos de kDNA têm sido bastante usados como diagnóstico em estudos com animais (Jiménez-Coelho *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013; Castro-Sesquen *et al.*, 2013; Cominetti *et al.*, 2013; Jaramillo *et al.*, 2014) e humanos (Ortiz *et al.*, 2012; Rumi *et al.*, 2013; Saavedra *et al.*, 2013). Martínez *et al.*, (2013) afirma que a amplificação do kDNA tem maior sensibilidade em comparação com a amplificação do nDNA, permitindo a detecção de um parasito em 100 mL de sangue (0,005 par. eq./mL). Analisando a literatura, notamos a predileção por utilizar a amplificação de minicírculos de kDNA em reações de cPCR, escolhidos por representarem aproximadamente 30% do DNA total do parasito (Ray, 1989; Westenberger *et al.*, 2006). Sendo assim, a sensibilidade maior do kDNA poderia estar relacionada à quantidade de DNA presente no parasito, mas também às sequências que estão amplamente distribuídas no genoma do hospedeiro (Hecht *et al.*, 2010). Assim, a identificação da infecção ativa baseada em diagnóstico molecular com iniciadores específicos para minicírculos de kDNA pode gerar resultados errôneos. A RS mostrou que nas qPCRs existe a preferência por iniciadores que amplificam o DNA nuclear do *T. cruzi*.

Em relação à qPCR com a técnica SYBR Green, é fundamental destacar a importância da correta interpretação dos resultados através da análise das curvas de amplificação e principalmente de dissociação. Alguns estudos utilizam a análise da curva de dissociação como ferramenta para, por exemplo, definição de genotipagem viral ou bacteriana (Liu *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2016). A curva de dissociação permite a verificação da especificidade do fragmento amplificado. Isto é importante, pois a presença de produtos inespecíficos ou dímeros de iniciadores reduz a eficiência da reação.

Entretanto, o duplo-pico às vezes observado nem sempre significa um problema. A melhor maneira de avaliar isso é por análise eletroforética, embora seja um procedimento trabalhoso e demorado. Uma outra alternativa é verificar se a temperatura de dissociação ocorre em mais de uma fase, ideia relativamente nova e que foge da interpretação tradicional da curva de dissociação. Na realidade, a curva de dissociação é gerada após a amplificação por qPCR com SYBR Green aquecendo o produto amplificado. À medida que a temperatura vai aumentando, o DNA vai se desnaturando em fita simples, diminuindo a fluorescência que estava associada às fitas duplas. Esse efeito pode ser facilmente observado na curva de dissociação normalizada, onde a mudança na inclinação da curva é traçada em função da temperatura. A curva resultante indica o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos iniciadores de suas sequências alvo ( $T_m$ ).

Tradicionalmente a interpretação desta curva é feita baseada na ideia de que o produto de qPCR está ou em forma fita simples ou em fita dupla, desconsiderando a possibilidade de um estado intermediário. Contudo, isto é muitas vezes observado. De fato, nem sempre a dissociação acontece em uma só fase. Quando esta ideia é levada em consideração, os dados podem ser interpretados de maneira diferente. Muitas vezes, quando o DNA fita dupla começa a ser desnaturado, regiões do produto de qPCR que são mais estáveis, devido a maior quantidade de C/G, a desnaturação não ocorre de imediato. Essas regiões de maior estabilidade mantem o DNA em fita dupla por mais tempo, até que a temperatura seja suficientemente alta para provocar a dissociação dessas regiões da fita. Como consequência, observa-se a curva de dissociação em duas fases (Downey, 2014). Em nosso estudo isso foi observado diversas vezes, como ilustrado na **Figura 25 A, B**, onde inferiu-se que o duplo-pico observado não estava associado a dímeros de iniciadores e nem a produtos inespecíficos, pois a curva de amplificação mostrou a existência do mesmo padrão de amplificação para todas as

amostras (controle e amostras experimentais). Os trabalhos que mostraram a integração do DNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro, como por exemplo, Hecht *et al.* (2010) em humanos e mais recentemente Moraes (2016) em macrófagos de camundongos corroboram esta análise e resultados.

Diante do exposto, percebe-se que o desempenho das técnicas de qPCR envolve a escolha cuidadosa do método de obtenção dos ácidos nucléicos, dos iniciadores, da sequência alvo e do protocolo a ser utilizado (condições de termociclagem, quantidade de material a ser amplificado, quantidade de reagentes, entre outros). Outra importante forma de se conseguir resultados robustos nas reações de qPCR é a análise da curva de dissociação. Nossos resultados sugerem que o protocolo mais indicado para o diagnóstico da doença de Chagas deve utilizar iniciadores que amplificam o nDNA do parasito. Nossos resultados indicam que o par de iniciadores TcZ3/TcZ4 é uma boa opção. Eles amplificam somente regiões de nDNA e não apresenta o risco de falsos positivos, sendo muito específico e sensível. Inovações nas técnicas de qPCR devem ser implementadas para aprimorar essa metodologia.

## VII CONCLUSÕES

O presente trabalho fez um estudo a partir uma abordagem teórico-metodológica sobre uso da biologia molecular no diagnóstico da doença de Chagas. A revisão sistemática apontou para a necessidade de validação e padronização de um protocolo de qPCR que possa ser usado internacionalmente para a detecção das infecções pelo *T. cruzi*. Entre as várias condições relevantes para a qualidade dos resultados da qPCR estão a extração dos ácidos nucléicos, a concentração, qualidade e pureza das amostras a serem amplificadas, a região alvo, a seleção dos iniciadores, o tipo e qualidade dos reagentes, o sistema de detecção, a condições de termociclagem, entre outros. O ideal é a validação de um método específico com alta sensibilidade e custo reduzido permitindo a manipulação de várias amostras através de um procedimento relativamente simples e rápido. Isso permitiria a aplicação em rotina em laboratórios de análises clínicas.

A resposta para a pergunta principal da RS aponta que o marcador molecular mais utilizado para o diagnóstico por qPCR em população humana, é aquele que amplifica a região nuclear do DNA de *T. cruzi* (diferentes iniciadores são usados). Entretanto ainda há muitos estudos que trabalham com a amplificação do kDNA do parasito, desconsiderando que sequências de minicírculos do parasito podem ser integradas no genoma humano, podendo levar a um diagnóstico incorreto.

A análise de extração de DNA permitiu observar que a técnica manual com fenol-clorofórmio gerou maiores quantidades de DNA quando comparado às outras técnicas usadas. Em relação à qualidade e pureza do DNA isolado pelos dois kits de extração comercial, ambos tiveram bons resultados.

