

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

Quantificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* em soro e potencial uso das 5' UTRs da família gênica de trans-sialidasas para a genotipagem do parasito como complemento ao diagnóstico molecular da infecção

MYLLENA DE FÁTIMA ALHEIROS DIAS MELO

Rio de Janeiro
Dezembro de 2015

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MYLLENA DE FÁTIMA ALHEIROS DIAS MELO

Quantificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* em soro e potencial uso das 5' UTRs da família gênica de trans-sialidases para a genotipagem do parasito como complemento ao diagnóstico molecular da infecção

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Parasitária

Orientadora: Dra. Constança Felícia De Paoli de Carvalho Britto

Rio de Janeiro

Dezembro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

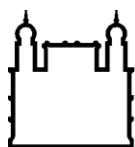
M528 Melo, Myllena de Fátima Alheiros Dias

Quantificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* em soro e potencial uso das 5 UTRs da família gênica de trans-sialidases para a genotipagem do parasito como complemento ao diagnóstico molecular da infecção / Myllena de Fátima Alheiros Dias Melo. – Rio de Janeiro, 2015.
xxi, 165 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.
Bibliografia: f. 122-147

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Soro. 3. Trans-sialidases. 4. COLD-PCR HRM. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MYLLENA DE FÁTIMA ALHEIROS DIAS MELO

Quantificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* em soro e potencial uso das 5' UTRs da família gênica de trans-sialidases para a genotipagem do parasito como complemento ao diagnóstico molecular da infecção

Orientadora: Dra. Constança Felícia De Paoli de Carvalho Britto

Aprovada em: 11/ 12 / 2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Nome - André Roque - Presidente - IOC

Prof. Dr. Nome - Cícero Brasileiro – Membro da banca - UFF

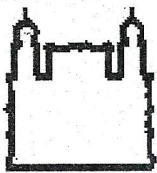
Prof. Dr. Nome - Wim Degrave – Membro da banca - IOC

Prof. Dr. Nome - Marcelo Salabert Gonzalez – Suplente - UFF

Prof. Dra. Nome – Patricia Cuervo – Suplente - IOC

Rio de Janeiro

Dezembro de 2015



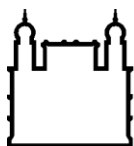
Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Myllena de Fátima Alheiros Dias Melo**, sob orientação da Dr^a. Constança Felicia de Paoli de Carvalho Britto. Ao décimo primeiro dia do mês de dezembro de dois mil e quinze, realizou-se às nove horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **“quantificação de DNA de Trypanosoma cruzi em soro e potencial uso das 5'UTRs da família gênica de trans-sialidases para a genotipagem do parasito como complemento ao diagnóstico molecular da infecção.”** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Diagnóstico Molecular de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. André Luiz Rodrigues Roque - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Cicero Brasileiro de Mello Neto - UFF/RJ, Dr. Wim Maurits Sylvain Degrave - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Patrícia Cuervo Escobar - IOC/FIOCRUZ e Dr. Marcelo Salabert Gonzalez – UFF/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 11 de dezembro de 2015.

Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Presidente da Banca):

Dr. Cicero Brasileiro de Mello Neto (Membro da Banca):

Dr. Wim Maurits Sylvain Degrave (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Agradecimentos

À Deus, por toda a oportunidade concedida a mim.

São exatamente seis anos morando fora da minha cidade natal. Foi aqui, no Rio de Janeiro, que comecei a minha vida de casada e profissional. É a cidade que amo, maravilhosa com todos os seus defeitos. Agradeço por toda sua “boniteza” e alegrias que foram desfrutadas aqui.

Agradeço a minha família, primeiramente ao meu marido, Luciano Beltrão, pelo seu amor e apoio na minha formação, pela sua torcida a cada resultado conquistado, mesmo não entendendo sobre o assunto. Te amo.

À minha mãe (Fátima), sogra (Carmen) e pai (Celso), minhas irmãs, cunhados (as) e sobrinhos, em especial a Julia que acabou de nascer. A minha família adotiva (tia Lena, tio Itamar, Celma, Du, Vivi) que foram meus alicerces aqui no Rio. À Manuela e Larissa Fachada pela amizade sempre. À minha ex-vizinha e amiga de laboratório Márcia Oliveira e seu marido Paulo Duarte, pelas conversas, risadas e pelo cachorro quente também!

A minha amiga Virginia Lorena, pela sua energia e paixão pela ciência, por todo ensinamento e por estar sempre do meu lado.

Agradeço a meu Quindin que me explicou tanta coisa, tudo sobre UTR, nem sabia o que era quando cheguei ao Rio de Janeiro. Uma pessoa formidável, com uma personalidade única, amiga e principalmente verdadeira. A quem eu recorria quando precisava de umas palavras verdadeiras ou um ouvido amigo. Obrigada Tainah Galdino por sua amizade.

Agradeço ao Franklyn Samudio. Um amigo cheio de informações sobre biologia molecular, bioquímica etc. Aprendi muito ao seu lado. Obrigada pela sua ajuda. Também agradeço ao Dário, Nédia, Simone, Vivian, Bil, Mariangela e Dra Martinha por vários momentos felizes no antigo laboratório no pavilhão Arthur Neiva. E claro, às meninas da cantina de tia Penha, em especial a Jurema que caprichava no meu almoço!

As minhas amigas, gatas, de outros laboratórios, Isabela, Magna e Denise. Obrigada pelas risadas, gargalhadas e apoio. Desejo o melhor pra vocês sempre.

Agradeço a todos do grupo da Cláudia Levi: Aline Garcia (adoro rir com você, sentirei saudades!), as Lívias, de Ueharra à Santos, a Bianquinha, Sheila, Keyla, Bolsinha, Carol, Rhagner, em especial ao meu amigo Vitor Vidal, que aturou toda a minha desorganização, por achar sempre meu caderno perdido pelo laboratório, pela seu ombro amigo nas horas difíceis e pelas suas respostas as minhas dúvidas. Obrigada. Agradeço a Dra Claudinha, por todo seu carinho, energia e seu apoio sempre. Muito obrigada pela sua amizade.

Ao Geovane, Jôjô, e suas frases emblemáticas, a Camilinha, a Cássinha, e ao Leonardo Saboia e seus abraços e conversas “surreais” principalmente quando se juntava com o Andrézinho, o menino dos insetos, mineirinho alegre e espontâneo que conquistou minha amizade. E a sua esposa, Renata Pires, mineira arretada e linda que conquistou meu coração. Com quem deixava minha filhote (Mylu) e com quem saía para jogar conversa fora. Muitas vezes dividíamos a marmita. Também agradeço a Dra Patrícia Cuervo pela sua amizade, atenção e carinho sempre, em todas as horas. Ao Amarildo pelas conversas sobre futebol e pela torcida pelo fluminense. E ao Robson pela ajuda com as células quimicamente competentes.

Ao Otacilio Moreira, pela sua amizade sempre. Pela sua ajuda nas provas de doutorado, pela parceria em artigos e discussões de experimentos. Espero seguir um pouco do que você foi para mim no futuro. Admiro muito nossa amizade, espero que seja sempre este pesquisador que eu conheci. Agradeço a seus alunos, todos, sem exceção. Quero levar no meu coração tudo de bom que passamos. Cada um com sua particularidade, Paula e suas paçoquinhas, Hanna e seu jeito maluquinho, o Ícaro, sua sinceridade extrema, que não cala a boca por nada, mas que sinto sua falta quando não o vejo; a paciência do Ronald, que um dia foi meu aluno, e que me ajudou muito no início com clonagem e sequenciamento. E a minha amiga Nati, com quem pude contar tanto na bancada quanto com o ombro amigo, com seu jeito marrento e doce ao mesmo tempo, conquistou minha amizade e, sei que sentirei muita falta do nosso dia, das nossas brincadeiras no laboratório. Já sinto! Obrigada por ser minha amiga.

Ao grupo o qual faço parte, agradeço a todas as meninas das Leishmanias, Dani Pitta, pela sua ajuda na discussão dos resultados do HRM; Dani Martins, Taiana Amâncio, em especial a Thaís Pereira, a menina mais organizada que já conheci, que me dava inveja...obrigada pela sua ajuda na bancada e pelo seu carinho. Ao grupo de Chagas: Thaiane, Natalia Beline, Lelê (sempre me ajudando com os experimentos e a entender as planilhas de pacientes), a Cris pela sua

doçura, a Maria Carol pela sua espontaneidade, pela sua amizade, e ao docinho Carol Lima também. A minha ex Provoc, que me ajudou muito com os géis. Ao meu ex-aluno Pibic Pedro Alburquerque pela sua ajuda na bancada e na parte de bioinformática do projeto.

A minha querida e inigualável Angélica. Só existe uma, e eu a conheci! Não tenho palavras para dizer o quanto sentirei sua falta. Falta de suas reclamações cotidianas, de seu sorriso e principalmente de seu carinho por mim. Eu amo você.

Ao Carlos Alves, Carlinhos!! Sabe quando você entra num laboratório e acha que nunca será amigo de um pesquisador? Pois com ele foi o contrário. Adorei conviver com você nesses seis anos, e espero que receba em triplicata todo o bem que passa a todos. Agradeço ao seu grupo, Cinthia Beromes (maluquete), Karen Charriot (parceira de carona e caminhadas), ao Chico, Luzia e, em especial, às quatro pessoas com que estreitei a minha relação de amizade: A Raquel Souza, menina sonhadora, pela sua paz de espírito que transpassa ao estar ao seu lado, pela sua força e determinação. A minha amiga Mariana Almeida, mesmo precisando de gincobiloba de vez em quando, não esquecia de me abraçar ou de me dar um sorriso todos os dias. Sentirei saudade, neguinha!!! Ao Bernardo Pereira, meu amigão, que nunca deixou uma pergunta minha sem resposta, você faz falta no laboratório! E ao meu amigo Franklin Silva, por brigar sempre comigo, por me levantar quando estava para baixo, pelas suas brincadeiras e seu sorriso inconfundível. Pela sua ajuda primordial nas análises e discussão (quase brigas) dos meus resultados. Obrigada por ser meu amigo e estar sempre ao meu lado. Admiro muito sua força de vontade e luta de todos os dias.

A minha amiga Carla Pereira do setor de sujeira e detritos, pelas suas palavras de conforto, pelo seu amor, pelo seu sorriso e abraços de todos os dias. Uma pessoa forte e batalhadora que tenho o prazer de ter como amiga. Agradeço muito por sua amizade.

Agradeço ao Adeilton pela sua paciência em me explicar o projeto, por me ensinar a pensar mais amplo. A todas as conversas filosóficas, mesmo não entendendo todas. A sua contribuição foi essencial para o desenvolvimento do trabalho.

A pessoa que me abraçou como filha no primeiro momento que nos conhecemos, em 2008, Constança Britto, minha orientadora e amiga. Por abrir o laboratório que chefia, e sentar comigo para escrever e entender sobre o projeto.

Por estar sempre me apoiando, me ajudando. Pela confiança que foi me dada, mesmo muitas vezes quando a ansiedade se fazia presente, e pela oportunidade de crescer sob sua orientação. Obrigada por me deixar fazer parte de sua vida pessoal e profissional. A senhora tem um valor importantíssimo para mim, te amo.

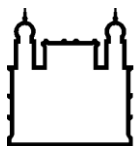
Aos pacientes acometidos pela doença de Chagas e indivíduos saudáveis que aceitaram participar deste estudo e contribuir para o progresso da ciência, conscientes de que podem até não estar sendo beneficiados diretamente, mas que o benefício de sua colaboração será proporcionado a todos os acometidos. Ao Hospital Universitário Oswaldo Cruz e ao Instituto Nacional Evandro Chagas FIOCURZ-RJ, pela seleção de pacientes acometidos pela doença de Chagas cadastrados. Em especial Dr Wilson Oliveira, Dra Yara Gomes e Dr Pedro Emmanuel Alvarenga Americano do Brasil.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro. E a pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo suporte dedicado a mim, como aluna.

Ao Dr Christian Probst, da Fiocruz - PR, pela sua colaboração em sequenciar por NGS e realizar as análises dos resultados gerados. Pela sua paciência em me ensinar a metodologia e discutir os resultados. As plataformas de sequenciamento PDTIS e a plataforma de PCR em Tempo Real RPT09A, ambas do IOC/FIOCRUZ pelo apoio técnico em gerar meus dados do projeto.

Vou levar comigo toda a felicidade que construí aqui no Rio. Meu coração aperta em dizer que estou partindo, mas a vida é assim, cheia de recomeços.

A todos, o meu muito obrigada!



Ministério da Saúde

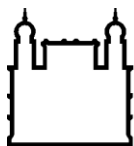
FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESUMO

Ensaio de PCR para o diagnóstico e monitoramento da carga parasitária em pacientes acometidos pela doença de Chagas são realizados a partir de DNA recuperado de sangue periférico. Uma perspectiva seria a possibilidade do uso de soro para a detecção e quantificação de DNA de *T. cruzi*, aproveitando amostras coletadas para triagem sorológica em laboratórios de referência e bancos de sangue. Outra limitação é que o diagnóstico molecular com os alvos mais comumente utilizados (kDNA, DNA Satélite) não é capaz de identificar as linhagens do parasito. Tem sido relatada uma baixa sensibilidade para alguns marcadores de genotipagem de *T. cruzi* quando aplicados diretamente em sangue de pacientes crônicos, uma vez que são cópias únicas ou distribuídos em baixa frequência no genoma do parasito. Estudos baseados em famílias multigênicas, como as proteínas de superfície (trans-sialidases), sugerem que estas sejam capazes de reunir cepas/isolados de *T. cruzi* em grupos biologicamente distintos, visando sua caracterização. A presença de sítios polimórficos nas regiões não traduzidas (UTRs) dos genes de trans-sialidases (TS), além de representar uma estratégia de sobrevivência do parasito ao estresse ambiental, propicia o uso destas regiões como potenciais marcadores moleculares para tipagem de *T. cruzi*. Este trabalho avaliou o potencial uso do soro e do segmento 5' UTR de TS de *T. cruzi*, em ensaios de quantificação de DNA e genotipagem do parasito, respectivamente. Neste sentido, empregamos a PCR em Tempo Real (qPCR) multiplex para a detecção/quantificação de *T. cruzi* em amostras pareadas de soro e sangue de 40 pacientes com a doença crônica. Para avaliar o uso da 5' UTR de TS como marcador molecular de genotipagem, utilizamos um painel de cepas/clones de *T. cruzi*, representantes das seis DTUs (Unidades Discretas de Tipagem). Após amplificação do segmento contendo parte da 5' UTR e uma porção da região codificante de TS das diferentes cepas/clones, e posterior sequenciamento por método capilar (SANGER), realizamos a análise composicional das sequências. Em seguida, novos iniciadores foram desenhados para os ensaios de COLD-PCR HRM (*High Resolution Melting*). Os resultados da qPCR revelaram sensibilidade de detecção de 95% e 97% para soro e sangue, respectivamente, e especificidade de 100% para ambos os tipos de amostras. As medianas de carga parasitária em soro e sangue, também não demonstraram diferenças significativas, sendo de 1,12 e 1,23 equivalentes parasito/mL, respectivamente, o que reproduz a baixa parasitemia observada nos pacientes com doença de Chagas crônica. A partir das análises composicionais das sequências de 5' UTR de TS obtidas pelo método capilar, identificamos blocos conservados e sítios polimórficos entre as linhagens, porém não foi possível gerar assinaturas genômicas associadas à caracterização em DTUs. O sequenciamento New Generation Sequencing do segmento 5' UTR de TS permitiu a caracterização das cepas/clones em seis DTUs, como demonstrado na árvore filogenética construída a partir de 4.568.225 sequências. Os ensaios de COLD-PCR HRM, direcionados para diferentes seções do segmento 5' UTR de TS, foram eficientes em agrupar cepas/clones em duas variantes, sugerindo uma associação com os ciclos de transmissão, virulência e evolução populacional destes parasitos. Os resultados gerados no presente estudo sugerem o uso de soro para o diagnóstico molecular da infecção pelo *T. cruzi* em laboratórios de referência, responsáveis pela manutenção de sorotecas, bem como demonstram o potencial discriminatório do alvo 5' UTR de trans-sialidases para ser explorado em ensaios de genotipagem do parasito diretamente de amostras clínicas e biológicas, acoplado ao sequenciamento *High Throughput* dos produtos amplificados, como ferramenta complementar à pesquisa diagnóstica da doença de Chagas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

PCR-based assays for molecular diagnosis and to evaluate *Trypanosoma cruzi* load in patients with Chagas disease are usually performed with DNA recovered from peripheral blood samples. One promising approach would be the use of patients' serum for the detection and quantification of *T. cruzi* DNA, as it would make possible to take advantage of the same samples collected for serological screening in blood banks and reference laboratories. Another limitation is that molecular diagnosis with the most common molecular targets (kDNA and Satellite DNA) is not suitable for identifying the infecting parasite strain. A low sensitivity of some *T. cruzi* genotyping markers has been reported, when those are applied directly to blood of chronic patients, since they are represented as a single copy or present low frequencies in the parasite genome. Studies based on multigene families, such as the surface proteins (trans-sialidase), suggested the ability of those genes to cluster strains/isolates of *T. cruzi* into biologically distinct groups. The presence of polymorphic sites in the untranslated regions (UTRs) of trans-sialidase genes (TS), as well as represents a parasite's survival strategy to environmental stress, it promotes the use of these regions as potential molecular markers for *T. cruzi* typing. This study evaluated the potential use of serum and the segment 5' UTR of TS, as new approaches for DNA quantification and *T. cruzi* genotyping, respectively. We used multiplex Real-Time PCR (qPCR) for detecting/quantifying parasites in serum and blood paired samples from 40 chronic Chagas disease patients. In order to investigate the potential use of 5' UTR of TS sequences as molecular markers for genotyping, we used a panel of *T. cruzi* strains/clones, representative of the six DTUs (Discrete Typing Units). Following amplification of the segment containing part of the 5' UTR and a portion of the TS coding region from different strains/clones and sequencing by capillary method (Sanger), we carried out the compositional analysis of the sequences. New primers were designed for the HRM COLD-PCR tests (High Resolution Melting). The qPCR results showed detection sensitivities of 95% and 97% for serum and blood, respectively, and a specificity of 100% for both sample types. The median of parasite load in blood and serum also showed no significant differences, with 1.12 and 1.23 parasite equivalents/mL respectively, which reproduces the low parasitemia observed in chronic Chagas disease patients. From the compositional analysis of the 5' UTR of TS sequences obtained by capillary method, we identified conserved blocks and polymorphic sites, but no genomic signatures associated to the characterization into distinct DTUs were observed. New Generation Sequencing of the segment 5' UTR of TS allowed the characterization of strains/clones in six DTUs, as shown by the phylogenetic tree generated by the analysis of 4.568.225 sequences. HRM COLD-PCR assays targeted to different sections of the segment 5' UTR of TS were effective for clustering the strains/clones in two variants, suggesting an association with the transmission cycles, virulence and evolution of these parasite populations. The set of evidences gathered in this study, reinforces the potential use of serum for molecular diagnosis of *T. cruzi* infection, in reference laboratories responsible for maintaining serum bank, as well as, indicates a discriminatory potential of 5' UTR of TS, regarding the six DTUs, to be explored in genotyping assays directly from clinical and biological samples, associated to High Throughput sequencing of amplicons, as a complementary tool for diagnostic researches in Chagas disease.