Nas cPCRs de nDNA realizadas com concentrações diferentes de *T. cruzi*, o iniciador mais sensível no presente estudo foi o TcZ3/TcZ4. Nas análises de minicírculos de kDNA o que obteve maior sensibilidade foi o S34/S67 que também detectou o parasito em todas as concentrações testadas. Em relação às cPCRS realizadas com iniciadores de maxicírculos, especialmente desenhados para este estudo, o ND4/ND4R e o COII/COIIR tiveram desempenho semelhantes, com sensibilidade para detecção até a concentração de  $10^3$  par. eq./mL.

Todas as amostras de *T. cruzi* testadas por qPCR foram positivas para nDNA e para os minicírculos de kDNA (com ambos os pares de iniciadores). Diferentemente dos

iniciadores para regiões de maxicírculos de kDNA que detectaram o *T. cruzi* apenas até a concentração de 1 par. eq./mL.

Os estudos experimentais realizados nesta dissertação trouxeram várias respostas e elementos importantes a serem levados em consideração para a utilização da qPCR como método diagnóstico para as infecções pelo *T. cruzi*. O par de iniciadores TcZ3/TcZ4 foi mais sensível e mais específico na detecção do *T. cruzi* sendo uma boa opção para o diagnóstico das infecções ativas. Porém, demonstrou que em alguns casos a falta da análise eletroforética provocar resultados errôneos no diagnóstico das infecções pelo *T. cruzi*. Assim, a análise eletroforética combinada com a avaliação das curvas de dissociação e de amplificação obtidas na qPCR permitem um diagnóstico mais preciso.

Entretanto não foi possível a escolha de um protocolo padrão-ouro. Os resultados sugerem a utilização de iniciadores de nDNA do *T. cruzi* (TcZ3/TcZ4) no diagnóstico de infecções ativas para a doença de Chagas.

## VIII PERSPECTIVAS

O presente estudo permitiu verificar como marcadores de nDNA, de minicírculos e de maxicírculos de kDNA de *T.cruzi* se comportam no diagnóstico da doença de Chagas em uma população residente em regiões não endêmica e com resultados sorológicos variados. Os resultados aqui apresentados chamam a atenção para a necessidade de novas investigações, para que as muitas questões em suspenso possam ser respondidas. Ainda falta validar um teste de biologia molecular para a detecção do *T. cruzi*. Mais investigações com iniciadores que permitam a amplificação das regiões de maxicírculos dos parasitos devem ser realizadas, principalmente para verificar se existe integração dessas regiões no genoma do hospedeiro. Além disso, as qPCRs deste estudo foram realizadas apenas com o sistema de detecção SYBR Green. Seria extremamente interessante a realização de qPCR com os diferentes iniciadores com o sistema de sonda de hidrólise (TaqMan).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F. *et al.* On palms, bugs, and Chagas disease in the Americas. **Acta Tropica**. 151: 126–141, 2015. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.07.005.

AFFRANCHINO, J.L. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: structure and transcription of kinetoplast DNA maxicircles of cloned stocks. **The Journal of Protozoology**. 33(4): 503-7, 1986.

AFONSO, A. M; EBELL, M. H; TARLETON, R.L. A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 6(11), 1881, 2012.

ALKMIM-OLIVEIRA, S. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* experimental congenital transmission associated with TcV and TcI subpatent maternal parasitemia. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 671–678, 2013.

ALMEIDA B. R.; SANTILIANO F. C. Levantamento dos métodos de diagnóstico para a doença de Chagas. **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer**. v.8, nº 14, p. 1586, 2012.

ÁLVAREZ, M. G. *et al.* New Scheme of Intermittent Benznidazole Administration in Patients Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*: a Pilot Short-Term Follow-Up Study with Adult Patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 833–837, 2015.

AMATO-NETO, V. *et al.* False-positive results of a rapid K39-based strip test and Chagas disease. **International Journal of Infectious Diseases** (13):182-185, 2009. DOI: 10.1016/j.ijid.2008.06.003.

ANDERSSON, J.O. Lateral gene transfer in eukaryotes. **Cellular And Molecular Life Sciences**. 62(11):1182-97, 2005.

APT, W. *et al.* *Trypanosoma cruzi* burden, genotypes, and clinical evaluation of Chilean patients with chronic Chagas cardiopathy. **Parasitology Research**, v. 114, n. 8, p. 3007–3018, 2015.

APT, W. *et al.* Treatment of Chagas' disease with itraconazole: electrocardiographic and parasitological conditions after 20 years of follow-up. **Journal Antimicrob Chemother**.68: 2164–2169, 2013. DOI: 10.1093/jac/dkt135

ARAGÃO, MMB. Herança e fixação de minicirculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de chagásicos e seus familiares. **Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular**, Universidade de Brasília, 155 páginas, 2013.

BARRETT, MP. *et al.* The trypanosomiases. **Lancet**. 362(9394): 1469-1480, 2003.

BENVENUTI, L. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* persistence in the native heart is associated with high-grade myocarditis, but not with Chagas' disease reactivation after heart transplantation. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 33, n. 7, p. 698–703, 2014.

BIANCHI, F. *et al.* Follow-up of an Asymptomatic Chagas Disease Population of Children after Treatment with Nifurtimox (Lampit) in a Sylvatic Endemic Transmission Area of Colombia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1–16, 2015.

BIENVENU, T. *et al.*, Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. **Annales de Biologie Chimique**. Volume 57(1): 77-84, 1999.

BILATE, A.M; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 50(2): 67-74, 2008.

BLANCHET, D. *et al.* First report of a family outbreak of Chagas disease in French Guiana and posttreatment follow-up. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 245–250, 2014.

BERNARDO W.M.; NOBRE M.R.C.; JANETE F.B. A prática clínica baseada em evidências. Parte II: buscando as evidências em fontes de informação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 50(1):104-8, 2004.

BONNEY, K.M; ENGMAN, D.M. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. **American Journal of Pathology**. 185(6): 1537-47, 2015. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.12.023

BONNEY, K.M; ENGMAN, D.M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? **Current Molecular Medicine**. 8(6): 510-518, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância da Saúde. [Brazilian Consensus on Chagas disease]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 38 (SUPPL 3): 7-29, 2005a.

BRASIL, **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância da Saúde**. Doença de Chagas aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina. 2005b.

BRENER, Z; ANDRADE, Z. A; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. **Guanabara Koogan**, 2 ed 431p. 2000

BUA, J. *et al.* How to Improve the Early Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection: Relationship between Validated Conventional Diagnosis and Quantitative DNA Amplification in Congenitally Infected Children. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. 12–14, 2013.

BUSTIN, S.A *et al.*, The need for transparency and good practices in the qPCR literature. **Nat Methods**. 10(11):1063-7, 2013. DOI: 10.1038/nmeth.2697.