ÍNDICE

	Pág.
1 Introdução.....	1
1.1 Agente etiológico da doença de Chagas.....	1
1.1.1 Ciclo de vida.....	1
1.1.2 Genoma do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.1.3 Organização genômica do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.2 Diversidade genética do <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.2.1 Classificação do <i>T. cruzi</i> em Unidades Discretas de Tipagem.....	8
1.2.2 Modelos de origem das DTUs.....	9
1.2.3 Distribuição geográfica das DTUs.....	11
1.2.4 Marcadores moleculares para genotipagem.....	13
1.2.5 Potencial marcador para genotipagem em DTUs: família de Transsialidases.....	17
1.3 Técnicas de genotipagem.....	19
1.4 Diagnóstico da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	22
1.4.1 Diagnóstico convencional e molecular.....	22
1.4.2 Avanços no diagnóstico molecular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
1.5 Justificativa.....	28
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivos gerais.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
Parte I Avaliação do uso de soro para a detecção e quantificação de DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> para o diagnóstico molecular da infecção.....	31
3.1 Pacientes acometidos pela doença de Chagas e controles.....	31
3.2 Extração de DNA a partir de sangue e soro.....	32
3.3 PCR quantitativo em Tempo Real formato duplex.....	32

3.4 Avaliação da migração do DNA para o soro após coagulação do sangue	33
3.5 Análise estatística.....	34
Parte II Potencial de aplicação das 5' UTRs da família gênica de trans-sialidasas para diferenciar entre os grupos populacionais de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
3.6 Cepas e clones de <i>Trypanosoma cruzi</i> e outros protozoários	35
3.6.1 Cultivo de células.....	37
3.7 Extração de DNA dos parasitos cultivados.....	37
3.8 Desenho dos oligonucleotídeos para a região 5` UTR de Trans-sialidasas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
3.9 Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase convencional para a região 5` UTR de TS de <i>T. cruzi</i>	40
3.9.1 Sensibilidade Analítica e PCR Gradiente.....	40
3.9.2 Teste de Especificidade Analítica.....	41
3.9.3 Comparação entre a Sensibilidade da PCR direcionada para o alvo 5' UTR de TS e o alvo para o DNA do cinetoplasto (kDNA) de <i>T. cruzi</i>	42
3.10 Clonagem e sequenciamento pelo método capilar de SANGER.....	43
3.10.1 Preparo das células quimicamente competentes.....	43
3.10.2 Clonagem dos produtos amplificados.....	44
3.10.3 Seleção dos clones através da PCR de Colônia.....	45
3.10.4 Reação de Sequenciamento pelo Método Capilar de SANGER.....	45
3.10.5 Edição, Alinhamento e Identidade das sequências.....	46
3.10.6 Identificação das Sequências DTU-exclusivas.....	46
3.10.7 Análise composicional das Sequências das 5' UTRs de Trans-sialidasas das seis DTUs de <i>T. cruzi</i>	47
3.11 Sequenciamento de Nova Geração - ION Torrent.....	47
3.11.1 Preparação da biblioteca e do cartão de leitura.....	48
3.11.2 Estudo de <i>K-mer</i> e Agrupamento das cepas/clones de <i>T. cruzi</i>	48
3.12 Padronização dos ensaios HRM para genotipagem de <i>T. cruzi</i>	49

3.12.1 Desenho de iniciadores para os ensaios de genotipagem por HRM.....	50
3.12.2 Amostras utilizadas na padronização da PCR HRM.....	51
3.12.3 Condições de reagentes e termociclagem da PCR HRM.....	52
3.12.4 Análise dos resultados dos ensaios de HRM.....	53
3.13 Validação dos Ensaios com Amostras Clínicas de Pacientes acometidos pela doença de Chagas.....	54
3.13.1 Extração de DNA das amostras clínicas.....	54
3.13.2 Quantificação de DNA de <i>T. cruzi</i> nas amostras de pacientes crônicos.....	55
3.13.3 Sensibilidade e Especificidade da PCR convencional para a região 5' UTR de TS a partir de amostras clínicas.....	55
3.13.4 Sequenciamento da região 5' UTR de TS a partir de amostras de sangue de pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica.....	56
3.13.5 Ensaio de PCR HRM a partir de amostras de pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica.....	56
4 RESULTADOS.....	57
Parte I Avaliação do uso de soro para a detecção e quantificação de DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> para o diagnóstico molecular da infecção.....	57
4.1 Avaliação da migração do DNA para o soro.....	57
4.2 Faixa de detecção de DNA de <i>T. cruzi</i> entre amostras de sangue e soro por qPCR.....	58
4.3 Ensaios de qPCR TaqMan duplex com amostras pareadas de sangue e soro de pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica.....	60
Parte II Potencial de aplicação das 5' UTRs da família gênica de trans-sialidasas para diferenciar entre os grupos populacionais de <i>Trypanosoma cruzi</i>	63
4.4 Desenho dos oligonucleotídeos e amplificação da região 5'UTR de Trans-sialidasas.....	63
4.5 Padronização da PCR convencional para a região 5' UTR de Trans-Sialidasas.....	65
4.5.1 Sensibilidade e Especificidade clínica da PCR convencional para os alvos da região 5' UTR de Trans-sialidasas.....	71

4.6 Sequências obtidas pelo SANGER e ION Torrent.....	75
4.6.1 Identificação de fragmentos polimórficos na região 5' UTR de Trans-sialidases de <i>T. cruzi</i>	80
4.6.2 Análise composicional das sequências de 5' UTR de TS de <i>T. cruzi</i>	85
4.7 PCR em Tempo Real e High-Resolution Melting.....	88
4.7.1 Iniciadores para a reação de PCR-HRM.....	88
4.7.2 Genotipagem de <i>T. cruzi</i> a partir de PCR HRM com alvo na trans-sialidase.....	89
4.8 Construção das árvores filogenéticas a partir dos dados do ION Torrent.....	103
5 DISCUSSÃO.....	106
Parte I Avaliação do uso de soro para a detecção e quantificação de DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> para o diagnóstico molecular da infecção.....	106
Parte II Potencial de aplicação das 5' UTRs da família gênica de trans-sialidases para diferenciar entre os grupos populacionais de <i>Trypanosoma cruzi</i>	109
6 CONCLUSÕES.....	120
Referências.....	122
Anexo A – Comissão de Ética do CPqAM/ FIOCRUZ.....	148
Anexo B – Tabela de cepas/clones representativos das seis DTUs de <i>T. cruzi</i> e outros kinetoplastídeos.....	149
Anexo C – Comissão de Ética em Pesquisas do IPEC/FIOCRUZ.....	151
Apêndice A – Artigo publicado.....	152
Apêndice B – Listas das sequências de referências da cepa CL Brener do banco de dados NCBI.....	160
Apêndice C – Figuras do alinhamento das variantes de pacientes e das amostras de cepas/clones de cultura.....	162

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Figura 2- Processo de maturação do mRNA após a transcrição policistrônica.....	5
Figura 3- Representação esquemática da evolução dos grupos de <i>T. cruzi</i>	11
Figura 4- Distribuição geográfica aproximada das DTUs de <i>T. cruzi</i> nos ciclos de transmissão doméstico e silvestre, e manifestações clínicas da doença de Chagas.....	13
Figura 5- Representação do segmento genômico selecionado para o estudo. O fragmento que está representado em 400 cópias no genoma de <i>T. cruzi</i> inclui majoritariamente a 5' UTR e parte da região codificante (ORF) da família gênica de trans-sialidases.....	39
Figura 6 – Detecção do DNA em soro, sangue e <i>T. cruzi</i> CL Brener de cultura por qPCR. Sangue total foi contaminado artificialmente com Exo-IPC (1X) ou células de <i>T. cruzi</i> (1 par. eq./mL) antes do preparo do soro.....	58
Figura 7 – . Faixa de detecção de DNA de <i>T. cruzi</i> e quantificação por qPCR em Tempo Real. O sistema TaqMan de qPCR foi realizado a partir de diluições seriadas de DNA extraído de amostras de soro, sangue ou parasitos de cultura, na faixa de 10 ⁵ a 0,5 eq. par./mL.....	59
Figura 8 – Comparação entre as cargas parasitárias em amostras de soro e sangue de pacientes com doença de Chagas crônica.....	61
Figura 9 – Distribuição das cargas parasitárias em sangue e soro entre pacientes crônicos com diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas. (A) Símbolos pretos representam as cargas parasitárias estimadas nas amostras de sangue por qPCR multiplex em Tempo Real.....	62
Figura 10 – Alinhamento dos fragmentos amplificados do alvo 5' UTR do gene de Trans-Sialidase de <i>T. cruzi</i> pela PCR convencional.....	64

Figura 11 – Exemplo da PCR gradiente empregando amostras de sangue reconstituídas com diferentes concentrações de epimastigotas CL Brener (TcVI) e os iniciadores externos P1/P2 e alinhamento das sequências geradas para o fragmento de 700 pb.....	67
Figura 12 – Teste de especificidade dos iniciadores para a região 5' UTR de trans-sialidases a partir de amostras de DNA de diferentes parasitos.....	70
Figura 13 – Identidade das sequências amplificadas com os iniciadores P1/P3 a partir de amostras de pacientes acometidos pela doença de Chagas com as sequências de genes de Trans-sialidases depositadas no banco de dados da NCBI GenBank.....	75
Figura 14 – Processamento do sequenciamento por Nova Geração (NGS).....	78
Figura 15 – Alinhamento das 31 sequências que apresentaram em sua composição os fragmentos com 20 nt mais frequentes de cada DTU.....	81
Figura 16 – Representação das frequências de ocorrência dos fragmentos de 20 nt gerados pela análise de <i>k-mer</i> (NGS) e observados nas sequências geradas pelo sequenciamento capilar (SANGER).....	82
Figura 17 – Comparação entre as tendências da distribuição composicional dos 16 dinucleotídeos na região 5' UTR das diferentes DTUs.....	83
Figura 18 – Sequências consenso da 5' UTR de TS das seis DTUs geradas a partir do alinhamento das 31 sequências obtidas pelo SANGER e localização dos fragmentos com 20 nucleotídeos de cada DTU de <i>T. cruzi</i>	84
Figura 19 – Quantidades dos 16 dinucleotídeos nas três seções da região 5' UTR de Trans-sialidase de <i>T. cruzi</i>	85
Figura 20 – Distribuição dos valores da frequência de DI por seção da 5' UTR de TS entre cepas/clones representantes de cada DTU.....	87
Figura 21 – Ensaio por HRM dos clones da trans-sialidase de <i>T. cruzi</i>	90
Figura 22 – Identificação dos polimorfismos observados entre as sequências dos clones recombinantes após o agrupamento pela PCR HRM para cada seção.....	95
Figura 23 – Determinação da Temperatura Crítica (TC) utilizada na qPCR HRM.....	97

Figura 24 – Ensaio por HRM de DM28c, D8 e Colombiana (TcI), Y e PR1281(TcII), 3663 (TcIII), 4167 (TcIV), LL014 e SO3 (TcV) e CL Brener (TcVI).....	98
Figura 25 – Ensaio por HRM com amostras de sangue e soro contaminadas artificialmente com cepas/clones de <i>T. cruzi</i> (10^3 parasitos /mL)..	100
Figura 26 – Ensaio por HRM com amostras de sangue de pacientes acometidos pela Doença de Chagas e epimastigotas de cultura das seguintes cepas de <i>T. cruzi</i> : DM28c, D8 e Colombiana (TcI), Y e PR1281(TcII), 3663 (TcIII), 4167 (TcIV), LL014 e SO3 (TcV) e CL Brener (TcVI).....	102
Figura 27 – Árvore filogenética das cepas/clones de <i>T. cruzi</i> construída a partir das sequencias com do segmento 5` UTR de trans-sialidases.....	105

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1- Cepas/clones representativos das seis <i>Discrete Typing Units</i> de <i>Trypanosoma cruzi</i> e outros parasitos unicelulares.....	36
Tabela 2- Iniciadores para a região 5' UTR de Trans-sialidases de <i>T. cruzi</i>	39
Tabela 3- Associação de iniciadores de acordo com a seção da 5' UTR de TS analisada pelo HRM.....	51
Tabela 4- Sensibilidade e especificidade da qPCR em Tempo Real em amostras de sangue e soro.....	60
Tabela 5- Iniciadores para a região 5'UTR de Trans-sialidase.....	63
Tabela 6- Comparação da sensibilidade das PCRs para a região 5' UTR de Trans-sialidases e para o kDNA de <i>T. cruzi</i> empregando onze curvas padrão representando cada cepa/clone do parasito	69
Tabela 7- Quantificação da carga parasitária de <i>T. cruzi</i> por qPCR em 10 pacientes do INE / FIOCRUZ-RJ.....	71
Tabela 8- Sensibilidade e especificidade clínicas.....	74
Tabela 9- Genes de trans-sialidases de <i>T. cruzi</i> disponíveis no banco de dados que apresentaram identidade com as sequências geradas neste estudo para o alvo 5' UTR de TS.....	76
Tabela 10- Quantidade de sequências geradas pelos três cartuchos de leitura após o sequenciamento por NGS.....	79
Tabela 11- Iniciadores para aplicação no HRM.....	88
Tabela 12- Distribuição das cepas/clones em variantes.....	99
Tabela 13- Quantidade de <i>K-mers</i> (delta).....	104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
CO	Cut-off
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDi	Drugs for Neglected Diseases initiative
DO	Densidade óptica
DTUs	Discret Typing Units
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Exo-IPC	Exogenous Internal Positive Control
FC	Forma cardíaca
FD	Forma digestiva
Fg	Fentograma
FI	Forma indeterminada
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FM	Forma mista
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	Aceleração da gravidade
GEB	Guanidine EDTA Blood)
GPI	Glicose 6 Phosphato Isomerase
H	Hora
HRM	High Resolution Melting
HSP60	Heat Shock 60
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
ITS	Intergenic spacer region
iTS	Isoforma inativa de Trans-sialidases

mA	Miliampere
ME	Mini-exon
Min	Minuto
mL	Mililitro
MLMT	Multilocus Microsatellite Typing
MLST	Multilocus Sequence Typing
mM	Milimolar
MSF	Médicos Sem Fronteiras
N	Número de amostra
NC	Não acometido pela doença de Chagas
NGS	New Generation Sequencing
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
P1	Primer 1
P2	Primer 2
P3	Primer 3
P4	Primer 4
P5	Primer 5
PBS	Tampão Salino – Fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
Pmol	Picomol
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAPA	Shed Acute-Phase Antigen

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SL	Spliced Leader
SNP	Single Nucleotide Polimorphism
ST	Sequence Type
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tris Borate EDTA
TM	Temperatura de Melting
TS	Trans-sialidase
UFPE	Universidade de Federal de Pernambuco
UTR	Untranslated Region
WHO	World Health Organization
Mg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agente etiológico da doença de Chagas

1.1.1 Ciclo de vida

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um organismo eucarionte e unicelular pertencente à classe Kinetoplastida, que compreende a ordem Trypanosomatida. O inseto transmissor do parasito, conhecido no Brasil como barbeiro e chupança, pertence a família dos Reduvidaeos (Reduviidae) podendo ser dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*.

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo com quatro estágios: epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos. Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, o inseto vetor defeca e através de feridas e escoriações na pele, ou direto na mucosa, o *T. cruzi*, na forma infectiva (tripomastigota metacíclico), entra na corrente sanguínea do hospedeiro. Os tripomastigotas circulantes penetram nas células do hospedeiro, onde se diferenciam em amastigotas (forma intra-celular), os quais se multiplicam até romper a célula. Ainda no interior das células, ocorre nova diferenciação de amastigotas para tripomastigotas sanguíneos, os quais são liberados para a corrente sanguínea até invadirem novas células ou, após um novo repasto sanguíneo, os tripomastigotas são ingeridos pelo inseto vetor. No vetor, o protozoário sofre outra diferenciação, passando para a forma epimastigota que se multiplica no tubo digestivo do inseto até que, no reto, evolui para a forma tripomastigota metacíclica, forma infectiva e presente nos excretas do inseto. Após novo repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos são eliminados nas fezes, reiniciando-se o ciclo (Figura 1).

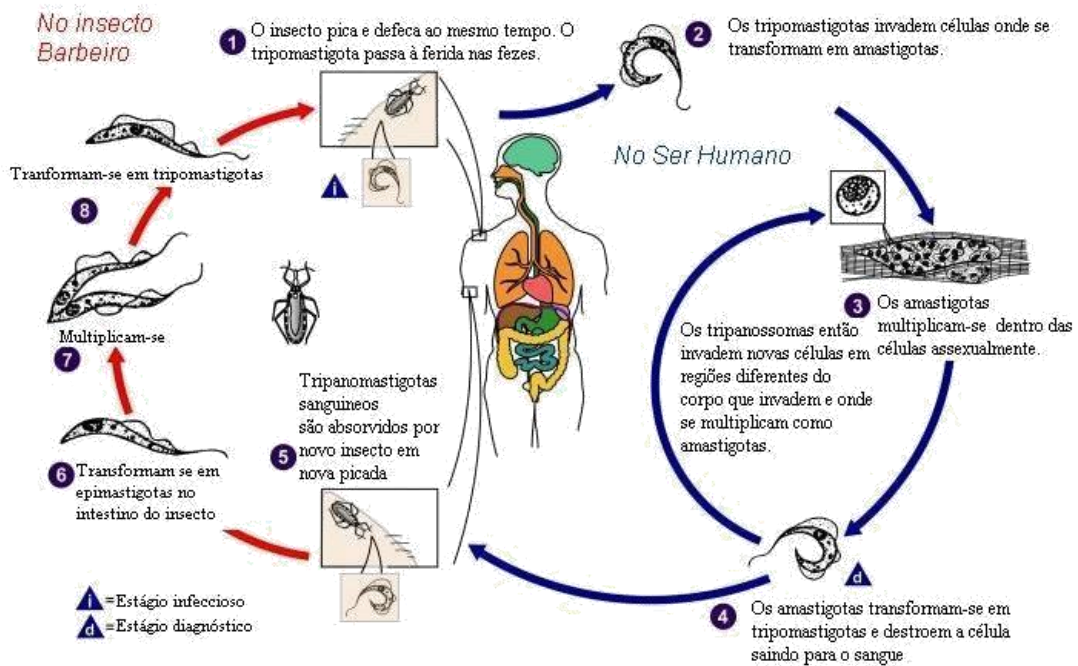


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: *Center for Disease Control and Prevention* modificado por Wikipédia.