BUSTIN, S.A *et al.*, MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. **BMC Molecular Biology**. 11:74, 2010. DOI: 10.1186/1471-2199-11-74.

BUSTIN, S.A *et al.*, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**. 55(4):611-22, 2009. DOI:10.1373/clinchem.2008.112797. Epub 2009 Feb 26.

CANCINO-FAURE, B. *et al.* Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. **Transfusion**, v. 55, n. 6, p. 1249–1255, 2015.

CASTILLO, C. *et al.* Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi. **Placenta**, v. 33, n. 12, p. 991–997, 2012.

CASTRO, E. Chagas' disease: lessons from routine donation testing. **Transfusion Medicine**. 19(1): 16-23, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2009.00915.x.

CASTRO-SESQUEN, Y. E. *et al.* Use of a Chagas Urine Nanoparticle Test (Chunap) to Correlate with Parasitemia Levels in *T. cruzi*/HIV Co-infected Patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. 1–16, 2016.

CASTRO-SESQUEN, Y. E. *et al.* Detection of Soluble Antigen and DNA of *Trypanosoma cruzi* in Urine Is Independent of Renal Injury in the Guinea Pig Model. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–10, 2013.

CENCIG, S. *et al.* Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome?? in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 6, p. 527–532, 2012.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Parasites-American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>> Acessado em 12 de abril de 2016.

CHAGAS C. Nova tripanozomiose humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 159-218, 1909.

COMINETTI, M. C. *et al.* Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 277–280, 2013.

COURA J.R; DIAS J.C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1: 31-40, 2009.

COURA, J.R. The Discovery of Chagas disease (1908-1909): great successes and certain misunderstandings and challenges. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 46(4): 389-390, 2013. DOI: 10.1590/0037-8682-0143-2013.

COURA, J.R; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 106(6):641–5. 17, 2011.

COURA, J.R; MOREIRA, C.J.C; JUNQUEIRA, A.C.V. Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscópicos de Malária e Laboratoristas de rede pública. **Organização Pan-Americana da Saúde**. Módulo 1: 1191-69, 2012. Disponível em: <http://www1.paho.org/cdmedia/manualchagas2012/pdf/modulo1.pdf> Acessado em: abril de 2016.

CUERVO, P; DOMONT, G.B; DE JESUS, J.B. Proteomics of trypanosomatids of *Schyzotrypanum cruzi*, the cause of new human disease. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 1: 159-218, 1909.

CUNHA-NETO, E. *et al.*, Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. **Autoimmunity**. 39(1): 41–54, 2006.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-b13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **The Journal of Clinical Investigation**. 98(8): 1709-12, 1996.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. **Mediators of Inflammation**. 2014: 683230, 2014. DOI: 10.1155/2014/683230. Epub 2014 Aug 19.

CURA, C. I. *et al.* Early molecular diagnosis of acute chagas disease after transplantation with organs from *Trypanosoma cruzi* infected donors. **American Journal of Transplantation**, v. 13, n. 12, p. 3253–3261, 2013.

DEGRAVE, W. *et al.* Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 27(1):63–70, 1988.

DIAS, J.C.P; AMATO NETO, V. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 44(2), 2011. DOI: 10.1590/S0037-86822011000800011

DOCAMPO, R. *et al.* Acidocalcisomes — conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**. 3(3):251-261, 2005.

DOMINGUES, C.S. *et al.* Oral Outbreak of Chagas Disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental Evaluation of a Patient's Strain. **PLOS ONE**.10(10):e0122566, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0122566.

DOWNEY, N. Interpreting melt curves: an indicator, not a diagnosis. skite da Integrated DNA Technologies. 2014. Disponível em: <<https://www.idtdna.com/pages/decoded/decodedarticles/coreconcepts/decoded/2014/01/20/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis>> Acessado em 07 de julho de 2016.

DORN, P. *et al.* Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana. **Emerging Infectious Diseases**. 13(4): 605-607, 2007.

DORN, P. L. *et al.* Low prevalence of Chagas parasite infection in a nonhuman primate colony in Louisiana. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 51, n. 4, p. 443–7, 2012.

DUARTE, L.F; FLÓREZ, O; RINCÓN, G; GONZÁLVEZ, C.I. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. **Colombia médica**. 45(2), 2014.

DUFFY, T. *et al.* Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.

DUFFY, T. *et al.* Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 4, 2009.

ENRIQUEZ, G.F. *et al.* High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans* support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission. **Infection, Genetics and Evolution**. 25:36–43, 2004.

EYNON E.E, PARKER D.C. Parameters of tolerance induction by antigen targeted to B lymphocytes. **Journal of Immunology**. 151(6):2958-64, 1993.

FERNANDES, C.D. *et al.* Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 104(1): 27-32, 2009.

FLEGONTOVA, LUKES, J; FLEGONTOV, P. Lack of evidence for integration of *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA in South American human genomes. **International Journal for Parasitology**. 42(5):437-41, 2012. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.04.001.

FREITAS, V. L. T. *et al.* Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: Association with HIV viral load and CD4 + level. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, 2011.

FUMADÓ, V. *et al.* Chagas pediátrico en zona no endémica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. 5, p. 293–296, 2014.

GADELHA, A. *et al.* Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA and the haemagglutination test. **Vox Sanguinis**. 85 (3): 165-170, 2003.

GARCIA, E.S. *et al.* Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. **Journal of Insect Physiology** 53:11–21, 2007.

GASCON J; BERN C; PINAZO M.J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**. 115 (1-2):22–27, 2010. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.07.019.

GILBER, SR.. *et al.* Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 46(3): 310-5, 2013.

GILBERT, C. *et al.* A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla. **Nature**. 464(7293): 1347-1350, 2010.

GITAL D.L.G. *et al.*, Genes e epilepsia I: epilepsia e alterações genéticas. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 54(3): 272-8, 2008.

GRANJON, E. *et al.* Development of a Novel Multiplex Immunoassay Multi-*cruzi* for the Serological Confirmation of Chagas Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004596, 2016.

GREENHALGH T. Papers that summarise other papers (systematic review and meta-analyses). **BMJ**. 13(315):675-75, 1997.

GUEVARA, Á. *et al.* First description of *Trypanosoma cruzi* human infection in Esmeraldas province, Ecuador. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 358, 2014.

GUTIERREZ, F.R.S; GUEDES, P.M.M; GAZZINELLI, RTLIVA, J.S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, 31: 673-685, 2009.

HECHT, M.M. *et al.* Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. **PLOS One**. 5(2): e9181, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0009181

HIDRON, A. I. *et al.* Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, 2010.

HIGUCHI, M.D.E. *et al.* Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**. 60(1): 96-107, 2003.

HOARE, C. The trypanosomes of mammals, a zoological monograph. **Blackwell Scientific Publications**, p.749, 1972.

HOARE, C.A. The trypanosome of mammals. **Journal os Small Animal Practice**. 13(11):671-672, 1972. DOI: 10.1111/j.1748-5827.1972.tb06818.x

HOTZ P. *et al.* An Unfolding Tragedy of Chagas Disease in North America. **PLOS Neglected Tropical Disease**, Vol 7(10): 1 – 4, 2013.

HOWARD, E.J. *et al.* Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. **An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**. 121(1):22-33, 2014. DOI: 10.1111/1471-0528.12390.

HU, Y.L *et al.*, Rapid identification of the NAT2 genotype in tuberculosis patients by multicolor melting curve analysis. **Pharmacogenomics**. 2016.

JACKSON, Y. *et al.* Serological and parasitological response in chronic Chagas patients 3 years after nifurtimox treatment. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 85, 2013.

JIMÉNEZ-COELLO, M. *et al.* Epidemiological survey of *Trypanosoma cruzi* infection in domestic owned cats from the tropical southeast of Mexico. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, n. SUPPL.2, p. 102–109, 2012.

JOHNSON, G.; NOLAN, T.; BUSTIN, S.A. Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. **Methods in Molecular Biology**. 943:1-16, 2013. DOI: 10.1007/978-1-60327-353-4\_1.

JOHNSON, G. *et al.*, Minimum information necessary for quantitative real-time PCR experiments. **Methods in Molecular Biology**. 1160:5-17, 2004. DOI: 10.1007/978-1-4939-0733-5\_2.

JÚNIOR, A.C.M.S. *et al.* Unveiling the *Trypanosoma cruzi* Nuclear Proteome. **PLOS ONE**. 10(9): e0138667, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0138667

JUNQUEIRA A.C.V; DEGRAVE W; BRANDÃO A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends in Parasitology**. 21(6): 270-272, 2005.

JUNQUEIRA, C. *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. 12: e29, 2010. DOI: 10.1017/S1462399410001560

KATZ, L.A. Lateral gene transfers and the evolution of eukaryotes: theories and data. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 52(.5): 1893-1900, 2002.

KEELING, P.J. Functional and ecological impacts of horizontal gene transfer in eukaryotes. **Current Opinion in Genetics e Development**. 19(6): 613-619, 2009.

KEELING, P.J; PALMER, J.D. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. **Nature Reviews Genetics**. 9(8): 605-618, 2008.

KIRCHHOFF, L.V; VOTAVA, J.R; OCHS, D.E; MOSER, D.R. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Microbiology**. 34:1171-1175, 1996.

KJOS, S.A. *et al.* Identification of bloodmeal sources and *Trypanosoma cruzi* infection in triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidea) from residential settings in Texas, the United States. **Journal of Medicine Entomology**. 50(5): 1126-1139, 2013.

KLINGBEIL, M.M. *et al.* Unlocking the secrets of trypanosome kinetoplast DNA network replication. **Protist**. 152: 255-262, 2001.

KRISHNAMOORTHY, G. *et al.* Myelin-specific t cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. **Nature Medicine**. V. 15, N. 6, P. 626-32, 2009. DOI: 10.1038/nm.1975.

LAURIA-PIRES, L. *et al.* Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 63(3-4): 111-8, 2000.

LAURIA-PIRES, L. *et al.* Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 63: 111-118, 2000.

LEON, JS; ENGMAN, DM. Autoimmunity in Chagas heart disease. **International Journal for Parasitology**. 31: 555-561, 2001.

LEON, W. *et al.* Maxi-circles and mini-circles in kinetoplast DNA from *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta**. 607(2):221-31, 1980.

LIU, B; LIU, Y; MOTYKA, S.A; AGBO, E.E; ENGLUND, P.T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. **Trends in Parasitology**. 21(8): 363-9, 2005.

LIU, H. *et al.* Widespread horizontal gene transfer from double-stranded RNA viruses to eukaryotic nuclear genomes. **Journal of Virology**. 84(22): 11876-87, 2010. DOI: 10.1128/JVI.00955-10. Epub 2010 Sep 1.

LIU, W.C.L. *et al.*, Simultaneous quantification and genotyping of hepatitis B virus for genotypes A to G by real-time PCR and two-step melting curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. 44(12):4491-7, 2006.

LIU Y; ENGLEND P.T. The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication. **Molecular Microbiology**. 64(3): 676-690, 2007.

LLANO, M. *et al.* Evaluación preliminar de la prueba comercial Chagas (*Trypanosoma cruzi*) IgG-ELISA ® en individuos colombianos. **Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 34, p. 228–236, 2014.

LORETO, EL; CARARETO, CM; CAPY, P. Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. **Heredity**. 100(6): 545-554, 2008.

LUKES J, *et al.* Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. **Eukaryot Cell** 1: 495–502, 2002.

LUKES, J. *et al.* Kinetoplast DNA Network: evolution of an improbable structure. **Eukaryotic Cell**. 1(4): 495–502, 2002. DOI: 10.1128/EC.1.4.495-502.2002

LUKES, J; HASHIMI, H; ZÍKOVÁ, A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptoma in kinetoplastid flagellates. **Current Genetics**. 48: 277–299, 2005.

MACHADO, F.S. *et al.* Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments. **Cardiology in Review**. 20(2), 53–65, 2012.

MACHADO-DE-ASSIS, G.F. *et al.* A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with

benznidazole before and thirteen years after intervention. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 108(7): 873-880, 2013. DOI: 10.1590/0074-0276130122.

MARCON, G. E. B. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 85–91, 2011.

MARCON, G.E. *et al.* Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 43(1): 39–43, 2002.

MARCON, G.E.B. Detecção do DNA do *Trypanosoma cruzi* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em pacientes chagásicos crônicos. **Tese (mestrado em Ciências Médicas)**- Universidade Estadual de Campinas, 2001.

MARTÍNEZ, I; LANDÍN-CERVANTES, A; ESPINOZA, B. Diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas. **Gaceta Médica de México**. 149: 363-365, 2013.

MARTINS-MELO, FR; RAMOS, AN Jr; ALENCAR, CH; HEUKELBACH, J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin World Health Organization**.94(2): 103-10, 2016. DOI: 10.2471/BLT.15.152363.

MEIRA, W.S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**. 40(10): 3735–40, 2002.

MEJÍA-JARAMILLO, A. M. *et al.* Genotyping of *Trypanosoma cruzi* in a hyper-endemic area of Colombia reveals an overlap among domestic and sylvatic cycles of Chagas disease. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 108, 2014.

MELO, M. F. *et al.* Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. **Parasites & vectors**, v. 8, p. 154, 2015.