1.1.2 Genoma do *Trypanosoma cruzi*

Através de estudos iniciais empregando a técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) foi possível estimar a quantidade de cromossomos em *T. cruzi*, que pode variar entre 64 a 80 cromossomos dependendo da cepa e clone do parasito (CANO et al., 1995; PORCILE et al., 2003; BRANCHE et al., 2006). Da mesma forma, seguindo esta metodologia, foi possível associar genes à cromossomos específicos, evidenciando assim a grande diversidade genômica observada entre cepas e clones de *T. cruzi* (GIBSON & MILES, 1986; AYMERICH & GOLDENBERG, 1989; WAGNER & SO, 1990; CANO et al., 1995). Mesmo apresentando diferenças relacionadas a quantidade de DNA e tamanho do genoma, o cariótipo do *T. cruzi* apresenta-se estável nas diferentes formas evolutivas do parasito (WAGNER & SO, 1990). Esta plasticidade genômica pode conferir mecanismos de sobrevivência do *T. cruzi* ao estresse ambiental, além de promover a elevada heterogeneidade genética observada entre as suas diferentes linhagens, podendo de certa forma, contribuir para a diversidade de espectro clínico relatado na doença de Chagas (MCDANIEL & DVORAK, 1993).

O sequenciamento do genoma diploide da cepa CL Brener revelou um tamanho de 106,4 a 110,7 x 10⁶ pares de bases (pb), sendo o conteúdo de DNA por célula estimado entre 120 e 330 fg (EL SAYED et al., 2005). O parasito apresenta em todas as suas formas evolutivas dois genomas situados em diferentes compartimentos: no núcleo e na mitocôndria.

A rede de DNA circular do cinetoplasto, ou kDNA, totaliza cerca de 20 a 30 % do DNA celular (CANO et al., 1995; SOUZA et al., 2010). Ele é composto por dois tipos de estruturas: os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos representam cerca de 50 cópias por célula (DESQUENCE & DÁVILA, 2002; KLINGBEIL & ENGLUND, 2004). São responsáveis pela codificação de proteínas da cadeia de transporte de elétrons e RNA ribossômico mitocondrial (SIMPSON et al., 1987; SIMPSON, 1987). Os minicírculos estão presentes nas células em cerca de 5.000 a 10.000 cópias e codificam RNAs guia que participam do processamento dos transcritos dos maxicírculos (SIMPSON, 1987; DESQUENCE & DÁVILA, 2002; JUNQUEIRA et al., 2005). Em termos de organização estrutural, os minicírculos apresentam quatro regiões de sequências conservadas, intercaladas por sequências altamente variáveis que conferem uma enorme diversidade de classes de minicírculos por rede de kDNA (DEGRAVE et al., 1988; STURM et al., 1989).

No núcleo, encontram-se presentes sequências repetitivas, que representam cerca de 50 % do genoma e consistem principalmente de grandes famílias de genes de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições teloméricas (EL SAYED et al., 2005). O DNA satélite com 195 pb é a sequência repetitiva mais abundante no núcleo celular, representando cerca de 10 % do genoma do *T. cruzi* e se apresenta organizada em tandem em intervalos de 30 a 10 kb em todas os isolados, embora apresente diferenças quanto ao número de repetições entre as cepas/isolados de *T. cruzi* (GONZALEZ et al., 1984; ELIAS et al., 2003; DUFFY et al., 2013). Exemplos dessas sequências são os microsátélites, os minisátélites e as sequências satélites (ou macrossátélites). Os microsátélites são sequências pequenas de DNA (aproximadamente 6 nucleotídeos), e apresentam elevado grau de polimorfismo, principalmente no que diz respeito ao número de repetições em um dado locus (CASTRO et al., 1981; GONZÁLEZ et al., 1984; REQUENA et al., 1992). As sequências de minisátélites são hipervariáveis, com aproximadamente 15 nucleotídeos na unidade repetitiva, presentes em milhares de cópias no genoma nuclear (KINGBELL & ENGLUD, 2004; JUNQUEIRA et al., 2005). As sequências

satélites são unidades de repetição de 5 - 200 pb, localizados em regiões heterocromáticas dos cromossomos (REQUENA et al., 1996).

Devido a sua extensa plasticidade genômica (ganho, perda ou rearranjo de DNA), o parasito tem a capacidade de se adaptar a grandes mudanças no seu meio extracelular, possibilitando a sua multiplicação no intestino do inseto e invasão e multiplicação em diferentes células de mamíferos, assim como é capaz de burlar o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado (HALL & JOINER 1993; VANHAMME & PAYS 1995; RUBIN-DE-CELIS et al., 2006; FREIRE-DE-LIMA et al. 2012; PREUßER et al. 2012; BURGOS et al., 2013; SALES-CAMPOS et al., 2014). Essas variações de adaptação observadas entre cepas e isolados do *T. cruzi* são controladas por um mecanismo único de expressão gênica (CAMPBELL et al., 2003; ARAÚJO & TEIXEIRA, 2011; PREUßER et al. 2012).

1.1.3 Organização genômica do *Trypanosoma cruzi*

A organização do genoma nos tripanosomatídeos é remanescente dos procariontes, nos quais os genes se encontram agrupados em longas unidades de transcrição (policistrônica) com mais de 100 *open reading frames* (ORFs); por outro lado, diferem dos procariontes, uma vez que os genes não são relacionados (CAMPBELL et al., 2003; PREUßER et al. 2012). Os 12.000 genes descritos em *T. cruzi* são transcritos de forma constitutiva formando transcritos primários policistrônicos longos, sendo necessária a edição desse pré-mRNA através dos mecanismos de *trans-splicing* e poliadenilação (LEBOWITZ et al., 1993; VANHAMME & PAYS, 1995; CLAYTON, 2002; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2003, 2004; TEIXEIRA & DAROCHA 2003; ARAÚJO & TEIXEIRA, 2011) (Figura 2).

O *Trans-splicing* é a adição de uma sequência de 39 nt na região 5' terminal do mRNA denominada *Spliced Leader* (SL), a qual é idêntica em todos os mRNAs dos *Trypanosoma cruzi* (KOOTER & BORST, 1984; PARSONS et al., 1984; VANHAMME & PAYS, 1995; LIANG et al., 2003; PREUßER et al. 2012). O SL no mRNA atua como 5' EXON e tem função em várias etapas da biogênese do mRNA, assim como na sua exportação do núcleo para o citoplasma da célula; atuando na iniciação da transcrição e no controle da qualidade e da estabilidade dos mRNAs (LEWIS & IZAURRALDE, 1997; ISKEN & MAQUAT, 2007).

A adição dos 39 nucleotídeos ocorre através de duas reações de transesterificação com a formação da estrutura Y, ao invés de um laço intermediário (LIANG et al., 2003). Para a localização do SL na região 5' terminal do mRNA, duas regiões sinalizadoras são imprescindíveis: o dinucleotídeo AG e a região rica em pirimidina (região entre os genes), localizados, respectivamente, na região 3' do sítio de adição do SL (no mRNA maduro) e acima da 5' *untranslated region* (UTR) do pré-mRNA (região intergênica) (VANHAMME & PAYS, 1995; HUMMEL et al., 2000; BENZ et al., 2005; SIEGEL et al., 2005; PREUßER et al. 2012) (Figura 2).

O processo de poliadenilação não apresenta sinal conhecido em tripanosomatídeos, porém foi observado que a localização do sítio de adição do SL na região 5' do gene adjacente e a região rica em pirimidina na região intergênica influenciam no tamanho da região de adição da cauda poli A (resíduos de adenosina) (LEBOWITZ et al 1993; MATTHEWS et al 1994; SCHÜRCH et al., 1994; VANHAMME & PAYS, 1995) (Figura 2).

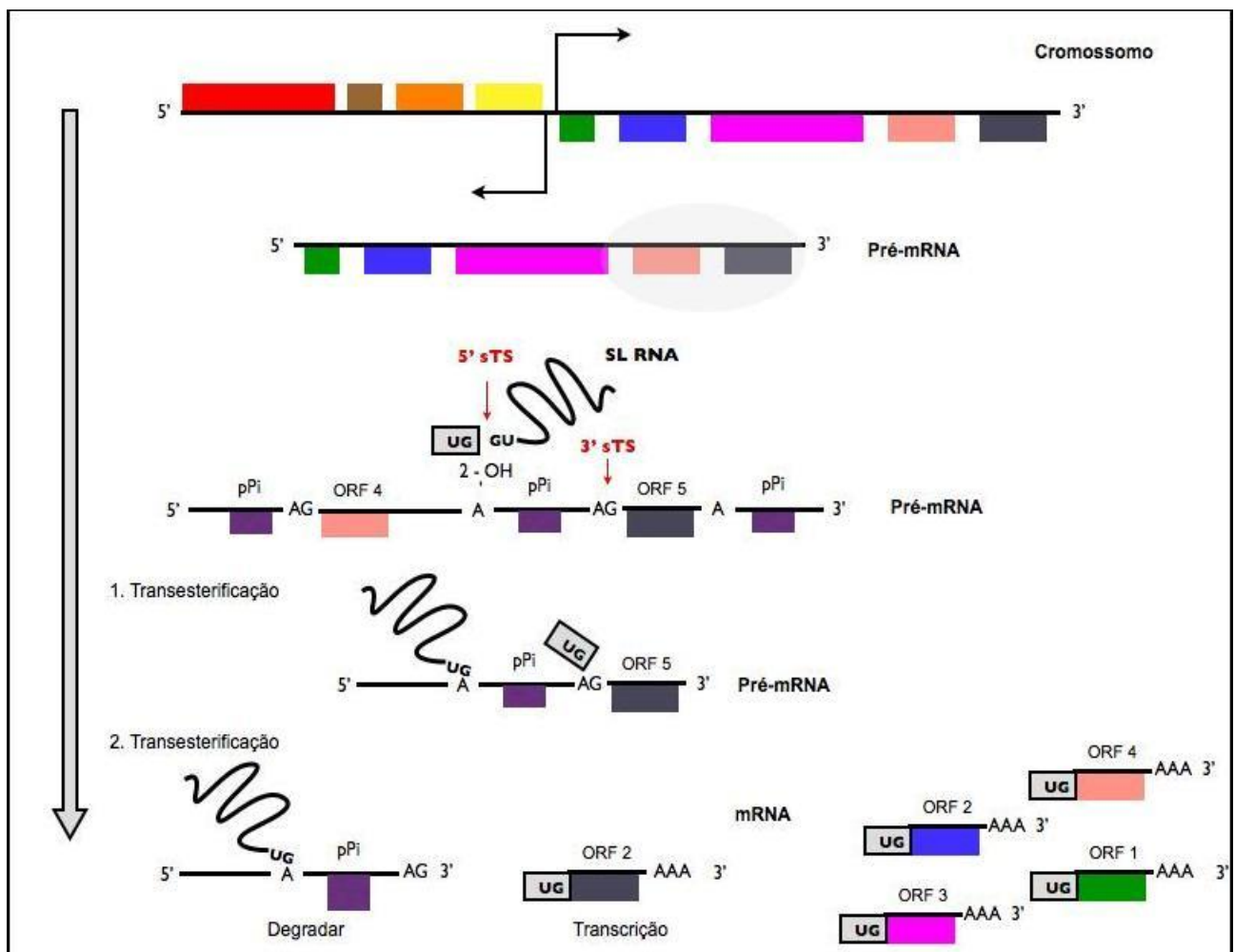


Figura 2. Processo de maturação do mRNA após a transcrição policistônica. Formação de pré-mRNA e adição do SL na região 5' UTR e calda poli A na extremidade 3' UTR. sTS – sítios de *trans-splicing*, ORF – *open reading frame*, AAA – calda poli A, pPi – região rica em pirimidina.

Uma forma de regular a transcrição nos tripanosomatídeos, além do controle pós-transcricional pelo *trans-splicing*, é o *splicing* alternativo, uma estratégia conhecida nos eucariotos superiores, a qual aumenta a diversidade dos transcritos de mRNA (NILSEN & GRAVELEY, 2010). O *splicing* alternativo é caracterizado pela presença de mais de um sítio de *trans-splicing*, ou seja, mais de um dinucleotídeo AG (3' splice site) presente na região 5' UTR do pré-mRNA. Esses novos sítios de *trans-splicing* são comumente observados nos diferentes estágios dos tripanosomatídeos (HELM et al., 2008; KOLEV et al., 2010; NILSSON et al., 2010; SIEGEL et al., 2010). A estratégia de *splicing* alternativo pode resultar na inativação da transcrição, diminuição da estabilidade do mRNA ou gerar um open reading frame alternativo, o qual pode alterar a funcionalidade e a localização do transcrito (PREUßER et al., 2012; RETTIG et al., 2012).

Apenas 1,5 % do genoma de eucariotos codifica proteínas e 98 % está relacionado com a regulação da expressão dos genes, tanto a nível transcricional ou pós-transcricional, ou seja, controlam tanto em nível de transcrição do gene ou se o mesmo é ou não traduzido. Portanto, uma parte maioritária do genoma está implicada com a localização e estabilidade do RNA mensageiro (LANDDER et al., 2001; VENTER et al., 2001). Existem vários fatores transcricionais localizados em regiões não traduzidas no DNA, os quais modelam a estrutura de pré-RNA mensageiros, regulando assim a sua produção, os quais, após serem processados até maturação, tornam-se RNAs mensageiros funcionais (MIGNONE et al., 2002).

Os genes de eucariotos apresentam nas suas extremidades 5' e 3' segmentos que são transcritos em RNA mensageiro (mRNA), mas não são traduzidos. Estes segmentos são chamados "região não traduzida 5' e 3'" ou simplesmente 5' UTR e 3' UTR. Nestes segmentos foram identificadas sequências de DNA envolvidas na regulação da expressão gênica e na interação com novos tipos de RNA (micro-RNA), estabilidade do mRNA e no controle do início da tradução (VAN DER VELDEN & THOMAS, 1999; BASHIRULLAH et al., 2001; JANSEN, 2001; SPENCE, 2009).

O tamanho da 5' UTR compreende entre 100 a 200 pb e é conservado em diferentes classes taxonômicas, enquanto que a 3' UTR é mais variável, na ordem de 200 a 800 pb em plantas/fungos e vertebrados, respectivamente (PESOLE et al., 2001). Em *T. cruzi* a razão do tamanho entre as UTRs (3' UTR/5' UTR = aproximadamente 4) é maior em relação a de plantas, invertebrados e fungos (aproximadamente 2), porém similar à de vertebrados (BRANDÃO & JIANG, 2009).

Em mamíferos, o conteúdo de purinas e pirimidinas nas regiões 5' e 3' é variável, apresentando a região 5' uma maior quantidade de G+C que a região 3' UTR (MIGNONE et al., 2002). Por outro lado, em *T. cruzi*, a composição G+C não difere entre as duas UTRs (BRANDÃO & JIANG, 2009), porém, pode ser alterada pela presença de sítios adicionais de *trans-splicing* e de EST (*Expressed Sequence Target*) entre os genes (BRANDÃO, 2008; BRANDÃO & JIANG, 2009). Também foi observada a presença de repetições de sequências simples (SSR) nas UTRs, sendo em maior quantidade na 3' UTR (acima de 90 %) e em torno de 20 % na 5' UTR (BRANDÃO & JIANG, 2009).

Variações nas UTRs (inserções, deleções, substituições) podem afetar a expressão gênica e isto pode constituir em uma estratégia evolutivas do *T. cruzi*, no sentido de ganhar vantagens funcionais sem, entretanto, levar a grandes mutações nos seus próprios genes. Um exemplo seria a evidência da capacidade de sobrevivência destes flagelados em diferentes ambientes (BRANDÃO, 2006). As UTRs apresentam uma taxa de mutação alta em relação a região traduzida, sugerindo ser uma região importante para estudos de filogenia, uma vez que a divergência encontrada nas UTRs se relaciona tanto a nível funcional quanto composicional (composição nucleotídica) (BRANDÃO & FERNANDES 2006; BRANDÃO 2008; BRANDÃO & JIANG. 2009).

Estudos demonstraram que o tamanho da região 5' UTR é 2 a 3 vezes menor que a 3' UTR para a maioria dos genes e, que 20 % dos 35 nucleotídeos que compõem a 5' UTR apresentam-se como sequências repetidas simples, assim como 90 % dos 264 nucleotídeos da região 3' UTR (CAMPOS et al. 2008; BRANDÃO & JIANG 2009). O uso do sequenciamento de nova geração em eucariotos permitiu a construção de mapas genômicos para as UTRs, onde foram identificados novos transcritos, incluindo os mRNAs de regiões não traduzidas (ncRNAs), e eventos de *splicing* alternativo (KOLEV et al., 2010; NILSSON et al., 2010).

Muito pouco se sabe sobre as UTRs e as estratégias de regulação transcricional em tripanosomatídeos, porém estudos sobre a composição nucleotídica em *T. cruzi* mostram que variações nestas regiões não traduzidas, representam uma estratégia de sobrevivência dos parasitos a diferentes ambientes celulares. Também tem sido sugerido que variações pontuais nas UTRs em *T. cruzi*, podem gerar perfis cepa-específicos ou até mesmo entre as diferentes linhagens do parasito (BRANDÃO 2006; BRANDÃO & JIANG 2009; ZICCARDI & BRANDÃO 2011), possibilitando o uso das regiões não traduzidas como potencial marcador

para tipagem molecular de *T. cruzi*.

1.2 Diversidade genética do *Trypanosoma cruzi*

1.2.1 Classificação do *T. cruzi* em Unidades Discretas de Tipagem

O conjunto de variações genéticas identificadas no genoma de *T. cruzi*, associado às diferenças no comportamento biológico de cepas e clones do parasito, têm servido de base para estudos que visam a identificação e caracterização molecular dos grupos populacionais deste parasito (BRISSE et al., 2003; LEWIS et al., 2009; DE WINNE et al., 2014). Essa diversidade populacional, que diverge há mais de 10 milhões de anos (BRIONES et al., 1999; BRISSE et al., 2003) levanta a questão se o *T. cruzi* é uma única espécie ou um táxon artificial que inclui mais de uma espécie (DEVERA et al., 2003).