MENNA-BARRETO, R; SALOMÃO, K; BARBOSA, H.S. Bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. 104(Suppl I), 2009.

MESSENGER, L.A. *et al.* Multiple Mitochondrial Introgression Events and Heteroplasmy in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Maxicircle MLST and Next Generation Sequencing. **PLOS Neglected Tropical diseases**. 6(4): 1584, 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001584. Epub 2012 Apr 10.

MINUZZI-SOUZA, T.T. *et al.* Vector-borne transmission of *Trypanosoma cruzi* among captive Neotropical primates in a Brazilian zoo. **Parasites and Vectors**. 9(1):39, 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1334-7.

MORAES, A.S. Dinâmica das integrações de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma do hospedeiro. 2016. **Tese (Mestrado em Patologia Molecular)**. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

MOREIRA, O. C. *et al.* Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. **Acta Tropica**, v. 125, n. 1, p. 23–31, 2013.

MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V; DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 27, n. 7, p. 1477–1482, 1989.

MOTT K.E. *et al.* Parasitic diseases and urban development. **Bulletin of the World Health Organization**. 68(6):691–698, 1990.

MUÑOZ, C. *et al.* Evaluation of nifurtimox treatment of chronic Chagas disease by means of several parasitological methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 9, p. 4518–4523, 2013.

MURCIA, L. *et al.* Enferm Infecc Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. **Journal of Clinical Microbiology**. 31(Supl 1), 26-34, 2013.

MURCIA, L. *et al.* Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: A prospective study in a non-disease-endemic country. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1759–1764, 2010.

NACHAM, O.; CLARK, K. D.; ANDERSON, J. L. Extraction and Purification of DNA from Complex Biological Sample Matrices using Solid-Phase Microextraction Coupled with Real-Time PCR. **Analytical Chemistry** V(6):1861, 2016.

NASCENTE, F. M. Avaliação do perfil de parasitemia por hemocultura seriada em indivíduos infectados cronicamente pelo *Trypanosoma cruzi*. Goiânia-Go. Dissertação na área de concentração de parasitologia. **Universidade Federal de Goiás**, 2010.

NDAO, M. *et al.* Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1167–1178, 2014.

NDAO, M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys: Comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked Immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as Screening tests for evaluation of monkey-related injuries. **Comparative Medicine**. 50(6): 658–665, 2000.

NITZ, N. *et al.* Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease. **Cell**. 118(2): 174-186, 2004.

NOGUEIRA, N; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **The Journal of Experimental Medicine**, V. 143, N. 6, P. 1402-20, 1976.

NOIREAU, F. Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 104(Suppl. I), 60-64, 2009.

NOVAIS, AM; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**. Edição nº 33- Julho/dezembro, 2004.

ORTIZ, S. *et al.* Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases. **Acta Tropica**, v. 124, n. 3, p. 243–246, 2012.

PATERSON B. L. *et al.* Meta-study of qualitative health research: a practical guide to Meta-Analysis and Meta-Synthesis. **California: Sage publicacion**, 2001.

PAUL, WE. In fundamental immunology. **Raven Press**. 1989.

PEREIRA, CA. Autoinmunidad en la enfermedad de Chagas. **Medicina**.75: 262-263, 2015.

PEREZ-MOLINA, J.A. *et al.* Distribution of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Bolivian migrants in Spain. **Infection, Genetics and Evolution**. 21: 440–442, 2014. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.12.018.

PIRON, M. *et al.* Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta Tropica**. 103(3): 195–200, 2007.

PISHARATH, H. *et al.* Immunopathologic characterization of naturally acquired *Trypanosoma cruzi* infection and cardiac sequelae in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 52, n. 5, p. 545–52, 2013.

PULENDRAN, B.; KARVELAS, M.; NOSSAL, G. J. A form of immunologic tolerance through impairment of germinal center development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 91, n. 7, p. 2639–2643, 1994.

QVARNSTROM, Y. *et al.* Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 7, 2012.

RAMÍREZ *et al.*, Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. **Journal of Molecular Diagnostics**. 17(5): 605–615, 2015. DOI:10.1016/j.jmoldx.2015.04.010.

RASSI, A.Jr; RASSI, A; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **The Lancet**. 375:1388–1402, 2010.

RAY, DS. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of Trypanosomes. **Molecular and Cellular Biology**. 9(3): 1365-1367, 1989.

REQUENA, J.M. *et al.* Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 51(2): 271 – 280, 1992.

RIBEIRO, M. *et al.* Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. **Experimental Parasitology**. 162: 1-6, 2016. DOI: 10.1016/j.exppara.2015.12.017.

RIEMANN, K. *et al.* Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. 21(4): 244-8, 2007.

ROJO, G. *et al.* Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on *Trypanosoma cruzi* ex vivo infection of human placental chorionic villi explants. **Acta Tropica**, v. 132, n. 1, p. 112–118, 2014.

RUMI, M. M. M. *et al.* Benznidazole treatment in chronic children infected with *Trypanosoma cruzi*: Serological and molecular follow-up of patients and identification of Discrete Typing Units. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 130–136, 2013.

SAAVEDRA, M. *et al.* Quantification by real-time PCR of *Trypanosoma cruzi* DNA in samples of *Triatoma infestans* used in xenodiagnosis of chronic Chagas disease patients. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 382, 2016.

SAAVEDRA, M. *et al.* Chronic Chagas disease: PCR-xenodiagnosis without previous microscopic observation is a useful tool to detect viable *Trypanosoma cruzi*. **Biological Research**, v. 46, n. 3, p. 295–298, 2013.

SABINO E. C. *et al.* Enhanced classification of Chagas serologic results and epidemiologic characteristics of seropositive donors at three large blood centers in Brazil. **Transfusion Paris Dec**, 50(12):2628–37, 2010.

SAMBROOK, J. *et al.* Molecular cloning: A Laboratory Manual. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, ed. 2, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, 3<sup>a</sup> ed. 2001.

SANTANA, C.A. Influência da via de transmissão do *Trypanosoma cruzi* na carga parasitária e produção de anticorpos específicos. **Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas**, Universidade de Brasília, 2015.

SANTOS, F.L. *et al.* Chronic Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 2016.

SANTOS-BUCH, C.A; TEIXEIRA, A.R.L. The immunology of experimental Chagas disease. III. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. **The Journal of. Experimental Medicine**. 140(1): 38-53, 1974.

SCHAACK, S; GILBERT, C; FESCHOTTE, C. Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution. **Trends Ecology Evolution**. 25(9): 537-546, 2010.

SCHIJMAN, A.G. *et al.* International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 1;5(1):e931, 2011 DOI: 10.1371/journal.pntd.0000931

SCHMUNIS GA. A tripanossomiase americana e seu impacto na saúde pública das Americas. **Guanabara-Koogan**. 1–15, 2000.