Diversos estudos têm sido realizados para categorizar as diferentes cepas de *T. cruzi*. Os primeiros trabalhos agruparam as cepas de acordo com os perfis eletroforéticos de isoenzimas, reunindo-as em três grupos chamados zimodemas Z1, Z2 e Z3 (MILES et al., 1978). Posteriormente, através de estudos a partir de marcadores no genoma mitocondrial do parasito, foi possível classificar as diferentes cepas e isolados em esquizodemas, os quais se diferenciam com base nos perfis de restrição do kDNA (MOREL et al., 1980; ÁVILA et al., 1990). Estes estudos revelaram um alto grau de polimorfismo genético, resultante de um longo período na evolução clonal do *T. cruzi* (TIBAYRENC et al. 1986, TIBAYRENC & AYALA 1988). Alguns clones naturais do parasito estão amplamente dispersos e frequentes nas amostras, sugerindo uma relação relevante com a epidemiologia e a patogenia da doença de Chagas (TIBAYRENC, 1998). Através de um conjunto de marcadores genéticos foi possível classificar os *clonets*, aqueles clones/cepas que apresentam o mesmo perfil de marcadores genéticos, em subdivisões genéticas estáveis, conhecidas como DTU I e II (*Discrete Typing Unit* ou Unidade Discreta de Tipagem) (TIBAYRENC & AYALA 1991; TIBAYRENC 1995; SOUTO et al., 1996; TIBAYRENC, 1998).

Em 1999, a comunidade científica reuniu os isolados de *T. cruzi* em dois grupos principais que apresentavam diferentes características biológicas,

bioquímicas e moleculares, e estes passaram a ser denominados por *T. cruzi* I (DTU I) e *T. cruzi* II (DTU II) (ANONYMOUS..., 1999), presentes no ciclo silvestre e no ciclo doméstico de transmissão do parasito, respectivamente (BRIONES et al., 1999). Posteriormente, com o avanço das técnicas de genotipagem em multilocus, foi possível caracterizar a diversidade do *T. cruzi* em dois grandes grupos, DTU I e II, sendo este último classificado em cinco sub-grupos, denominados DTUs IIa, IIb, IIc, II d, IIe (BARNABÉ et al., 2000; BRISSE et al., 2000; TIBAYRENC 2003). Freitas et al. (2006) propuseram a existência de uma terceira linhagem principal em *T. cruzi*, designada de *T. cruzi* III ou Z III. Porém, após a Segunda Reunião Satélite, um sistema de unificação da nomenclatura do agente causador da doença de Chagas foi estabelecido, e nesse consenso as cepas de *T. cruzi* foram agrupadas em seis DTUs denominados de *T. cruzi* I a VI (ZINGALES et al., 2009).

1.2.2 Modelos de origem das DTUs

A divisão celular do *T. cruzi* é por fissão binária, um processo assexual que origina clones celulares (EL-SAYED et al 2005). Ao estudar os genes isoladamente, foi possível verificar que alguns grupos populacionais são heterozigotos (CHAPMAN et al., 1984; BOGLIOLO et al., 1996; CARRASCO et al., 1996), devido ao evento de hibridização entre os grupos TcII e TcIII originando TcV e TcVI (STURM et al., 2003; STURM & CAMPBELL, 2010). Enquanto que os demais isolados TcI, TcII, TcIII e TcIV são homozigotos. Existem duas teorias para a origem das populações de *T. cruzi*, ambas se baseiam em dois eventos de hibridizações, porém apresentam sugestões de ancestrais diferentes: Two-hybridization e Three Ancestor (WESTENBERGER et al., 2005; FREITAS et al., 2006) (Figura 3).

O modelo *Two-Hybridization* (Figura 3A) envolve um evento de hibridização entre os ancestrais TcI e TcII, resultando nas progênes homozigóticas TcIII e TcIV. O segundo evento de hibridização, mais recente, ocorre entre os grupos TcII e TcIII originando os grupos heterozigóticos TcV e TcVI. Através das análises de sequências múltiplas (MLST) para identificação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) entre as seis DTUs, foi possível observar a relação de ancestralidade dos isolados TcIII, TcV e TcVI como resultantes de eventos de

hibridização (BRISSE et al., 2003; WESTENBERGER et al., 2005; ROZAS et al., 2008; IENNE et al., 2010; LEWIS et al., 2011; YEO et al., 2011).

Por outro lado, Freitas e cols. (2006) descreveram o modelo de três ancestrais (TcI, TcII e TcIII) (Figura 3B), no qual ocorrem duas hibridizações recentes entre os isolados TcII e TcIII originando os grupos TcV e TcVI (heterozigóticos) (MACHADO & AYALA, 2001, 2002; FREITAS et al., 2006; ROZAS et al., 2007). As análises de marcadores para regiões gênicas que codificam a subunidade II da citocromo oxidase e a subunidade I da NADH desidrogenase (MACHADO & AYALA, 2001; FREITAS et al., 2006), além de microsátélites (FREITAS et al., 2006) e outros marcadores nucleares (MACHADO & AYALA, 2002; ROZAS et al., 2007), indicaram que não houve a participação de TcI no evento de hibridização que resultou nas progênies heterozigóticas. O compartilhamento de características entre as linhagens híbridas deve ser melhor estudado nos modelos de ancestrais sugeridos (ZINGALES et al., 2012).

Os dois modelos descritos para a origem das populações de *T. cruzi* basearam-se em marcadores moleculares distintos, bem como as ferramentas utilizadas para genotipar os parasitos, uma vez que, é necessária a utilização de diferentes marcadores para que as similaridades entre os grupos sejam identificadas, principalmente para os híbridos TcV e TcVI, os quais, muitas vezes estão representados em mais de um grupo populacional (CHAPMAN et al., 1984; SOUTO et al., 1996; BARNABÉ et al., 2000; MACHADO & AYALA, 2001; STURM et al., 2003; BROUTIN et al., 2006; ROZAS et al., 2008; LEWIS et al., 2011; YEO et al., 2011).

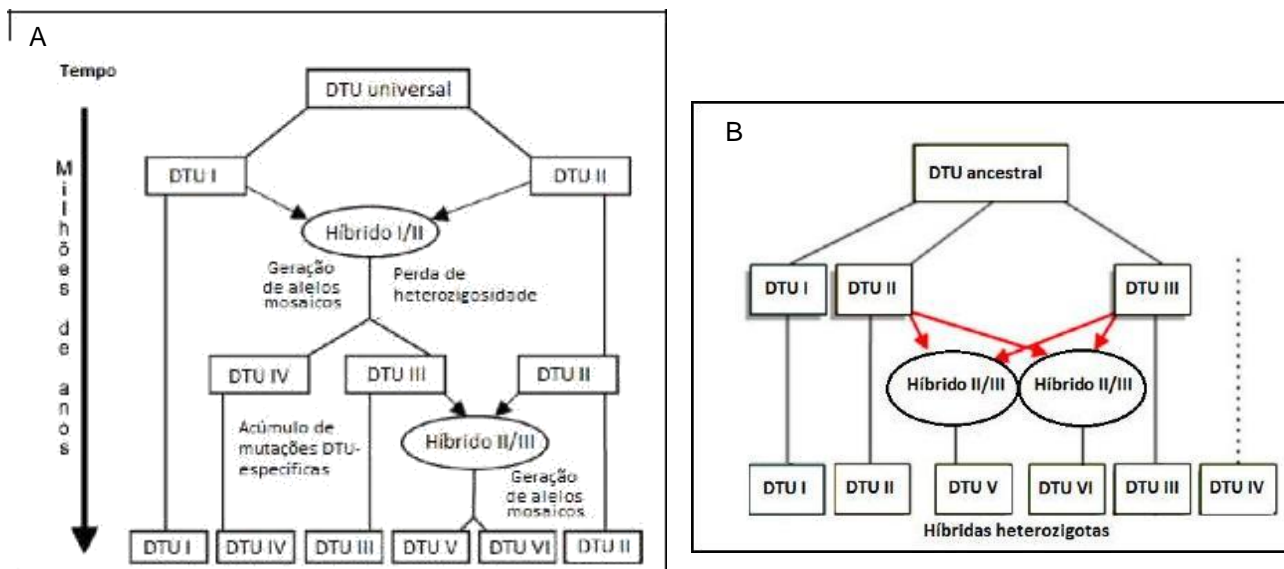


Figura 3. Representação esquemática da evolução dos grupos de *T. cruzi*. A – Modelo de duas hibridizações, B - Modelo de três ancestrais. Fonte: A - Retirado de Rodrigues 2015, adaptado de Westenberger et al., 2005; B - Retirado de Zingales 2012, adaptado de Freitas et al., 2006.

1.2.3 Distribuição geográfica das DTUs

O conhecimento da distribuição geográfica das populações de *T. cruzi* torna-se fundamental para melhor compreender os aspectos epidemiológicos da doença, uma vez que tem sido sugerido a associação entre os ciclos de transmissão do parasito (silvestre, peri-doméstico e doméstico) com as formas clínicas da doença de Chagas (COURA, 2007; MILES et al., 2009; STURM & CAMPBELL 2010; ZINGALES et al., 2012) (Figura 4).

Trinta por cento dos pacientes portadores da doença de Chagas crônica desenvolvem a forma clínica cardíaca, a qual é a mais dispersa nas Américas, e está associada ao ciclo doméstico de transmissão, relacionado à TcI, que por sua vez, também participa do ciclo silvestre (ZINGALES et al., 2012). Estudos mostram uma elevada diversidade genética entre os parasitos pertencentes a esta DTU, com a formação de cinco subdivisões (TcIa, TcIb, TcIc, TcId e TcIe), para os quais os ciclos silvestre e doméstico são bem definidos (SARAVIA et al., 1987; HERRERA et al., 2007; FALLA et al., 2009; CURA et al., 2010; OCAÑA-MAYORGA et al., 2010; GUHL & RAMIREZ 2011; RAMIREZ et al., 2013).

Por outro lado, tem sido sugerido que pacientes que desenvolvem alterações cardíacas em associação à presença de megaesôfago e/ou megacólon (manifestação cardio-digestiva), albergam parasitos pertencentes a TcII. As cepas dos grupos TcII e TcVI estão relacionadas com a forma digestiva na Colômbia e Venezuela (MACEDO et al., 2004; RASSI et al., 2010; RAMIREZ et al., 2013). Assim como TcII, as cepas de TcV e TcVI circulam na região sudeste e central da América do Sul, e também se relacionam ao ciclo doméstico (ZINGALES et al., 2012). Ainda não se tem relatos do envolvimento de TcV e TcVI com o ciclo silvestre, porém estudos apontam que possa ter ocorrido evento de hibridização entre cepas dos grupos TcII e TcIII, a partir de co-infecção em humanos, em mamíferos que vivem no peri-domicílio ou vetores domésticos, e que estas DTUs podem estar relacionadas a infecções em regiões da América do Norte (ZAFRA et al., 2008; ZINGALES et al., 2012).

Cepas TcIII estão presentes no Brasil e países adjacentes, sendo a sua maioria associada ao ciclo silvestre, principalmente encontradas em animais reservatórios (MARCILI et al., 2009a). Por outro lado, TcIV apresenta alta frequência de infecção em humanos, nos países da América do Sul (MILES et al 1981; ZINGALES et al., 2012). Seu ciclo de transmissão silvestre é arboreal, e pode estar associado a transmissão oral (YEO et al., 2005; MARCILI et al., 2009b).

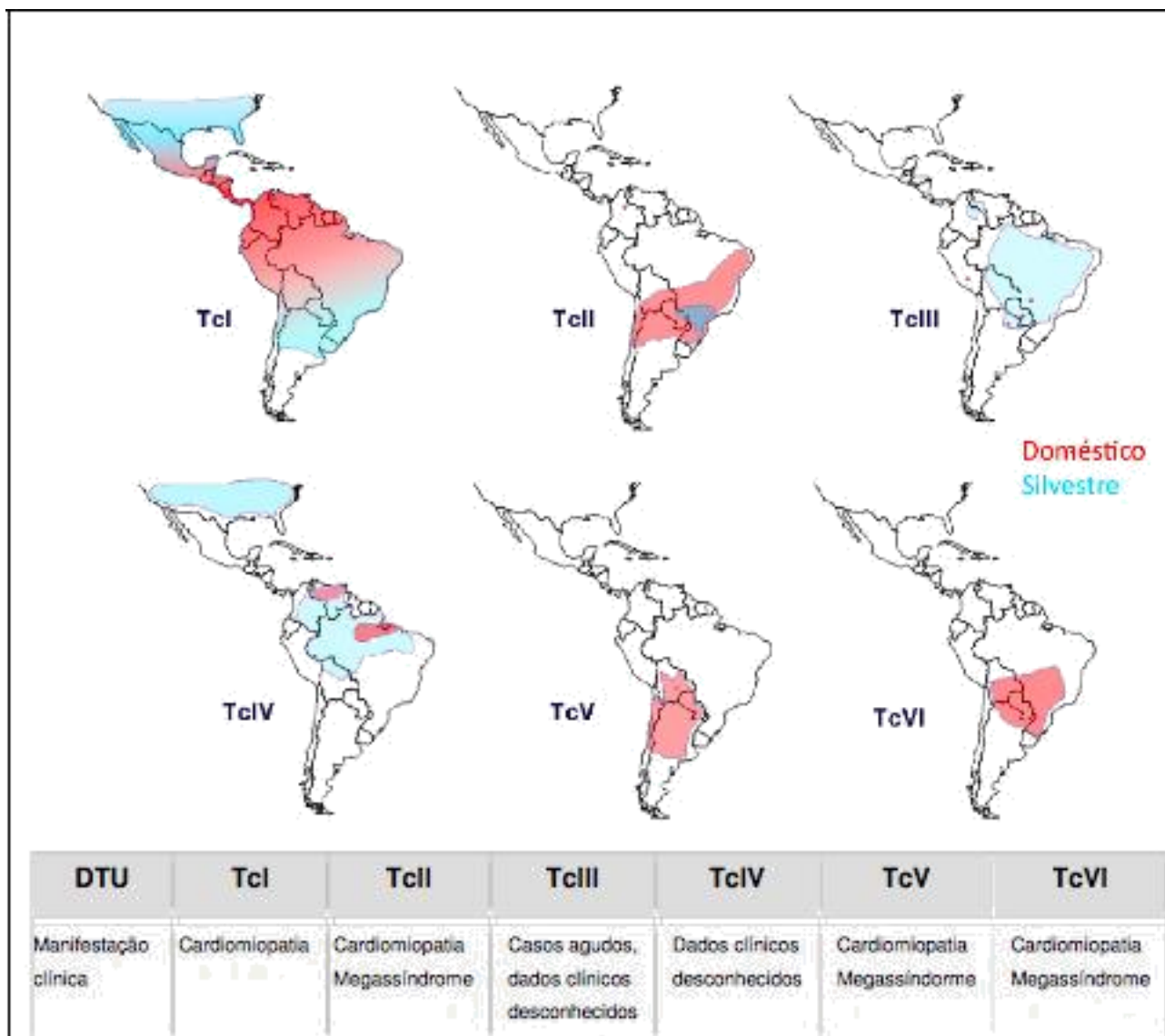


Figura 4. Distribuição geográfica aproximada das DTUs de *T. cruzi* nos ciclos de transmissão doméstico e silvestre, e manifestações clínicas da doença de Chagas (Retirado de Rodrigues 2015, adaptado de Zingales, 2012).

1.2.4 Marcadores moleculares para genotipagem

Para a caracterização molecular de *T. cruzi*, diferentes marcadores são utilizados, tais como os genes que codificam para RNA ribossomal, genes de mini-exon e microssatélites (SOUTO & ZINGALES, 1993; CLARK & PUNG, 1994; SOUTO et al., 1996; NUNES et al., 1997; OLIVEIRA et al. 1998; BASTRENTA et al., 1999; SOUTO; ZINGALES, 1993; BRISSE et al., 2001; MACEDO et al., 2004).

- RNA ribossomal

O ribossoma dos tripanosomatídeos apresenta, assim como nos eucariotos, duas subunidades, a menor e a maior, porém estas são de tamanhos maiores e apresentam uma organização singular. A subunidade maior é composta de duas moléculas de alto peso molar (24S α /24S β) e seis moléculas de baixo peso molecular, as quais, juntas, formam a região conhecida como 24S. Tanto a subunidade maior quanto a menor são compostas por sequências de DNA repetitivas separadas por duas regiões espaçadoras internas de transcrição (ITS) (LEON et al., 1978; HERNANDEZ et al., 1990; ARRUDA et al., 1990).

Estudos sobre esta organela em *T. cruzi* e outros tripanosomatídeos identificaram que a região 24s α do rDNA apresenta alta homologia com regiões distintas, como o domínio D7, que está localizado na extremidade 3' do gene rDNA de *T. cruzi* e contém 100 pb (ARRUDA et al., 1990, SOUTO & ZINGALES 1993). Com a amplificação deste segmento, em diferentes cepas do parasito, foi identificado um dimorfismo entre elas, sendo possível agrupá-las em três linhagens, de acordo com o tamanho do fragmento gerado pela PCR (SOUTO & ZINGALES, 1993). Sendo assim, produtos com 125 pb são indicadores das cepas TcII/TcVI, enquanto TcIII amplifica um produto de 110 pb. Quando fragmentos com 110 e 120 pb são visualizados, considera-se como grupo TcV (SOUTO et al., 1996). Quando o produto apresenta tamanhos de 120 pb, ou 125 pb ou 130 pb, a cepa é considerada como grupo TcIV (BRISSE et al., 2001). Para diferenciar entre os grupos TcIV com 125 pb e TcII/TcVI, realiza-se a amplificação do mini-exon (SOUTO et al., 1996), e para diferenciar TcII de TcVI é utilizada a região 18S, de acordo com Brisse et al. (2001). A PCR para o 18S rDNA gera fragmentos com 175 pb para TcI e 165 pb para TcII/TcIII/TcIV/TcV; apenas TcVI não é detectado pela PCR utilizando esse marcador genômico (FERNANDES et al., 1998; 2004; BRISSE et al 2001; BURGOS et al., 2007).

- Mini-exon

Os genes de mini-exons (ME) estão organizados em blocos repetitivos, em tandem, com importante papel durante o processamento dos RNAs mensageiros nos tripanosomatídeos. Os ME codificam o *spliced leader*, presente como uma

sequência altamente conservada de 39 nt na região 5' não traduzida (5' UTR) dos mRNA (Figura 3). Através do alinhamento de sequências de ME de diferentes cepas de *T. cruzi*, foram identificadas regiões de sequências altamente conservadas com 39 pb (os éxons), regiões com 73 pb correspondentes aos íntrons, apresentando 98 % de identidade entre as cepas, e regiões intergênicas divergentes com menos de 59 % de similaridades (MURTHY et al., 1992, SOUTO et al., 1996). A amplificação dessas regiões tem possibilitado diferenciar as cepas de *T. cruzi* em três grupos, com a geração de fragmentos de 300 pb para TcII e TcVI, 350 pb para TcI e quando não houver amplificação, o parasito é caracterizado como TcIII ou TcIV (SOUTO et al., 1996). Para diferenciar entre os grupos que apresentam o mesmo tamanho de fragmento amplificado, ou aqueles que não amplificaram, se faz necessário utilizar outros alvos, como o domínio D7 da região 24S α e a região 18S do rDNA (BRISSE et al., 2001).

Mais recentemente, foi observado que a amplificação do ME poderia separar TcI em três dos cinco subgrupos (FALLA et al., 2009; HERRERA et al., 2009; GUHL & RAMÍREZ 2011), com a formação de fragmentos com 228 pb para o subgrupo TcIa, 250 pb para TcIb e 200 pb para TcId (FALLA et al., 2009; HERRERA et al., 2009).

- **Microssatélites**

As análises de microssatélites foram inicialmente utilizadas para um maior entendimento da evolução das linhagens de *T. cruzi*, buscando esclarecer a origem clonal da espécie (OLIVEIRA et al. 1998, 1999, MACEDO et al. 2001). Através dessas análises foi possível identificar um decaimento da progressão multiclonal ou aneuplóide nos isolados de mamíferos, como consequência da seleção das cepas mais adaptadas a esse ambiente (OLIVEIRA et al. 1998, 1999, MACEDO et al. 2001). Por outro lado, os microssatélites apresentam um número alto de polimorfismos dispersos no genoma nuclear do parasito. Portanto, essas repetições em tandem de 2 a 6 nucleotídeos têm sido utilizadas para classificar as diferentes cepas de *T. cruzi* em linhagens (OLIVEIRA et al. 1998; DUFFY et al., 2009; LIARTE et al., 2009). Os fragmentos obtidos da amplificação dos microssatélites agrupam as diferentes cepas em três linhagens que estão associadas aos marcadores para DNA ribossomal e Mini-Exon. Dois grupos são bem definidos com estes marcadores, um

deles associado a fragmentos de 125 pb (D7 rDNA) para TcII e 300 pb (ME) para TcVI; e o segundo grupo relacionado a fragmentos de 110 pb (D7 rDNA) para TcIII e 350 pb (ME) para TcI. Um terceiro grupo é menos homogêneo e distante das cepas TcV (com 125 e 110 pb para o alvo D7 rDNA) e próximo a TcIII (com 110 pb para o alvo D7 rDNA) e TcII/TcVI (com 300 pb para o alvo ME) (OLIVEIRA et al., 1999; MACEDO et al., 2001; 2004).

Assim, de um modo geral, para confirmar a linhagem de *T. cruzi*, se faz necessária a utilização de vários marcadores moleculares, uma vez que cepas híbridas podem apresentar polimorfismos idênticos ao de cepas relacionadas a DTUs ancestrais/parentais, fazendo com que outros alvos devam ser identificados para o estabelecimento de um algoritmo fidedigno para a tipagem molecular do parasito.

- *Heat shock* 60, Isomerase glicose-6-fosfato e Citocromo oxidase II

Outras estratégias que utilizam combinações de genes, como os loci que codificam a proteína Heat shock 60 (HSP60), isomerase glicose-6-fosfato (GPI) e Citocromo oxidase II, têm sido utilizadas para caracterizar as seis DTUs de *T. cruzi* (D'ÁVILA et al., 2009; LEWIS et al., 2009). Estes alvos foram empregados através de análises por Multilocus Sequence Typing (MLST), que utilizam um painel de 4 a 10 genes, podendo fornecer resultados robustos de sequenciamento em estudos sobre a linhagem evolucionária do *T. cruzi*, assim como foram capazes de discriminar as DTUs do parasito (YEO et al., 2011; LAUTHIER et al., 2012). Outra proposta para tipagem molecular é a estratégia baseada na PCR-RFLP, pela análise complexa de polimorfismos presentes em 12 loci (ROZAS et al., 2007) ou em apenas três loci (24Sα rDNA, HSP60 e GPI) (LEWIS et al., 2009), sendo que essas combinações permitem identificar as cepas/isolados TcI, TcII, TcIII e TcIV, porém não são capazes de separar os grupos TcV de TcVI (LEWIS et al., 2009; COSENTINO & AGÜERO, 2012). A utilização da nested PCR também é utilizada para a tipagem de *T. cruzi* e pode ser aplicada em amostras biológicas e clínicas; por outro lado é uma técnica complexa que necessita de três etapas ou mais para confirmar a DTU (MARCET et al., 2006; BURGOS et al., 2007, 2010).

1.2.5 Potencial marcador para genotipagem em DTUs: família de Transsialidases

O *T. cruzi* apresenta uma variedade de moléculas de superfície, como Transsialidases (TS), mucinas, MASP e gp63, as quais são codificadas por centenas de genes diferentes distribuídos no genoma do parasito (EL SAYED et al., 2005). Sendo os genes que codificam TS os mais representativos no genoma, com um total de 1430 cópias e 693 pseudogenes, os quais codificam centenas de proteínas (60 a 200 kDa) (DOUGLAS et al., 2008). A função destas é retirar o ácido siálico do hospedeiro vertebrado e transferi-lo para a membrana do parasito, já que por sua vez, o protozoário não produz ácido siálico, o qual apresenta um importante papel na interação celular e na modulação do reconhecimento de microrganismos patogênicos pelas células hospedeiras dos mamíferos (SCHENKMAN et al., 1996; DOUGLAS et al., 2008). Além das TS estarem envolvidas com a virulência, estudos tem sugerido que cepas distintas de *T. cruzi* parecem ter conjuntos exclusivos destes genes (MARTIN et al., 2006; TZELEPIS et al., 2008), sugerindo que a família de genes TS em *T. cruzi* evoluiu ao nível da população, sob determinada pressão imunológica (ROSENBERG et al., 2011). Essa superfamília foi descrita há mais de 20 anos, e mesmo com o genoma completo do *T. cruzi* ainda não se tem conhecimentos sobre quais fatores estão implicados na tamanha diversidade gênica das TS.

Os genes que codificam TS são altamente polimórficos, e apenas 12 destes apresentam 90 % de identidade com genes TS que possuem alguma atividade enzimática (EL SAYED et al., 2005). Os genes para TS estão divididos em 4 grupos: Grupo I codifica TS com atividade enzimática nas formas tripomastigotas (TCNA, Shed Acute-Phase Antigen - SAPA) e nas formas epimastigotas (TS-epi); Grupo II compreende glicoproteínas de superfície (gp85, TSA-1, SA85, gp90, gp82 e ASP-2) que estão envolvidas com a adesão e invasão celular; Grupo III é representado pela FL-160 que tem ação inibitória das vias de complemento clássica e alternativa, e no grupo IV está incluída a proteína TsTc13 com função desconhecida (POLLEVICK et al., 1991; AGUSTI et al., 1997; FREITAS et al., 2011).

Para a caracterização dos grupos de TS, são utilizados como base o motivo VTVxNVxLYNR que é conservado em todos os membros descritos (371 genes) (CROSS & TAKLI, 1993; SCHENKMAN et al., 1994; EL SAYED et al., 2005; RUBIN-DE-CELIS et al., 2006; TZELEPIS et al., 2008; SOUZA et al., 2010; TONELLI et al.,

2010). As TS também podem ser caracterizadas pela sua localização cromossomal, perfil de expressão e propriedades antigênicas (FREITAS et al., 2011). Pelo estudo de Freitas et al. (2011), os autores identificaram mais quatro grupos de TS, através de projeções por *Multidimensional Scaling* DS, o que possibilitou a identificação de uma grande diversidade dentro dos grupos já existentes, porém apenas um grupo apresentou TS ativas.

As sequências de TS apresentam elevada variabilidade entre elas devido a fortes pressões seletivas nesta família, provocadas pela resposta imune dos mamíferos hospedeiros, uma vez que as TS são alvos para as respostas celular e humoral (FRASCH, 2000). Essas diferenças estão associadas a alterações na posição de aminoácidos ou localizadas próximas ao sítio ativo da proteína, o que consequentemente burla a resposta imune e a ação do sistema complemento do hospedeiro (RATIER et al., 2008). Estudos mostraram que um total de 721 genes codificam proteínas TS-like com atividade enzimática inativa, porém com nível homologia com TS ativas (EL SAYED et al., 2005). As proteínas inativas têm um papel imunogênico importante (TODESCHINI et al., 2002), pois influenciam na virulência das cepas, como observado por Burgos et al. (2013), onde DTUs que não codificam a isoforma iTS (inativa) apresentavam uma baixa virulência (TcI, TcIII e TcIV), já as cepas que apresentavam tanto a isoforma iTS quanto a forma ativa, eram mais virulentas (TcII, TcV e TcVI).

A expressão do fator virulência das TS, é diferente entre as linhagens filogênicas e pode estar associada com a evolução para as formas mais severas da doença de Chagas (RISSO et al., 2004). Essas variações no contexto desta família multigênica podem determinar as características biológicas individuais das cepas do *T. cruzi*, o que confere, por exemplo, ao parasito, habilidades de invadir um leque de células (tropismo celular). Isso, em parte, poderia levar às diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas, assim como os polimorfismos identificados na superfamília gênica de TS poderiam atuar como alvos em potencial para associar as DTUs e os biodemas de *T. cruzi* (PABLOS & OSUNA, 2012).

1.3 Técnicas de genotipagem

A primeira proposta de técnicas de genotipagem foi a PCR-RFLP, com o objetivo da tipagem molecular do *T. cruzi*, descrita por Brisse et al. (2001) a partir da combinação dos marcadores mini exon (ME), 24S α (SOUTO et al., 1996) e 18S rDNA (CLARK & PUNG, 1994). A interpretação dos resultados era basicamente realizada pela ausência ou presença de bandas, o que hoje em dia não é recomendado para um teste padrão ouro (TELLERIA & TIBAYRENC 2010). Sendo assim, a pesquisa de polimorfismos em 12 loci através do método de multilocus PCR-RFLP (MLP) descrita por Rozas et al. (2007), possibilitou observar diferenças inter-DTUs e, através dos resultados de um a três ensaios foi possível confirmar a tipagem em DTUs. Porém, é um método laborioso, com alta complexidade nas análises (ZINGALES et al., 2012).

Outras propostas utilizando a técnica de PCR-RFLP com marcadores para os alvos HSP60 e GPI (WESTENBERGER et al., 2005) e para rDNA (SOUTO et al., 1996), demonstraram que, quando associadas, foram capazes de discriminar as seis DTUs de *T. cruzi* (LEWIS et al., 2009). Enquanto que, a metodologia proposta por D'Avila et al. (2009), uma combinação de PCR-RFLP para COII (FREITAS et al., 2006), e amplificação por PCR das regiões intergênica (ITS) do SL (BURGOS et al., 2007) e do 24S α rDNA (SOUTO et al., 1996), apresentou maior confiabilidade para a classificação de cepas de *T. cruzi*.

Outra técnica bastante utilizada na tipagem molecular de bactérias e fungos, é o Multilocus Sequence Typing (MLST) (DINGLE et al., 2001; ENRIGHT et al., 2001). Este método tem sido empregado para estudos de estrutura populacional em *T. cruzi* e apresenta um potencial discriminatório para identificar polimorfismos em housekeeping genes presentes em alelos distintos (YEO et al., 2011). A técnica é mais comumente utilizada para espécies haplótipas, uma vez que as análises da amplificação e sequenciamento de cada gene geram sequências para cada locus analisado, produzindo um perfil alélico único (sequence type, ST). O *T. cruzi* é uma espécie diplóide e heterozigótica, portanto, ensaios com MLST podem gerar resultados com picos duplos na mesma posição alélica (bi-alélica), tornando possível sua aplicação em estudos filogenéticos (MACHADO & AYALA, 2001; SUBILEAU et al., 2009; YEO, et al., 2011). A classificação em DTUs pela técnica de MLST pode

ser realizada com quatro a seis genes de cópia única, como, por exemplo, os que codificam a enzima redutase 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMCOAR), isomerase glicose-6-fosfato (GPI), peroxidase mitocondrial (TcMPX) e GTP proteína de ligação RHO-like (RHO1) (YEO, et al., 2011).

Outros grupos sugerem o uso de um painel com 28 microssatélites pela técnica de Multilocus Microsatellite Typing (MLMT) e 10 fragmentos de genes mitocondriais (Maxicírculo MLST) para classificação populacional de *T. cruzi* (MESSENGER et al., 2015). O método de MLMT foi inicialmente aplicado para a discriminação entre as populações TcI e TcIII em vários países, revelando trocas genéticas entre TcI doméstico e TcI peridomiciliar; assim como para identificar o papel do reservatório mamífero na geração da variedade genotípica de *T. cruzi* e sua distribuição geográfica (LLEWELLYN et al., 2009; OCAÑA-MAYORGA et al., 2010). O método de maxicírculos MLST tem sido empregado em ensaios para a identificação de fluxo gênico que possa estar ocorrendo entre isolados relacionados de *T. cruzi*, cepas filogeneticamente próximas (MESSENGER et al., 2015). Estudos utilizando este tipo de associação foram capazes de evidenciar introgressão mitocondrial em isolados TcI geograficamente dispersos e intercambio genético entre cepas TcI nos ciclos de transmissão (MESSENGER et al., 2015; RAMIREZ et al., 2012).

A nested PCR tem sido utilizada para a identificação de gênero (primeiro par de iniciadores) e espécie (segundo par de iniciadores) em bactérias, e gênero e subgênero do complexo *Leishmania* spp, por exemplo. Além de ser recomendada para a detecção de alvos presentes em baixo número de cópias em amostras provenientes de solo, de água, alimentos (DUPIN et al. 2002).

Estudos sobre a detecção e caracterização molecular do *T. cruzi* em DTUs mostram que o uso da nested PCR com os marcadores moleculares já descritos (regiões ITS do SL e 24S α rDNA), apresenta vantagens em relação as demais metodologias, pois consegue identificar a DTU diretamente de amostras biológicas e clínicas, sem ser necessário o isolamento do parasito (MARCET et al., 2006; CARDINAL et al., 2008; BURGOS et al., 2007, 2010).

A metodologia de Sanger é um método enzimático de terminação da cadeia, ou seja, a síntese enzimática da fita complementar do DNA é interrompida pela adição de um didesoxinucleotídeo (ddNTP), que não possui a hidroxila na posição do carbono 3 da cadeia. Uma das limitações do método é a necessidade de amplificação prévia por PCR, assim como apresentar baixa qualidade de leitura para *amplicons* acima de 900 pb (SANGER et al., 1977; COLLINS et al., 2003).

A partir de 2005, as plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS - *Next Generation Sequencing*) começaram a ser comercializadas e vêm evoluindo com rapidez. O sequenciamento em massa revolucionou o diagnóstico molecular de doenças genéticas humanas, e desde o seu surgimento, o custo vem diminuindo, aumentando assim o benefício de sua aplicação. Os sistemas de NGS vêm sendo introduzidos na área da pesquisa aplicada, e muitos laboratórios estão implementando na rotina a identificação molecular (de alvos ou genomas completos) de diferentes agentes infecciosos, como também em casos de surtos epidemiológicos, e em estudos de epigenética, proporcionando maior rapidez do diagnóstico de pacientes e mais informações sobre o agente etiológico causador da doença. Dentro dessa nova abordagem, destacamos: 454, Solexa, SOLID e ION Torrent (VOELKERDING et al., 2009; MELLMANN et al., 2011; ROHDE et al., 2011; LIU et al., 2012; IHLE et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

O sistema de ION Torrent, diferente dos demais, não utiliza bases marcadas por fluoróforos. A reação é processada em Chip de sílica, contendo milhares de micro poços para aplicação das amostras, e tem início pela adição de uma base na fita complementar a fita de DNA molde com a consequente liberação do íon H^+ e alteração do pH do meio; sendo cada base adicionada detectada por um transistor e convertida em um sinal (LIU et al., 2012; APPLIED 2015).

1.4 Diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*

1.4.1 Diagnóstico convencional e molecular

Por muitos anos, o diagnóstico etiológico do *Trypanosoma cruzi* vem sendo realizado através da detecção direta do parasito no organismo, utilizando métodos parasitológicos ou, através da detecção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi*, utilizando métodos sorológicos (LUQUETTI & RASSI, 2000). Assim, o Ministério da Saúde determina que o diagnóstico na fase aguda da infecção, caracterizada pela presença de um grande número de parasitos circulantes, seja realizado por métodos parasitológicos através de observação ao microscópio, e que os testes sorológicos sejam utilizados durante a fase crônica, devido a baixa e intermitente parasitemias resultante da resposta imune do hospedeiro frente aos antígenos de *T. cruzi* (MS, 2005).

Resultados inconclusivos da sorologia geram um grande impacto para os bancos de sangue, não apenas pelo elevado número de descartes de bolsas de sangue, mas também pelo aumento da transmissão da doença por transfusão sanguínea. No Brasil, até 2006, foi estimado que 55.000 doadores soropositivos (DIAS, 2006), sendo entre 12 a 25 % o risco de transmissão por transfusão via sangue contaminado (LUNARDELLI et al., 2007). Técnicas moleculares baseadas na PCR vêm sendo cada vez mais usadas em conjunto aos testes sorológicos, o que tem possibilitado confirmar o diagnóstico da infecção nos casos de sorologia discordante (por dois ou mais testes) e conseqüentemente, levando a uma redução do número de casos "não-diagnosticados" da doença de Chagas (MS, 2005).

Ensaio baseados em PCR para o diagnóstico e monitoramento da carga parasitária por *T. cruzi*, são realizados a partir de DNA total recuperado de sangue periférico do paciente. Porém, uma das dificuldades em inquéritos epidemiológicos é a coleta do material em áreas distantes dos laboratórios onde será processado e analisado. Contudo, Ávila e cols. (1991) desenvolveram um procedimento eficiente para a preservação do sangue e posterior utilização em PCR, misturando-o a uma solução de Guanidina-HCl contendo EDTA, o que tem sido usado com sucesso para o transporte em áreas rurais, e posterior condicionamento do sangue em Guanidina/EDTA (GEB - *Guanidine EDTA Blood*) à temperatura ambiente por até

seis meses (ÁVILA et al. 1991; 1993; WINCKER, et al.,1994(a; b)).