SCHMUNIS GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**. 31(6):547–557, 1991.

SHENDER, L.A.; LEWIS, M.D.; REJMANEK, D.; MAZET, J.A.K. Molecular Diversity of *Trypanosoma cruzi* Detected in the Vector *Triatoma protracta* from California. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 10(1):e0004291, 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004291

SILVA VLC; LUNA EJA. Prevalência de infecção pelo *T. cruzi* em doadores de sangue nos hemocentros coordenadores do Brasil em 2007. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. 22(1):103-110, 2013.

SILVA, AR. Transmissão Sexual do *Trypanosoma cruzi* em *Mus musculus*. 94 páginas. **Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas**, Universidade de Brasília, 2013.

SILVEIRA, AC. Os novos desafios e perspectivas futuras do controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. vol. 44(II): 122-124, 2011.

SILVEIRA, J.F; UMEZAWA, E.S; LUQUETTI, A.O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends Parasitology**. 17(6): 286–91, 2001.

SIMÕES-BARBOSA, A. *et al.* Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 101(8): 833-843, 2006.

SIMPSON, L. Structure and function of kinetoplast DNA. **The Journal of Protozoology**. 20(1): 2-8, 1973.

SIMPSON, L. *et al.*, Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. **The Journal of Biological Chemistry**. 262(13):6182-96, 1987.

SOUSA, AO. Transferência de DNA de *Trypanosoma cruzi* para retrotransposons LINE-1 de camundongos chagásicos tratados com nitroderivado benzonidazol. **Tese (Doutorado em Patologia Molecular)** - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SOUZA, W. Novel cell biology of *Trypanosoma cruzi*. IN: american trypanosomiasis world class parasites. **World Class Parasites**. 7: 13-24, 2003.

SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 104(Suppl. I): 89-100, 2009.

STOJAKOVIC, M. *et al.* Paradoxical arrest in lupus activity in BXSB mice with highly autoreactive T cells. **LUPUS**. 19(2): 182-91, 2010.

STRASEN, J. *et al.* Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. **Clinical Research in Cardiology**. 2013. DOI: 10.1007/s00392-013-0613-y.

STURM, N. R. *et al.* Sensitive Detection and Schizodeme Classification of *Trypanosoma cruzi* Cells by Amplification of Kinetoplast Minicircle DNA-Sequences - Use in Diagnosis of Chagas-Disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, p. 205–214, 1989.

SYVANEN, M. Cross-species gene transfer; implications for a new theory of evolution. **Journal of Theoretical Biology**. 112(2): 333-43, 1985.

VITAL, T.E. Detecção de DNA de *Leishmania* spp. no sangue e em esperma de indivíduos residentes na região Amazônica. **Tese (Mestrado em Ciências Médicas)** - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

TANOWITZ, H.B. *et al.* Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). **Progress in Cardiovascular. Diseases.** 51(6): 524-539, 2009. DOI: 10.1016/j.pcad.2009.02.001.

TEIXEIRA, A.R.. *et al.* Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, 24(3): 592-630, 2011a.

TEIXEIRA, A.R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* in the chicken model: Chagas-Like heart disease in the absence of parasitism. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** 5(3): P. e1000, 2011b.

TEIXEIRA, A.R. *et al.* Chagas disease. **Postgraduate Medicine. J.** 82(974): 788-798, 2006a.

TEIXEIRA, A.R.L. *et al.* Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. **Mutation Research.** (305) 197-209, 1994.

TEIXEIRA, ARL; NASCIMENTO, RJ; STURM, NR. Evolution and pathology in Chagas Disease – a Review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz.** 101(5): 463-491, 2006b.

TEIXEIRA, ARL; ROTERS, F; MOTT, KE. Acute Chagas disease. **Gazeta Médica da Bahia.** 70:176-186, 1970.

THALMANN, O. *et al.* Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes. **Molecular Ecology.** 13(2): 321-35, 2004.

THOMAS, S; MARTINEZ, IT; WESTENBERGER, SJ; SURM, NR. A population study of the minicircles in *Trypanosoma cruzi*: predicting guide RNAs in the absence of empirical RNA editing. **BMC Genomics**. 8(133), 2007. DOI: 10.1186/1471-2164-8-133

TORRI, A.F; CARPENTER, L.R; ENGLUND, P.T. Kinetoplast DNA replication. In: Depamphilis, m. L. (ED.). **DNA replication in eukaryotic cells**. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 31: 1029-1042, 1996.

UMEZAWA, E.S. *et al.* Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **Journal of Clinical Microbiology**. 37(5):1554–1560, 1999.

VAN DER KUYL, A.C. *et al.* Nuclear counterparts of the cytoplasmic mitochondrial 12s rRNA gene: a problem of ancient DNA and molecular phylogenies. **Journal of Molecular Evolution**. 40(6): 652-7, 1995.

VILLALTA, F. *et al.* VNI cures acute and chronic experimental chagas disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 3, p. 504–511, 2013.

VILLATA, F. *et al.* VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. **Infectious Disease Journal**. 208(3):504-511, 2013. DOI: 10.1093/infdis/jit042.

VIRREIRA, M. *et al.* Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 1, p. 102–106, 2007.

VELÁZQUEZ, E. B. *et al.* Predictive role of polymerase chain reaction in the early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **Acta Tropica**, v. 137, p. 195–200, 2014.

WESTENBERGER, S.J *et al.* *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. **BMC Genomics**. 7(60), 2006.

WESTENBERGER, S.J; STURN, N.R; CAMPBELL, D.A. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. **International Journal for Parasitology**. 36(3):337-46, 2006.

WESTENBERGER, S.J. *et al.* *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. **BMC Genomics**. 7(60), 2006. DOI: 10.1186/1471-2164-7-60

WHO. Control of Chagas disease: second report of a WHO Expert Committee. página 1–109, 2002.

WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and Leishmaniasis. (**Technical report series**; No. 975), 2012.

WINCKER P. *et al.* Use of simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 51, 771–777, 1994.

WONG, Y. Y. *et al.* Molecular epidemiology of *Trypanosoma cruzi* and *Triatoma dimidiata* in costal Ecuador. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, p. 207–212, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (**American trypanosomiasis**). Fact sheet N°340. 2015. Acessado em 20 de março de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of Chagas' disease: report of a WHO Expert Committee. **Geneva**, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2006-2010. 2013. Disponível em: <[http://www.who.int/chagas/Global\\_distribution\\_Chagas\\_disease\\_2006\\_2010.pdf](http://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf)> Acessado em 11 de abril de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Research Priorities for Chagas Disease, HAT and Leishmaniasis. **Technical report series**. 975: (110), 2012.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology International**. 57(2): 105–109, 2008. DOI: 10.1016/j.parint.2007.12.008.