Por outro lado, a literatura relaciona diversos materiais biológicos que podem ser usados como fonte de obtenção de DNA de *T. cruzi* (medula óssea, córnea, bexiga e sangue periférico) (CORRAL, et al.,1989; BOCZKO, et al., 2005; HERRERA et al., 2007), incluindo tecidos em parafina (biopsias), que datam de mais de 40 anos. Através da análise desses materiais consegue-se relacionar o parasito com as alterações encontradas em alguns órgãos (MESQUITA et al., 2001; BAREA et al., 2004; FERNANDES et al., 2004). Um estudo preliminar para detectar DNA nuclear de *T. cruzi* através de PCR, não demonstrou diferença significativa entre o uso de amostras de soro e sangue total, indicando, assim, a utilização de soro como uma alternativa para o diagnóstico molecular do *T. cruzi* (RUSSOMANDO et al., 1992). Esse foi o primeiro relato do uso de soro para o diagnóstico de infecção congênita em recém-nascidos, porém, não foi estabelecido se amostras de soro gerariam sensibilidades satisfatórias para aplicação no diagnóstico de rotina de pacientes na fase crônica da doença. A utilização de soro sem tratamento prévio para sua preservação, como proposto por Russomando e cols. (1992), seria de grande valia devido a considerável facilidade no manuseio, quando comparado ao sangue total. Uma perspectiva promissora seria a possibilidade do uso de soro para a detecção e quantificação de DNA do parasito, aproveitando as mesmas amostras que são coletadas para triagem sorológica em laboratórios de referência e bancos de sangue.

A especificidade da PCR é de 100 % de acordo com os iniciadores desenhados para os alvos genômicos do *T. cruzi*, porém na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, a sensibilidade pode variar entre 40 % a 100 %, o que depende de vários fatores como, área geográfica dos pacientes, grupo populacional de *T. cruzi*, além das características intrínsecas do próprio método, as quais podem estar associadas com diferenças nas condições da PCR, como concentrações dos reagentes e ciclagem térmica (SCHIJMAN et al 2003; PIRON et al 2007; FITZWATER et al 2008; BRITTO, 2009). Os iniciadores utilizados apresentam uma importante influência na sensibilidade, em função do número de cópias presente no genoma do parasito (RAMIREZ et al., 2009; SCHIJMAN et al., 2011; QVARNSTROM et al., 2012). Atualmente, os iniciadores mais comumente empregados foram desenhados para as sequências multi-cópias específicas do genoma nuclear (DNA satélite) e mitocondrial (kDNA) (MOSER et al 1989; STURM et al. 1989).

Em resposta a demandas de Organizações Internacionais (OMS, OPAS,

DNDi, MSF), foram realizados estudos envolvendo diferentes grupos de vários países que empregam metodologias de PCR (convencional e em Tempo real) em suas rotinas, com a finalidade de se estabelecer um consenso para aplicação do método molecular como ferramenta de diagnóstico e monitoramento de tratamento específico (SCHIJMAN et al., 2011; RAMÍREZ et al 2015). Verificou-se que ambos os alvos testados (DNA nuclear Satélite e kDNA) demonstraram sensibilidades semelhantes, apesar da taxa de positividade ter sido maior para o kDNA, em amostras reconstituídas contendo baixas concentrações do parasito, em relação ao DNA nuclear Satélite. Porém o kDNA revelou menor especificidade quando comparado ao alvo DNA nuclear Sat (SCHIJMAN et al., 2011).

Como comentado no item 1.1.2, os minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *T. cruzi*, representados em cerca de 5000 a 10000 cópias por parasito, contém segmentos de sequências conservadas, quatro por molécula, denominados “mini-repeats”, os quais contribuem como alvos ideais para o desenho de iniciadores para uso no diagnóstico molecular (DEGRAVE et al., 1988; STURM et al., 1989). Estudos iniciais empregando as regiões conservadas dos minicírculos do kDNA como alvo para detecção de *T. cruzi* em sangue de pacientes com doença de Chagas crônica de diferentes áreas geográficas, revelaram alta sensibilidade diagnóstica e especificidade (BRITTO et al., 1993, 1995; WINCKER, et al., 1994(a; b)), demonstrando o potencial de aplicação da PCR, como ferramenta complementar aos testes sorológicos, no diagnóstico da doença de Chagas crônica.

Por outro lado, sequências repetidas em tandem no genoma nuclear de *T. cruzi*, também têm sido utilizadas como alvo para detecção do parasito por PCR, com elevadas sensibilidade e especificidade (MOSER et al., 1989; VIRREIRA et al., 2003; PIRON et al., 2007). Entretanto, o número de cópias destes alvos moleculares (DNA Sat e kDNA) nas diferentes cepas/isolados do *T. cruzi* pode variar de acordo com a linhagem do parasito (ELIAS et al., 2003; 2005; ZINGALES et al., 2009; DUFY et al., 2009; 2013; QVARNSTORM et al., 2012), e por conseguinte, diferenças na sensibilidade da PCR são observadas.

Uma vez padronizada, a técnica de PCR é capaz de detectar a presença de DNA de *T. cruzi* em pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica, os quais apresentam baixa parasitemia, assim como a sua aplicação na avaliação de eficácia terapêutica da doença de Chagas, como critério de cura parasitológica juntamente com os testes sorológicos (BRITTO et al., 1995; 2001; BRITTO, 2009).

Nas últimas décadas, houve um enorme avanço na metodologia de PCR, com

o estabelecimento de sistemas diferentes para uso na PCR em Tempo Real (qPCR). A detecção dos produtos amplificados pela qPCR ocorre em tempo real e pode ser realizada por diferentes sistemas, sendo os mais utilizados, o SYBR Green e TaqMan.

O SYBR Green é um corante que se intercala a fita-dupla de DNA, porém é inespecífico, uma vez que pode se ligar a qualquer fita-dupla de DNA, sendo a especificidade da reação determinada pelos iniciadores usados, como na PCR convencional. O sistema TaqMan consiste no uso de uma sonda específica, além dos iniciadores externos, que reconhece parte da sequência que está sendo amplificada, anelando na região específica. As sondas TaqMan apresentam em uma das suas extremidades, um fluoróforo, e na outra, um inibidor de fluorescência. Sondas que não são incorporadas ao fragmento amplificado não emitem fluorescência pela presença do inibidor na extremidade 3', enquanto o anelamento da sonda ao alvo específico libera fluorescência, pois o inibidor é deslocado pela ação da DNA polimerase. Esse fenômeno é conhecido como FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (ALBERTS et al., 2002).

1.4.2 Avanços no diagnóstico molecular do *Trypanosoma cruzi*

Mesmo após a compreensão de que as diferentes cepas de *T. cruzi* envolvidas na infecção e sua distribuição regional têm sido apontadas como possíveis causas de diferentes apresentações clínicas e respostas ao tratamento etiológico (DE FREITAS et al., 2006), o diagnóstico da doença de Chagas, ainda não é capaz de identificar a linhagem/cepa diretamente de amostras de pacientes acometidos. Desta forma, a busca de marcadores moleculares para tipagem dos isolados de *T. cruzi*, que sejam capazes de reuni-los em grupos distintos, visando sua caracterização do ponto de vista da epidemiologia e da patogenia (CAMPBELL et al., 2004), tornou-se um grande desafio no que tange o diagnóstico etiológico da doença de Chagas.

Os ensaios moleculares de qPCR podem ser úteis tanto para a demonstração dos níveis absolutos de parasito presente em uma determinada amostra, quanto para a sua genotipagem, permitindo descrever uma possível associação entre a carga parasitária, as subpopulações de *T. cruzi* e a progressão da doença de Chagas. Estudos que empregam marcadores fluorescentes para fragmentos específicos (*barcoding*) e PCR em Tempo Real (sistemas SYBR Green e TaqMan), têm demonstrado resultados menos subjetivos, pela completa automação dos equipamentos (DUFFY et al., 2009; RAMIREZ et al., 2010; HAMILTON et al., 2011; HIGUERA et al., 2013), uma vez que o poder de discriminação das DTUs por ensaios que empregam algoritmos de PCR, baseia-se na visualização de diferenças nos tamanhos dos fragmentos amplificados, após eletroforese em gel, o que pode gerar erros na interpretação dos resultados pelo observador (COSENTINO & AGÜERO 2012; ZINGALES et al., 2012). Além de utilizar mais de duas reações para concluir a classificação do parasito.

Alguns trabalhos têm utilizado a ferramenta de qPCR em amostras de cultura e em amostras de pacientes agudos, ou enriquecidas em meios seletivos para o crescimento do parasito, para classificar o *T. cruzi* em DTUs. Estes estudos têm como base, pequenas variações nas sequências dos alvos amplificados para a tipagem do parasito, resultando em diferenças nas Temperaturas de Melting (TM) dos produtos amplificados, geradas por programas do próprio equipamento, em forma de gráficos, fornecendo assim resultados de genotipagem menos subjetivos (DUFFY et al., 2009; RAMIREZ et al., 2010).

A introdução do sistema de *High Resolution Melting* (HRM) ocorreu há poucos anos atrás e demonstrou que esta tecnologia apresenta alta sensibilidade em detectar variações de até um único nucleotídeo, após a amplificação em tempo real (REED & WITWER, 2007; KRYPUY et al., 2006; WU et al., 2009). Desta forma, a técnica de HRM tem sido bastante empregada para avaliar metilações no DNA (WOJDACZ & DOBROVIC 2007), em ensaios de genotipagem de agentes infecciosos (WITWER et al., 2003; PRICE et al., 2007; REED et al., 2007; ERALI et al., 2008; FARRAR et al., 2009; MCKINNEY et al., 2009; WITWER et al., 2009) e para as análises de SNPs (polimorfismos de base única) e microssatélites (ROULEAU et al., 2009; WU et al., 2009; ARTHOFER et al., 2011; THANCHOMNANG et al., 2013; CECCARELLI et al., 2014).

Na doença de Chagas, um trabalho utilizou a ferramenta de HRM para classificar o parasito em seis DTUs, utilizando iniciadores para a região inter-gênica

do *Splice Leader* (SL-IR) e 24^{sa} do DNA ribossomal (HIGUERA et al., 2013). Outro grupo utilizou o citocromo B para identificar a fonte de alimentação dos vetores de *T. cruzi*, possibilitando gerar conhecimentos sobre as espécies de insetos envolvidas com a transmissão do *T. cruzi* para seres humanos em diferentes regiões, assim como foi possível classificar o parasito em seis DTUs com alta sensibilidade, especificidade e rapidez (PEÑA et al., 2012). Levando em consideração que a genotipagem padrão, por PCR convencional, utiliza algoritmos para diferentes alvos moleculares, resultando em uma maior complexidade para a interpretação dos resultados, além do tempo necessário para concluir a caracterização das linhagens do *T. cruzi*, a escolha da metodologia de HRM parece ser promissora para ensaios de genotipagem, de uma maneira geral.

A genotipagem do parasito em amostras clínicas é tão importante quanto a sua quantificação, uma vez que, a variabilidade entre os isolados, em conjunto com as características imunogenéticas do hospedeiro humano podem ser responsáveis pelo largo espectro de manifestações clínicas da doença. A esta resposta imune, produzida por um mecanismo de auto-agressão, em função de estímulos sustentados, se somaria a agressão que o próprio parasito produz no hospedeiro (HIGUCHI et al., 1993; HIGUCHI, 1997; ZHANG e TARLETON, 1999). Porém, como supracitado, o diagnóstico da doença de Chagas por PCR direcionada tanto para o kDNA como para o DNA Sat, ainda não apresenta a capacidade de definir a DTU do parasito diretamente de amostras de pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica. Até o momento, para genotipar parasitos de amostras clínicas, torna-se necessário o isolamento prévio do parasito. Porém, a ocorrência de co-infecção é frequente, e o cultivo em meio axênico pode gerar a seleção de cepas/clones mais susceptíveis ao crescimento em determinado meio de cultura, resultando assim em uma tipagem, também, seletiva da amostra.

Alguns marcadores moleculares utilizados na classificação de *T. cruzi* são cópias únicas e, a grande maioria dos marcadores mais frequentemente usados, está representada em um número relativamente baixo de cópias no genoma do parasito. Assim, estudos de genotipagem baseados em famílias multigênicas, como as trans-sialidases (TS), as quais representam quase 10 % do genoma de *T. cruzi* (ELSAYD et al., 2005), poderiam ser realizados, uma vez que, as TS já são amplamente utilizadas em ensaios sorológicos de rotina, os quais utilizam tanto proteínas secretadas, quanto aquelas ancoradas na superfície do parasito (mucinas) (UMEZAWA et al., 1996; SILVEIRA-LACERDA et al., 2004; PICKA et al., 2007), e

estão envolvidas a vários fatores associados com a variabilidade entre as DTUs (ANDERSSON, 2011; FRÁNZEN et al., 2011; PABLOS & OSUNA, 2012).

1.5 Justificativa

Em geral, os ensaios baseados em PCR para o diagnóstico e monitoramento da carga parasitária por *T. cruzi*, são realizados a partir de DNA total recuperado de sangue periférico do paciente. Considerando a possibilidade do uso de soro para a detecção de DNA do parasito e fazendo uso das mesmas amostras que são coletadas para triagem sorológica em laboratórios de referência e bancos de sangue, este trabalho de Tese, avaliou o desempenho da técnica de qPCR para a detecção e quantificação de DNA de *T. cruzi* a partir de amostras pareadas de sangue e soro de pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica com diferentes manifestações clínicas da doença.

O uso cada vez mais frequente da PCR, tanto para a pesquisa diagnóstica quanto para a genotipagem de *T. cruzi*, tem possibilitado a identificação de uma grande diversidade de marcadores genômicos do parasito, os quais, em conjunto (algoritmo), podem ser utilizados para a caracterização molecular de cepas/isolados. Entretanto, o diagnóstico molecular *per se*, ainda não é capaz de genotipar o parasito diretamente de amostras clínicas. É reconhecida a elevada frequência de infecções mistas, por mais de uma cepa de *T. cruzi*, nos pacientes com doença de Chagas, e isso pode gerar complicações quando se busca o isolamento prévio do parasito, seguido do seu cultivo em meio axênico para posterior análise genética. Essa limitação decorre pela seleção de determinados clones, os quais tornam-se suscetíveis à proliferação no meio de cultura (ZINGALES et al., 2012). Este cenário aponta para a importância do desenvolvimento de uma metodologia mais simples e direta para a tipagem em DTUs, que possa ser utilizada complementarmente ao diagnóstico molecular.

Marcadores moleculares como os microssatélites, SL-IR e genes mitocondriais, ainda não conseguem definir uma associação entre DTUs e os biotipos específicos de *T. cruzi*. Por outro lado, a ampla variabilidade identificada no conteúdo das famílias multigênicas, como as trans-sialidases, sugere que esta família de genes em *T. cruzi*, evoluiu ao nível da estrutura populacional do parasito,

sob determinada pressão imunológica (ROSENBERG et al., 2011). Variações no contexto dessa família multigênica, poderiam determinar as características biológicas individuais das cepas de *T. cruzi*, conferindo, por exemplo, habilidades ao parasito para invadir um leque de células (tropismo celular), o que em parte, poderia contribuir para o amplo espectro de manifestações clínicas da doença de Chagas (PABLOS & OSUNA, 2012). Mais especificamente, a composição nucleotídica das UTRs da superfamília de trans-sialidases, demonstra a ocorrência de sítios polimórficos, os quais, em conjunto, poderiam gerar perfis cepa-específicos ou até mesmo serem usados para diferenciar entre as linhagens do *T. cruzi*.

Levando em consideração que o diagnóstico molecular da doença de Chagas ainda não é capaz de definir a linhagem populacional do *T. cruzi* diretamente de amostras clínicas e que a família multigênica de trans-sialidases e a sua região 5' UTR apresentam um potencial sugestivo para a caracterização populacional do parasito, este trabalho de Tese realizou uma análise composicional de nucleotídeos, em um segmento genômico contendo a 5' UTR e parte codificante da trans-sialidase, em cepas representativas das seis DTUs de *T. cruzi*, com a finalidade de identificar regiões polimórficas entre as diferentes cepas/clones e posterior validação deste marcador molecular para genotipagem de *T. cruzi* com a ferramenta PCR HRM (*High Resolution Melting*).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar novas abordagens para a quantificação da carga parasitária e genotipagem de *Trypanosoma cruzi* como complemento ao diagnóstico molecular de pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica.

2.2 Objetivos específicos

I. Avaliar a eficácia da PCR em Tempo Real como método de detecção/quantificação de *T. cruzi* em soro e em sangue de pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica;

II - Analisar a composição de sequências das 5' UTRs de Trans-sialidases em cepas e clones representativos das seis DTUs de *T. cruzi* para a identificação de sítios polimórficos;

III - Desenvolver ferramentas complementares ao diagnóstico molecular, a partir da análise composicional, que possibilitem a definição da cepa ou grupo populacional responsável pela infecção em pacientes acometidos pela doença de Chagas.

3 MATERIAIS e MÉTODOS

Parte I

Avaliação do uso de soro para a detecção e quantificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* para o diagnóstico molecular da infecção

Inicialmente foi avaliada a migração do DNA do parasito e das células humanas para o soro após coagulação do sangue periférico. Para isso foi utilizado um kit comercial contendo DNA exógeno, o qual foi adicionado à amostra de sangue previamente contaminada com diferentes concentrações de formas epimastigotas de *T. cruzi* CL Brener, obtidas de cultura. A reação de qPCR ocorreu como descrito por Pirón e cols. (2007), em formato multiplex com sondas TaqMan direcionadas para o DNA nuclear satélite de *T. cruzi* e para o gene humano RNase P, como controle interno de amplificação.

Curvas de calibração padrão para sangue e soro foram geradas, e através da comparação dos valores de Ct (threshold cycle) para as diferentes concentrações de parasito, a sensibilidade do método para quantificar DNA de *T. cruzi* em soro foi determinada.

3.1 Pacientes acometidos pela doença de Chagas e controles

O estudo envolveu 40 pacientes com doença de Chagas crônica com sorologia reativa anti-*T. cruzi*, recrutados pelo Ambulatório de Doenças de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) - Universidade de Pernambuco (UPE) Para a sorologia, foram utilizados dois testes imunoenzimáticos comerciais (ELISA), convencional e recombinante, CHAGAS TEST ELISA III (ABBOT/BiosChile - Bioschile Ingenieria Genética S.A., Santiago, Chile) e Imuno-ELISA CHAGAS (WAMA Diagnóstica, São Paulo, Brasil), ambos recomendados pelo Ministério da Saúde (Technical Note 03/06-CGLAB/CGDT/DEVEP/SVS/MS) (MS, 2005 e 2006).

Segundo o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (MS 2005), os pacientes foram classificados de acordo com as seguintes manifestações clínicas: cardíaca (n=23), digestiva (n=4), cardiodigestiva (n=7) e assintomática (n=6). Vinte indivíduos sem infecção pelo *T. cruzi* (com sorologia não reagente), moradores de áreas não endêmicas formaram o grupo controle. Todos os indivíduos recrutados não receberam transfusão sanguínea ou transplante de órgão, e não receberam tratamento para a infecção pelo *T. cruzi* até o momento da coleta de sangue. Todos os participantes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que informa sobre os procedimentos para a coleta de amostras, aprovado pelo comitê de ética do Centro de Estudos Aggeu Magalhães da Fiocruz (CAEE: 0096.0.095.000- 07) (ANEXO A).