YOSHIKAWA, H *et al.*, Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human Blastocystis subtypes from fecal samples. **Parasitology Research**. 109:1045-50, 2011.

YUN, O. *et al.* Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Medecins Sans Frontieres. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 3(7):e488, 2009. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000488.

ZENG, X.L *et al.* Spoligotyping of Mycobacterium Tuberculosis Complex Isolates Using Ligation-based Amplification and Melting Curve Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. 2016.

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**. 12: 240-253, 2012.

ZULANTAY, I. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, n. 10, p. 2224–2226, 2011.

## ANEXO I

**Tabela:** Resultados das qPCRs com amostras de humanos com todos os pares de iniciadores.

	AMOSTRAS	INICIADORES			
		TcZ3/TcZ4	S36/67R	S34/S67	ND4/ND4R
<b>G R U P O  N E G A T I V O</b>	<b>201</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>202</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>203</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>204</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>205</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>206</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>207</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>208</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>209</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>210</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>211</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>212</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>213</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>214</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>215</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>216</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>217</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>218</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>219</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>220</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
<b>G R U P O  P O S I T I V O</b>	<b>30 Lacen</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>396B</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>398</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>399</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>403</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>404</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>405</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>406</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>407</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>408</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>409</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>410</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>420</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>421</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>422</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>425</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>426</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<b>427</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	

<b>G R U P O  D U V I D O S O</b>	<b>428</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>430</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>431</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>432</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>1A</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>2A</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>3A</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>4A</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	<b>5A</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>6A</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>7A</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>8A</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>9A</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>10A</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>1R</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>2R</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>3R</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>4R</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>5R</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	<b>6R</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
<b>7R</b>	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	
<b>400</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	
<b>401</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	
<b>397</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	

## ANEXO II



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Investigação da transmissão vetorial de *Trypanosoma cruzi* em ambiente domiciliar no Distrito Federal, Brasil.

**Pesquisador:** Rodrigo Gurgel Gonçalves

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 17206413.3.0000.0030

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

**Patrocinador Principal:** FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 378.359

**Data da Relatoria:** 27/08/2013

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa (da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB) intitulado a "Investigação da transmissão vetorial de *Trypanosoma cruzi* em ambiente domiciliar no Distrito Federal, Brasil", sob responsabilidade do pesquisador Rodrigo Gurgel Gonçalves.

#### Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa possui como objetivo primário identificar possíveis casos de transmissão da doença de Chagas em domicílios com ocorrência de triatomíneos infectados por *Trypanosoma cruzi* no Distrito Federal, em face da hipótese que é a existência de casos agudos de doença de Chagas não identificados no DF

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:** Durante a coleta haverá desconforto por causa da picada de uma agulha para tirar o sangue da veia. Os pesquisadores usarão materiais, descontaminados, descartáveis, individuais, e seguirão normas de biossegurança vigentes, sem riscos de contaminação dos indivíduos que realizarão as coletas e os que doarão o sangue. Se houver queixa de tontura devido à queda ocasional da pressão arterial, será prestado socorro, geralmente na forma de repouso sob vigilância da equipe médica.

**Benefícios:** Os resultados dos exames realizados serão entregues aos pacientes, os quais serão

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
UF: DF Município: BRASÍLIA  
Telefone: (61)3107-1947 Fax: (61)3307-3799 E-mail: cepfs@unb.br



Continuação do Parecer: 378.359

encaminhados para efetuar o tratamento médico específico. A pesquisa trará benefícios diretos e indiretos. O benefício direto seria a possibilidade de tratamento precoce da doença de Chagas, caso haja diagnóstico positivo. O benefício indireto seria o conhecimento da situação da transmissão vetorial da doença de Chagas no DF, informação importante para o desenvolvimento das estratégias de vigilância e controle.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A vigilância dos vetores da doença de Chagas no Distrito Federal (DF) foi iniciada na década de 1980. Até o momento são registradas sete espécies de triatomíneos no DF. Entre 2002 e 2010 foram coletados 754 triatomíneos em 252 unidades domiciliares notificadas no DF. A presença de triatomíneos infectados por tripanossomatídeos em domicílios evidenciou o potencial risco de infecção humana no DF. Dessa forma o objetivo do projeto é identificar possíveis casos de doença de Chagas em domicílios com ocorrência de triatomíneos infectados por *Trypanosoma cruzi* no DF. Os registros de ocorrência das espécies de triatomíneos no DF serão obtidos a partir de dados de capturas em ambiente domiciliar em colaboração com o Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) do DF. Serão incluídos no estudo moradores de casas onde forem detectados triatomíneos infectados no DF e que concordarem em participar da pesquisa. A previsão é de aproximadamente 50 indivíduos a serem examinados durante quatro anos de pesquisa. Serão colhidos 20 ml de sangue dos indivíduos para realização de diagnóstico parasitológico (exames de sangue a fresco, esfregaços sanguíneos corados por Giemsa, Strout, xenodiagnóstico artificial), sorológico (ELISA e IFI) e molecular (PCR). Todos os indivíduos que forem detectados com *T. cruzi* serão atendidos no ambulatório de doença de Chagas do HUB.

Os recursos do projeto serão custeados pela CAPES no edital Parasitologia Básica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória estão presentes, sendo necessário apenas acrescentar a logo da UnB nos TCLEs.

**Recomendações:**

Apenas realizar a necessária atualização do cronograma de execução das atividades e o acréscimo da logo da UnB nos TCLEs.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A pesquisa reveste-se de grande relevância social e está em conformidade com os requisitos

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
UF: DF Município: BRASÍLIA  
Telefone: (61)3107-1947 Fax: (61)3307-3799 E-mail: cepts@unb.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 378.359

elencados na Resolução CNS 466/2012.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Apenas realizar a necessária atualização do cronograma de execução das atividades e acréscimo da logo da UnB nos TCLEs, sem necessidade de retorno do projeto para o Relator.

BRASILIA, 30 de Agosto de 2013

---

**Assinador por:**  
**Natan Monsores de Sá**  
**(Coordenador)**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Novas Tecnologias aplicadas ao diagnóstico e identificação de marcadores genéticos prognósticos para a Doença de Chagas crônica

**Pesquisador:** ElzaFerreira Noronha

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 53663015.4.0000.5558

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.521.680

**Apresentação do Projeto:**

No anterior

**Objetivo da Pesquisa:**

No anterior

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

No anterior

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

No anterior

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

No anterior

**Recomendações:**

Recomendamos acrescentar o currículo do Dr Daniel Vasconcelos, que está listado como pesquisador, mas o currículo não foi acrescentado.