3.2 Extração de DNA a partir de sangue e soro

Dez mililitros de sangue venoso foram coletados de cada paciente e controle. Cinco mililitros foram imediatamente transferidos para tubos BD Vacutainer® Plus Plastic Serum e mantidos por no mínimo 30 minutos a temperatura ambiente para obtenção do soro (geração de coágulo + fase sérica). Os 5 mL de sangue remanescentes foram transferidos para tubos BD Vacutainer® Plus Plastic EDTA K3 (BD, São Paulo, Brasil). O DNA foi extraído a partir de 200 µL de sangue e soro através do *kit* de extração *QIAamp DNA Blood Mini kit* (Qiagen, Valencia, CA), seguindo o protocolo do fabricante com algumas modificações na eluição do DNA. O material genético extraído de amostras clínicas de soro foi eluído com 50 µL e, as amostras de sangue com 80 µL do tampão de eluição do *kit*. O DNA eluído foi armazenado a -20°C para os posteriores ensaios de qPCR.

3.3 PCR quantitativo em Tempo Real formato duplex

Os ensaios de PCR em Tempo Real (qPCR) foram realizados em volume final de 20 µL, contendo TaqMan Universal PCR Master Mix AmpErase a 1X (Applied

Biosystems, Foster City, CA USA); 300 nM dos iniciadores *Cruzi1* (5' AST CGG CTG ATC GTT TTC GA 3') e *Cruzi2* (5' AAT TCC TCC AAG CAG CGG ATA 3') e 100 nM da sonda *TaqMan Cruzi3* (5' FAM-CAC ACA CTG GAC ACC AA-NFQ-MGB 3') (Invitrogen®, São Paulo, Brasil), específicos para a região satélite do DNA nuclear de *T. cruzi*; *TaqMan RNaseP Control Reagents kit* a 0,5 X (VIC/TAMRA) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 5 µL de DNA, seguindo o protocolo descrito por Pirón et al. (2007). As condições de ciclagem seguiram uma etapa a 95 °C por cinco minutos e 40 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 58°C por um minuto. As amplificações foram realizadas no equipamento ABI Prism 7500 Fast (Life Technologies, California, USA).

Curvas-padrão de calibração, para sangue e soro, foram construídas a partir de diluições seriadas de DNA extraído de amostras de sangue contaminado artificialmente com epimastigotas de *T. cruzi* CL-Brener, variando entre 10⁵ a 0,5 parasitos por mililitro de sangue. Para a curva-padrão em soro, sangue total foi contaminado com *T. cruzi* antes da obtenção do soro (por coagulação das células sanguíneas), seguido da extração de DNA.

3.4 Avaliação da migração do DNA para o soro após coagulação do sangue

Para verificar a migração do DNA para o soro após coagulação das células sanguíneas, 5 mL de sangue total de indivíduo soronegativo para *T. cruzi* foram acrescidos com DNA exógeno sintético - Exo-IPC DNA, fornecido em formato de *kit* (*TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents*) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), na concentração final de 1X. O Exo-IPC DNA não possui homologia com qualquer sequência de DNA disponível em bancos de dados públicos. O *kit* também contém um conjunto de iniciadores e sonda *TaqMan* (VIC/TAMRA) específico para este DNA sintético. Em paralelo, outra amostra de 5 mL de sangue de indivíduo soronegativo para *T. cruzi*, foi contaminada artificialmente com epimastigotas de *T. cruzi* CL-Brener para a concentração final de 10 parasitos/mL. Ambos os procedimentos para a obtenção das amostras de sangue reconstituídas (Exo-IPC DNA e células de *T. cruzi*), foram realizados anteriormente à coagulação do sangue e isolamento do soro. A extração de DNA e os ensaios de

qPCR foram realizados como descrito acima.

3.5 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em cinco réplicas. Os dados foram expressos como médias aritméticas ou mediana \pm desvio padrão. Foram utilizados o teste-*t* de Student ou o teste *Mann–Whitney Rank Sum* para analisar a significância estatística das diferenças observadas. Um *p-value* menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises foram conduzidas com o programa *Sigmaplot Windows* versão 12.0 (Systat Software, Inc., California, USA).

Parte II

Potencial de aplicação das 5` UTRs da família gênica de trans-sialidases para diferenciar entre os grupos populacionais de *Trypanosoma cruzi*

Com a finalidade de aprimorar o diagnóstico da infecção por *T. cruzi*, foi avaliado o potencial da região não traduzida 5` UTR da família gênica de Trans-sialidases (TS) de *T. cruzi*, em diferenciar cepas e clones do parasito nas diferentes linhagens ou DTUs. Inicialmente, realizamos um estudo *in silico* a partir de sequências de TS disponíveis no GeneBank (*National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Maryland, USA*), para o desenho de iniciadores específicos para a região selecionada. Foi padronizada uma PCR convencional, com posterior clonagem e sequenciamento dos produtos gerados pelas distintas cepas/clones de *T. cruzi* analisadas. Para alcançar uma quantidade expressiva de sequencias, foi realizado, em paralelo ao sequenciamento capilar por Sanger, o sequenciamento de nova geração (NGS). Dessa forma, foi possível identificar a composição nucleotídica e a presença de sítios polimórficos nas regiões 5' UTR de TS das diferentes cepas/clones *T. cruzi*, e com o suporte de programas de bioinformática, realizamos os agrupamentos das cepas e desenhamos novos iniciadores, os quais foram utilizados para os ensaios de padronização da PCR em

Tempo Real utilizando o sistema *High Resolution Melting* (HRM). Este é um método de genotipagem sensível, com base nas características de desnaturação térmica dos produtos amplificados, através das diferenças espécie-específicas das sequências do DNA das cepas estudadas.

3.6 Cepas e clones de *Trypanosoma cruzi* e outros protozoários

A Tabela 1 apresenta a relação das cepas e clones de *T. cruzi* empregados no estudo, além de outras espécies de protozoários analisadas. As células de *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, *Trypanosoma rangeli*, *Phytomonas* sp. e as espécies de Crithidia foram oriundas da coleção de Protozoários do Instituto Oswaldo Cruz (COLPROT), da Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz (ColTryp) e alguns isolados foram cedidos gentilmente pelo Dr. Jean Max Toledo da Universidade Estadual de Maringá (PR). As espécies de *Leishmania* foram provenientes da coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC). Para *Toxoplasma gondii*, utilizamos um estoque de DNA mantido no nosso laboratório, além da amostra de DNA da cepa CP300 de *T. cruzi* que foram fornecidas pelo grupo do Dr Christian Probst da Fiocruz/Paraná. A cepa referente a este DNA está destacada em negrito na Tabela 1. Também foram cedidos DNA obtidos de tecidos de camundongo infectado com a cepa Y pela Dra Katia Calabrese do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia da Fiocruz / RJ. Mais detalhes sobre as cepas e clones estão presentes no ANEXO B.

Tabela 1. Cepas/clones representativos das seis *Discrete Typing Units* de *Trypanosoma cruzi* e outros parasitos unicelulares

Cepas/Clones de <i>Trypanosoma cruzi</i>	DTU
D8, DM28c, Colombiana, G, Tulahuen c10	Tc I
Y, PR1281, 12SF	Tc II
3663, 222	Tc III
4167, AM14, CAN III	Tc IV
LL014, SO3, Bug 2149	Tc V
CL (CTIOC – 005), CL (Dr Jean Max), CP300 , Peruana	Tc VI
<i>T. cbat</i>	Tc VII*
<i>T. cruzi marinkellei</i>	-
Y (fígado e baço de camundongos)	TcII
Outros Kinetoplastidea e Apicomplexa	
<i>Trypanosoma rangeli</i>	
<i>Leishmania braziliensis</i> (MHOM/BR/1975/M2903)	
<i>Leishmania shawi</i> (MCEB/BR/1984/M8408)	
<i>Leishmania lainsoni</i> (MHOM/BR/1981/M6426)	
<i>Leishmania major</i> (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN)	
<i>Toxoplasma gondii</i>	
<i>Phytomona</i> sp (<i>Euphorbia pinea</i>)	
<i>Chritidia oncopelti</i>	
<i>Chritidia fasciculata</i>	

* *T. cruzi* bat - DTU independente das seis DTUs de *T. cruzi* , nomenclatura sob investigação científica (ZINGALES et al., 2012).

3.6.1 Cultivo de células

As células de *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, *Trypanosoma rangeli*, *Phytomonas* sp e as duas espécies de *Crithidia* foram cultivadas em BOD (B.O.D. Mod. 347) (Fanem, São Paulo, Brasil) a 28 °C em cultura axênica em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) (BD, Maryland, USA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino termodesativado (Cultilab, Campinas/SP, Brasil). As células foram cultivadas até atingirem a fase logarítmica de crescimento, após sucessivas passagens, de acordo com o perfil da curva de crescimento de cada cepa. No meio da fase logarítmica de cultivo, as células foram centrifugadas a 800 g durante 10 minutos, lavadas três vezes com PBS (Tampão salina: Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2) e ressuspensas em 1 mL de PBS. Os epimastigotas foram submetidos a contagem em câmara de Neubauer e ajustados para uma concentração final na ordem de 10⁸ células/mL. As células foram armazenadas a -20°C até o momento da extração de DNA dos parasitos.

Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/1981/M6426), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/1984/M8408) e *L. (L.) major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN) foram mantidos na forma de inóculo, em meio semi-sólido NNN a 28° C. Para ampliação da massa de parasitos, as células foram transferidas para meio líquido LIT suplementado com 10 % de soro fetal bovino termodesativado (Cultilab, Campinas/SP, Brasil) e mantidas à 28° C. As culturas foram ampliadas por sucessivas passagens a cada quatro dias, até alcançarem a concentração de parasitos necessária, em torno de 10⁸ parasitos/mL, como descrito acima.

3.7 Extração de DNA dos parasitos cultivados

Após a homogeneização do concentrado de células de cultura, aproximadamente 10⁸ parasitos/mL mantidos em PBS, procedeu-se com a extração de DNA, empregando-se o *kit* de extração *QIAamp DNA Mini kit* (Qiagen, Valencia, CA), segundo as recomendações do fabricante, com pequenas modificações. Estas

foram relacionadas aos ajustes no volume de proteinase K, onde o protocolo do kit sugere 10 µL, sendo otimizado para 30 µL; o mesmo para o tampão de eluição, com alteração de 200 µL para 100 µL. Os DNAs recuperados foram dosados com o espectrofotômetro Picodrop 200 (Biolab A/S, São Paulo, Brasil) e avaliados quanto à pureza pela razão entre 1,7 a 1,9 das absorbâncias a 260 nm / 280 nm.

3.8 Desenho dos oligonucleotídeos para a região 5' UTR de Trans-sialidases de *Trypanosoma cruzi*

O alinhamento das 5' UTRs de aproximadamente 400 cópias da família gênica de trans-sialidases identificadas no genoma de *T. cruzi* CL-Brener (www.tritrypdb.org) foi realizado e editado para o formato FASTA, empregando o editor de sequências do MEGA V.6.0 (TAMURA et al., 2013). A região selecionada para o desenho do conjunto de iniciadores representou um segmento contendo o provável sítio de trans-splicing localizado na região 5' UTR e parte da região codificante (ORF) da família gênica de trans-sialidases localizada após o códon iniciador (descrito pela anotação genômica). Para o desenho de iniciadores foram utilizados os programas do NCBI (Primer Blast) e Primer Express. A Figura 5 representa um esquema da região *T. cruzi* selecionada com o posicionamento dos cinco iniciadores desenhados (Tabela 2) para o estudo.

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Invitrogen[®] (São Paulo, Brasil) e diluídos em solução TE 1X (Tris-HCl 10 mM; EDTA 10 mM pH 8,0) a uma concentração de 100 µM (solução estoque) e diluídos em água ultrapura para a concentração de 10 µM (solução de uso) que foram distribuídos em alíquotas armazenadas a -20 °C até o momento de uso.

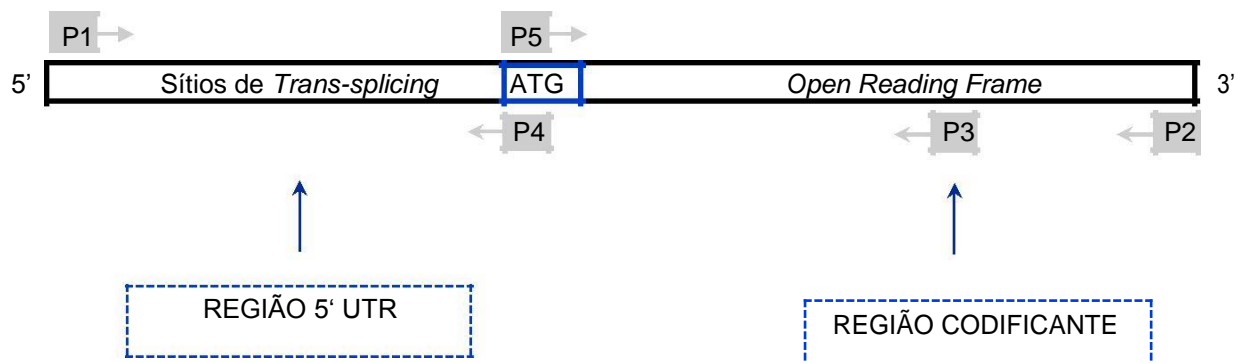


Figura 5 - Representação do segmento genômico selecionado para o estudo. O fragmento que está representado em 400 cópias no genoma de *T. cruzi* inclui majoritariamente a 5' UTR e parte da região codificante (ORF) da família gênica de trans-sialidasas. P1, P2, P3, P4 e P5 - código dos iniciadores.

Tabela 2 - Iniciadores para a região 5' UTR de Trans-sialidasas de *T. cruzi*

Código	Aplicação
P1	PCR convencional em amostras de cultura e sangue / Sequenciamento/ PCR HRM
P2	PCR convencional em amostras de cultura / Sequenciamento/ PCR HRM
P3	PCR convencional em amostras de sangue / Sequenciamento/ PCR HRM
P4	PCR com o sistema HRM
P5	PCR com o sistema HRM

P1 a P5 - códigos dos iniciadores que amplificam o segmento contendo a 5' UTR de TS

3.9 Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase convencional para a região 5' UTR de TS de *T. cruzi*

3.9.1 Sensibilidade Analítica e PCR Gradiente

A sensibilidade analítica da técnica de PCR direcionada para a região 5' UTR de TS de *T. cruzi* foi avaliada através da construção de onze curvas padrão, diluídas serialmente, utilizando as seguintes cepas/clones: DM28c e D8 (TcI), Y e PR1281 (TcII), 3663 e 222 (TcIII), 4167 e CAN III (TcIV), Bug e SO3 (TcV) e CL Brener (TcVI). As curvas foram construídas a partir de uma concentração inicial de 10^6 parasitos na forma epimastigota adicionados à 1 mL de lisado de sangue (GEB: 500 μ L sangue + 500 μ L de solução de guanidina-HCl 6 M e EDTA 0,2 mM) de indivíduo soronegativo para *T. cruzi*, seguida de diluições seriadas na proporção 1:10 em sangue humano lisado (GEB). A faixa de concentrações das curvas variou entre 5×10^4 a 0,5 parasitos/mL. Precedendo a etapa de extração de DNA, foi necessária a fervura a 100 °C por 3 minutos de todos os pontos da curva. A extração de DNA de sangue contaminado artificialmente com parasitos foi realizada como descrito no item 3.7.

As amostras de DNA de cada ponto das curvas foram testadas em duplicatas em uma PCR gradiente, a fim de selecionar a temperatura ótima de anelamento dos iniciadores. A reação de PCR consistiu em 0,2 μ M de cada iniciador (P1/P2 ou P1/P3), tampão de reação 1X, MgCl₂ a 2mM, dNTPs a 200 μ M cada, 1U de enzima Taq Polimerase Platinum (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 5 μ L de DNA e água ultra-pura para completar o volume final de 50 μ L. As condições de ciclagem térmica da PCR gradiente, realizada no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foram: 94 °C por 5 minutos (ativação da enzima), seguida de 40 ciclos a 94 °C por 10 segundos, gradiente de temperaturas de 55 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C e 62 °C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 30 segundos (extensão), com uma etapa final de 10 minutos a 72 °C.

Foram utilizados controles negativos (DNA extraído de lisado de sangue de indivíduo comprovadamente não infectado e branco da reação contendo todos os reagentes da PCR sem a adição do DNA) e positivo (DNA genômico de CL Brener

de cultura). Os procedimentos para os ensaios de PCR obedeceram às Boas Práticas de Laboratório, quer pela divisão física das etapas pré e pós-reação, assim como a descontaminação prévia de micropipetas e plásticos, em geral, por luz ultravioleta e/ou o uso de hipoclorito de sódio a 0,5% nas bancadas e áreas de trabalho.

Dez microlitros dos produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,5 % imerso em tampão TBE 0,5X (Trizma base a 89 mM, Ácido Bórico a 88 mM e EDTA a 2 mM, pH=8) corado com *Nancy-520 DNA Gel Stain* (SIGMA-Aldrich[®], São Paulo, Brasil). Os fragmentos amplificados foram visualizados por transiluminação com luz ultravioleta e registrados digitalmente pelo sistema de fotodocumentação de imagens em gel UVP Bioimaging Systems (Upland, CA, USA). A eletroforese foi conduzida por aproximadamente 2 horas a 80 V. O peso molecular dos produtos de PCR foi determinado em comparação ao marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder) (Invitrogen, California, USA) incluído nos géis.

3.9.2 Teste de Especificidade Analítica

Foram realizados ensaios tanto *in silico*, através da busca de similaridade dos iniciadores com sequências depositadas nos bancos de dados do NCBI e do TriTryDB (GeneDB), quanto experimentalmente, empregando amostras de DNA obtidas de diferentes espécies da família Kinetoplastidea, a fim de avaliar a especificidade dos iniciadores desenhados para a região 5' UTR de TS de *T. cruzi* (P1/P2 ou P1/P3). Amostras de DNA de *Trypanosoma rangeli*, *Phytomonas* sp., *Chritidia oncopelti*, *Chritidia fasciculata*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania shawi*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania major*, *Tcbat*, *T. cruzi marinkellei* e *Toxoplasma gondii* foram submetidas às mesmas condições de reação da PCR convencional e ciclagem térmica, descritas acima, após a definição da temperatura ótima de anelamento.