Recomendamos acertar a data de início do projeto para após aprovação por esse comitê de ética

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Recomendamos acrescentar o currículo do Dr Daniel Vasconcelos, que está listado como

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

Continuação do Parecer: 1.521.680

pesquisador, mas o currículo não foi acrescentado.

Recomendamos acertar a data de início do projeto para após aprovação por esse comitê de ética

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O presente projeto foi avaliado na 4ª Reunião Ordinária deste CEP. Após apresentação pelo relator e discussão pelos membros do Colegiado o projeto foi aprovado.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_628619.pdf	12/04/2016 14:34:40		Aceito
Outros	MariaRegina.pdf	22/02/2016 22:10:48	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Outros	Hilda.pdf	22/02/2016 22:07:10	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Outros	CesarC.pdf	22/02/2016 22:05:59	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Outros	Hagstrom.pdf	22/02/2016 22:05:22	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Outros	Mariana.pdf	22/02/2016 22:03:37	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Outros	Cleudson.pdf	22/02/2016 22:03:02	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Outros	Gustavoromero.pdf	22/02/2016 22:02:24	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Outros	Nadjar.pdf	22/02/2016 22:01:26	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Outros	Vicente.pdf	22/02/2016 21:59:31	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Outros	ElzaNoronha.pdf	22/02/2016 21:58:05	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Outros	Resumo.pdf	19/11/2015 17:10:12	ElzaFerreira Noronha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tecnologiasChagas.pdf	19/11/2015 17:08:22	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TecnologiasprognosticoChagas.pdf	19/11/2015 17:07:26	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Outros	Ciencia.pdf	19/11/2015	ElzaFerreira	Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
UF: DF Município: BRASÍLIA  
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -  
UNB



Continuação do Parecer: 1.521.680

Outros	Ciencia.pdf	17:04:32	Noronha	Aceito
Outros	Responsabilidade.pdf	19/11/2015 17:02:38	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Declaração do Patrocinador	fpdf.pdf	19/11/2015 17:00:30	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Outros	Carta.pdf	19/11/2015 16:46:38	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Concordancia.pdf	19/11/2015 16:45:39	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Manuseio.pdf	19/11/2015 16:44:43	ElzaFerreira Noronha	Aceito
Folha de Rosto	Rosto.pdf	19/11/2015 16:44:25	ElzaFerreira Noronha	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 29 de Abril de 2016

---

**Assinado por:**  
Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto  
(Coordenador)

## ANEXO III

# **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

para participação em pesquisa

**TÍTULO: Comparação de métodos de biologia molecular para detecção do *Trypanosoma cruzi*.**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaria de solicitar seu consentimento para participar voluntariamente em um estudo sobre doença de Chagas. O projeto de pesquisa intitulado “Comparação de métodos de biologia molecular para detecção do *Trypanosoma cruzi*” se encontra sob-responsabilidade da mestrandia Ana Luisa Marques, da Profa. Dra. Mariana Hecht e da Profa. Dra. Luciana Hagström, a ser realizado na Universidade de Brasília (UnB). O objetivo desse projeto é comparar métodos de biologia molecular (PCR convencional e PCR quantitativa) para definir a melhor metodologia a ser utilizada para o diagnóstico da doença de Chagas. Tais métodos também serão comparados com os tradicionais testes sorológicos.

A sua participação ocorrerá através da colheita de sangue por pessoa capacitada. Não existem riscos no procedimento de coleta. Os resultados do diagnóstico para doença de Chagas serão fornecidos sem custo algum. A pesquisa não envolve riscos à saúde, integridade física ou moral. Você poderá desistir e se retirar do estudo a qualquer momento.

Será garantido o sigilo total da identidade de todos os pesquisados envolvidos no estudo. Asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a). Para garantir o sigilo, o acesso aos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) é restrito apenas à aluna- pesquisadora e às professoras envolvidas no projeto. Os tubos de coleta serão identificados apenas com números. Após as análises, as amostras (DNA extraído de células brancas sanguíneas e soro) serão armazenadas para utilização em projetos posteriores.

Os dados referentes à idade e ao sexo e os resultados obtidos na pesquisa serão sistematizados e posteriormente divulgados na forma de dissertação de mestrado que será apresentada em sessão pública de avaliação e disponibilizada para consulta através da Biblioteca Central da UnB e repositório institucional

digital da UnB. Os dados também poderão ser apresentados em congressos e palestras e submetidos a publicações em revistas científicas ou equivalente, sempre mantendo em sigilo o nome dos participantes.

Caso aceite fazer parte do estudo, assine o documento de consentimento de sua participação, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida, entre em contato com a aluna de mestrado Ana Luisa Pereira Marques através do e-mail: [analuisapm91@gmail.com](mailto:analuisapm91@gmail.com) ou por telefone: 61)9658-6676.

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação em pesquisa**

Eu, ....., idade....., RG.....  
aceito participar da pesquisa intitulada “Comparação de métodos de biologia molecular para detecção do *Trypanosoma cruzi*”. Declaro que fui devidamente esclarecido sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como seus objetivos e finalidades. Foi-me garantido que poderei desistir de participar em qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Também fui informado que as amostras coletadas serão armazenadas para utilização em projetos posteriores e que os dados coletados durante a pesquisa serão divulgados para fins acadêmicos e científicos, através de uma dissertação de mestrado e divulgação em congressos, palestras e publicação em revistas científicas ou equivalente.

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_. Hora:\_\_:\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

Fones para contato: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_ -

Fones para contato dos pesquisadores: Ana Marques: (61)9658-6676 e Dra Mariana Hecht: (61)8129-2723

\_\_\_\_\_  
Ana Luisa Marques

Aluna- pesquisadora

\_\_\_\_\_  
Dra. Mariana Hecht

Profa. - pesquisadora

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação em pesquisa**

Eu, ....., idade....., RG.....  
aceito participar da pesquisa intitulada “Comparação de métodos de biologia molecular para detecção do *Trypanosoma cruzi*”. Declaro que fui devidamente esclarecido sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como seus objetivos e finalidades. Foi-me garantido que poderei desistir de participar em qualquer momento, sem que isto leve a

qualquer penalidade. Também fui informado que as amostras coletadas serão armazenadas para utilização em projetos posteriores e que os dados coletados durante a pesquisa serão divulgados para fins acadêmicos e científicos, através de uma dissertação de mestrado e divulgação em congressos, palestras e publicação em revistas científicas ou equivalente.

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_. Hora: \_\_: \_\_.

---

Assinatura do voluntário

Fones para contato: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Fones para contato dos pesquisadores: *Ana Marques: (61)9658-6676 e Dra Mariana Hecht: (61)8129-2723*

---

Ana Luisa Marques

Aluna- pesquisadora

---

Dra. Mariana Hecht

Profa. - pesquisadora