3.9.3 Comparação entre a Sensibilidade da PCR direcionada para o alvo 5' UTR de TS e o alvo para o DNA do cinetoplasto (kDNA) de *T. cruzi*

As mesmas amostras de DNA referentes às onze curvas padrão descritas anteriormente foram submetidas a PCR para o alvo kDNA de *T. cruzi*, de acordo com o método validado seguindo o consenso internacional, em resposta à demanda da OMS-OPAS (SCHIJMAN et al., 2011). Foram utilizados iniciadores para os minicírculos do kDNA de *T. cruzi* (121: 5'- AAA TAA TGT ACG GKG GAG ATG CAT GA -3' e 122: 5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3'), descritos por Sturm e cols. (1989) e modificados por Wincker e cols. (1994a), que amplificam um fragmento de 330 pb do genoma mitocondrial do parasito. A reação de PCR para o alvo kDNA foi realizada em volume final de 50 µL contendo tampão de PCR 1X (Invitrogen®, São Paulo, Brasil), MgCl₂ a 4 mM (Promega®, Madison, WI), 1 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), dNTPs a 0,2 mM cada, iniciadores 121/ 122 na concentração de 0,2 µM cada, 5 µL de DNA e água ultrapura para completar o volume final.

A amplificação para o alvo kDNA foi efetuada em termociclador Gene Amp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), nas seguintes condições de ciclagem térmica: uma etapa inicial a 94 °C por 10 minutos para ativação da enzima Platinum® Taq DNA Polymerase, seguida de 2 ciclos iniciais a 98 °C por 1 minuto e 64 °C por 2 minutos. Posteriormente prosseguiu-se com 38 ciclos: 94 °C por 1 minuto e 64 °C por 1 minuto, finalizando com uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

A detecção dos produtos amplificados em gel de agarose foi realizada conforme descrito no item **3.9.1**. A sensibilidade analítica da PCR para ambos os alvos (5' UTR de trans-sialidases e kDNA) foi comparada entre as distintas cepas/clones de *T. cruzi*.

3.10 Clonagem e sequenciamento pelo método capilar de SANGER

Para clonagem e sequenciamento por SANGER (SANGER et al., 1977), foi necessário obter os produtos amplificados para a região 5' UTR de TS em diferentes cepas/clones de *T. cruzi*, através de PCR convencional com os iniciadores P1/P2, como descrito no item **3.9.1**, após a definição da temperatura ótima de anelamento. A única alteração foi o emprego de uma quantidade conhecida de DNA das amostras (100 ng) referentes às cepas DM28c, Colombiana, D8 e G (TcI), Y (TcII), 3663 (TcIII), 4167 (TcIV), LL014 (TcV) e CL Brener (TcVI).

3.10.1 Preparo das células quimicamente competentes

A metodologia teve início após a semeadura de uma cultura de *Escherichia coli* linhagem TOP10 ou DH5 α em placa de Petri contendo meio LB sólido (Luria-Bertani acrescido de Agar-Agar) sem antibiótico, e crescimento por 18h a 37 °C. Após o tempo de crescimento, uma colônia foi selecionada e adicionada em 25 mL de meio LB líquido sem antibiótico e incubação por mais 18h a 37 °C com agitação de 200 rpm (células em fase log). Em seguida, 500 μ L do meio rico em bactérias foram transferidos para 100 mL de meio LB sem antibiótico e a cultura foi incubada entre 1 a 2 horas a 37 °C sob agitação a 200 rpm, até atingir DO de 0,4 (600 nm). Posteriormente, a cultura foi distribuída em cinco tubos de 50 mL e incubada a 4 °C por 10 minutos. Ao término desse período, o material foi centrifugado a 1.260 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e, o concentrado de células foi ressuspenso em 10 mL de solução filtrada de CaCl₂ na concentração de 100 mM e HEPES a 1 %. O material foi acondicionado no gelo (4 °C) por 20 minutos. As células foram centrifugadas a 1.260 g por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em 1 mL de solução filtrada contendo CaCl₂ 100 mM gelado e glicerol previamente autoclavado para concentração final de 10 %. Por fim, o volume final foi distribuído em alíquotas de 100 μ L, em microtubos de 1,5 mL, e submetidas a congelamento instantâneo em gelo seco e álcool, antes de serem armazenadas a -80 °C até o momento de uso.

Segundo o teste de eficiência quanto à competência química das células de

E. coli, baseado nos protocolos dos kits TOPO® TA Cloning® (Invitrogen) e *pGEM T- easy Vector Systems* (Promega), foi verificada a obtenção de colônias com 10^8 cfu / μ g DNA, como preconizado no manual dos kits.

3.10.2 Clonagem dos produtos amplificados

O volume final de 50 μ L dos produtos de PCR com os iniciadores P1/P2, para as cepas/clones referenciados no item **3.10**, foi purificado empregando o *kit* Illustra™ GFXTM PCR DNA and Gel Band (GE HealthCare, Uppsala, Suécia) e eluído em 35 μ L do tampão de eluição do *kit*. Em seguida, os produtos de cada cepa foram clonados seguindo o protocolo do *kit* pGEM® - T Easy Vector Systems (Promega®, Wisconsin, EUA) e/ou *TOPO®-TA Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen®, São Paulo, Brasil).

A etapa de ligação no vetor pGem T - Easy foi realizada de acordo com o fabricante, em volume final de 10 μ L, contendo 5 μ L de tampão de ligação 2X, 1 μ L da enzima T4 DNA ligase (3 unidades/ μ L), 1 μ L (50 ng/ μ L) de pGem T – Easy Vector, 1 a 3 μ L de produto de PCR purificado (podendo ser menos, caso a concentração de produto esteja alta), e água ultra-pura. A reação foi incubada por 18h a 4 °C.

Para o vetor pCR4 do *kit* *TOPO®-TA Cloning*, a ligação ocorreu em volume final de 6 μ L, contendo 1 μ L do plasmídeo (10 ng/ μ L), 1 μ L de solução de sal (NaCl a 200 mM e MgCl₂ a 10 mM) e entre 0,5 a 4 μ L de produto de PCR purificado, incubada a temperatura ambiente por 5 - 30 minutos.

Após a ligação, independente do plasmídeo utilizado, a etapa de transformação foi realizada a partir de 2 μ L da reação de ligação, em microtubo de 1,5 mL contendo as células competentes, descongeladas previamente em gelo, seguindo incubação a 4 °C por 30 minutos. Em seguida, foi realizado o choque térmico a 42 °C por 90 segundos e posteriormente foram adicionados 400 μ L de meio SOC ou LB, com incubação a 37 °C por 1 h, sob agitação a 200 rpm.

Em paralelo, placas contendo LB sólido com ampicilina (a uma concentração final de 100 μ g/mL) foram mantidas por pelo menos 30 minutos a uma temperatura de 37 °C, antes do uso. Um volume de 40 μ L de X-Gal (50 mg/mL) foi adicionado a

cada placa, no caso do vetor em questão possuir o gene Lac Z, o qual deverá ser inativado na presença de um DNA exógeno (resultante da ligação), formando colônias brancas, ou pela capacidade do vetor em hidrolisar o X-Gal, quando não há incorporação do DNA exógeno, resultando em colônias de coloração azul. As placas foram incubadas por 18 horas a 37 °C. Após essa etapa, as colônias brancas foram selecionadas para a reação de PCR de colônia.

3.10.3 Seleção dos clones através da PCR de Colônia

Através da PCR com iniciadores específicos para regiões dos plasmídeos pGem T- Easy Vector e pCR4, M13 senso (5' GTA AAA CGA CGG CCAG 3') e M13 reverso (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') (Invitrogen, São Paulo, Brasil), foi possível recuperar o inserto clonado, diretamente da colônia.

A mistura de reação consistiu em 0,2 µM dos iniciadores M13, tampão de PCR 1X, MgCl₂ a 2mM, dNTPs a 200 µM cada, 1 U da enzima Taq DNA Polimerase Recombinante, uma colônia “branca” adicionada a 10 µL de água ultrapura e água ultrapura para completar o volume de 50µL. Todos os reagentes utilizados foram da Invitrogen (São Paulo, Brasil).

A reação ocorreu em 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto, seguido por 90 segundos à temperatura de 55 °C e um minuto à 72 °C, e uma extensão final da reação à 72 °C por 5 minutos, em termociclador Gene Amp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ou *Matercycler* (Eppendorff, Hamburg, Alemanha). Como controle negativo da clonagem, foi utilizada uma colônia azul. Os produtos da PCR de colônia foram visualizados em gel de agarose a 1,5 %, após uma corrida por aproximadamente 2 horas a 80 V, por transiluminação com luz ultravioleta e registrados digitalmente pelo sistema de fotodocumentação de imagens em gel. O peso molecular dos produtos de PCR foi determinado em comparação ao marcador de peso molecular de 100 pb incluído durante a corrida nos géis.

3.10.4 Reação de Sequenciamento pelo Método Capilar de SANGER

Os produtos amplificados contendo o inserto ligado ao vetor foram purificados

com o *kit* Illustra™ GFXTM PCR DNA and Gel Band (GE HealthCare, Uppsala, Suécia). As amostras foram sequenciadas empregando o *Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* segundo as especificações do fabricante (Applied Biosystems, CA, USA) e processadas pelo equipamento ABI Prism™ (Applied Biosystems, CA, USA). Os dados foram armazenados no programa para análise de sequências de DNA (plataforma de Sequenciamento / Fiocruz).

3.10.5 Edição, Alinhamento e Identidade das sequências

As sequências dos produtos da PCR de colônia foram editadas no formato FASTA e alinhadas através do programa ClustalW (LARKIN et al., 2007). Os nucleotídeos referentes à região do vetor foram retirados, e com o auxílio do programa CLC *Main Workbench* v.6 (Qiagen, Valencia, CA) foi gerado o consenso a partir do alinhamento das sequências desejadas (produtos amplificados). As sequências foram alinhadas e agrupadas por cepas/clones de *T. cruzi*. Para a confirmação da identidade das sequências obtidas, foi realizada a busca por similaridades com as sequências da família gênica de trans-sialidases, disponíveis no banco de sequências TriTryDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) e através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.10.6 Identificação das Sequências DTU-exclusivas

As sequências obtidas de cada cepa/clone, pertencentes a uma mesma DTU, foram agrupadas de acordo com a identidade observada entre elas, ou seja, pela composição de nucleotídeos, através do programa R (www.r-project.org). A seleção das sequências DTU-exclusivas consistiu na identificação de fragmentos exclusivos, que apresentaram elevada identidade na composição de nucleotídeos entre as cepas/clones analisadas representativas de uma mesma DTU. Estes fragmentos foram obtidos pelo estudo composicional com os resultados do estudo de *K-mers*

(20 nt) (PEVZNER et al., 2001) da primeira leitura de *Next Generation Sequencing* (NGS) descrito no item **3.11.2**.

3.10.7 Análise composicional das Sequências das 5' UTRs de Transsialidases das seis DTUs de *T. cruzi*

Para a análise composicional das sequências obtidas pelo sequenciamento capilar (SANGER), foi realizada, inicialmente, a comparação da distribuição de dinucleotídeos, entre as sequências de referência dos genes de TS da cepa CL Brener depositadas no banco de dados NCBI. Estas foram editadas para o arquivo FASTA e o segmento selecionado, delimitado pelas sequências dos iniciadores P1 e P2 em suas extremidades 5' e 3', respectivamente, continha a região da 5' UTR e uma porção da região codificante. A análise de dinucleotídeos foi realizada através do programa COMPSEQ do pacote EMBOSS (emboss-bug © emboss.open-bio.org).

As sequências DTU-exclusivas foram alinhadas pelo programa *CLC Main Workbench* v.6 (Qiagen, Valencia, CA) e, para melhor visualização do consenso foi utilizado o programa WebLogo 2.8.2 (CROOKS et al., 2004). O estudo composicional das sequências, pelo programa COMPSEQ do pacote EMBOSS, foi realizado em 3 seções distintas da 5' UTR de TS, previamente definidas pela localização dos fragmentos DTU-exclusivos. As diferenças observadas quanto à composição de dinucleotídeos e os gráficos foram processados pelo pacote Prism v.6 do programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA).

3.11 Sequenciamento de Nova Geração - ION Torrent

Em paralelo ao sequenciamento capilar por SANGER, foi realizado Sequenciamento de Nova Geração (NGS), em larga escala, através da plataforma ION TORRENT do Instituto Carlos Chagas (ICC) da Fiocruz/PR. Esta ferramenta foi utilizada acoplada ao PCR convencional como proposta de genotipar as amostras de *T. cruzi* através dos dados gerados por NGS.

3.11.1 Preparação da biblioteca e do cartão de leitura

Os produtos de PCR para o alvo 5' UTR de TS (iniciadores P1/P2), obtidos a partir de DNA genômico das cepas/clones de *T. cruzi* e *T. cruzi marinkellei* listados na Tabela 1, foram enviados para a plataforma de Sequenciamento de NGS do ICC. As amostras foram preparadas em duplicatas independentes e quatro corridas foram realizadas, em dias diferentes, em quatro cartões de leituras independentes.

Anterior ao sequenciamento, os produtos foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com *Nancy-520 DNA Gel Stain* e purificados com o *kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band*. Em seguida, o material foi submetido a uma PCR com adaptadores específicos para a sua ligação com a *bead* e posterior geração da biblioteca de amplicons. A biblioteca resultante foi adicionada ao cartão e, por capilaridade, o material é distribuído em toda região de leitura.

3.11.2 Estudo de K-mer e Agrupamento das cepas/clones de *T. cruzi*

As sequências obtidas por NGS, contendo o fragmento da 5' UTR acoplado a parte da região codificante da família gênica de trans-sialidases (Figura 5), foram filtradas, através do alinhamento pela ferramenta BLAST com as sequências de referência de trans-sialidases identificadas no genoma de *T. cruzi* CL Brener dos bancos de dados TriTrydb e NCBI. Foram selecionadas para análise, as sequências que apresentaram pareamento na região posicionada entre o final do iniciador senso (P1) e o começo do reverso (P2) de cada sequência obtida, ou seja, apenas foram analisadas as sequências informativas (mapeadas).

As sequências selecionadas para cada cepa/clone de *T. cruzi* foram comparadas entre elas através da ferramenta BLAST. Posteriormente, pelo método MCL (*Markov Cluster Algorithm*) (micans.org), foram avaliadas todas as inter-relações entre as sequências, assim como foram identificados os grupos para aquelas que apresentaram semelhanças entre si (através do BLAST), gerando a lista de *clusters*.

As sequências informativas (mapeadas) foram submetidas à análise de *K-mers* através do programa *Feature Frequency Profile Phylogeny* (FFP) (<http://sourceforge.net/projects/ffp-phylogeny/files/>). Antes da análise, os *K-mers* obtidos foram corrigidos pelo programa SPADES (<http://bioinf.spbau.ru/spades>). Essa correção se baseia na frequência de ocorrência dos *K-mers*. Posteriormente, o conjunto total de fragmentos em cada cepa/clone foi calculado pelo programa FFP. Foram analisados valores de *K-mers* de 5-mer, 10-mer e 20-mer (nucleotídeos).

Os dados foram normalizados, e a somatória de *K-mers* em uma amostra foi idêntica para todas as demais, ou seja, os números foram diretamente comparáveis. Isto foi realizado dividindo o menor número de *K-mers* (A) obtido em uma amostra pelos valores de cada uma das outras amostras (B), uma a uma, gerando o fator de normalização ($R=A/B$). Este fator (R) foi multiplicado a cada contagem de *K-mers* por amostra (cepa/clone). Todo fator de normalização será menor do que 1 (com exceção da amostra com menor número de *K-mers*, que será exatamente 1).

Posteriormente, foram definidos os critérios de seleção de *K-mers* através da definição do delta de separação entre cada *K-mer*. O valor de delta foi calculado através da divisão do maior número de *K-mers* encontrado em uma amostra pelo número de *K-mers* com contagem menor. Para a construção das árvores foram analisados os deltas $\geq 2, 3, 5, 10, 20, 50$ e 100.

As árvores foram construídas tendo como base os deltas de *K-mers*, utilizando os fragmentos com 20 nt, através do programa FFP (<http://sourceforge.net/projects/ffp-phylogeny/files/>), sendo selecionada a árvore com maior *bootstrap*. A distância utilizada foi a euclideana normalizada, que foi calculada a partir da fórmula: $(DistEN=\sqrt{\sum((X_i-Y_i)^2)})/SD_i$, para cada um dos *K-mers*, obtendo assim a somatória de todos os *K-mers*. A normalização é feita por divisão pelo desvio padrão (SD_i).

3.12 Padronização dos ensaios HRM para genotipagem de *T. cruzi*

Para estes ensaios, foi empregado o sistema de revelação MeltDoctor™ HRM Master Mix (Applied Biosystems®). Este é um sistema de revelação fluorescente, que tem a propriedade de se intercalar entre as duplas fitas de DNA que estão

sendo amplificadas de forma muito mais estável que outros sistemas intercalantes. Após a amplificação dos produtos a partir dos iniciadores utilizados, estes são submetidos a uma curva de desnaturação térmica. Com base nas características desta curva dos produtos amplificados, esta metodologia permite a genotipagem, através das diferenças espécie-específicas, das sequências do DNA das cepas estudadas. Os ensaios foram realizados no equipamento ViiA7 Applied Biosystems, na Plataforma de PCR em Tempo Real RPT09A, FIOCRUZ, IOC.

3.12.1 Desenho de iniciadores para os ensaios de genotipagem por HRM

Após a clonagem e o sequenciamento das 5' UTR de TS, foram identificadas as regiões contendo sítios polimórficos e os blocos com sequencias conservadas entre as cepas/clones testados. A partir dos resultados da pesquisa de fragmentos exclusivos para cada cepa/clone, e conhecendo a localização destes nas sequências consenso geradas para cada DTU, foram desenhados iniciadores específicos flanqueando as regiões mais polimórficas para serem testados nos ensaios de PCR *High Resolution Melting* (HRM), pelo equipamento ViiA7. O desenho de iniciadores teve como base os blocos conservados que intercalam as regiões polimórficas nas 5' UTRs de TS.

Dois iniciadores (P4 e P5) foram desenhados e avaliados inicialmente através de ensaios de PCR convencional com amostras de cultura de *T. cruzi* e amostras de sangue humano soronegativo contaminado artificialmente com este parasito na concentração de 10^3 parasitos/ mL. Estes dois iniciadores, juntamente com os iniciadores P1, P2 e P3, foram utilizados em 4 combinação na PCR HRM (Tabela 3). Para auxílio no desenho dos oligonucleotídeos foi utilizado o *software Primer-Blast* do NCB.

Tabela 3 – Associação de iniciadores de acordo com a seção da 5' UTR de TS analisada pelo HRM

Combinação
P1/P2 = fragmento da região 5' UTR de TS
P1/P4 = seção 1 da região 5' UTR de TS
P5/P3 = seção 2 da região 5' UTR de TS
P5/P2 = seção 2 e 3 da região 5' UTR de TS

3.12.2 Amostras utilizadas na padronização da PCR HRM

O painel de amostras empregado para a padronização da metodologia de HRM constituiu-se tanto de DNA genômico extraído de parasitos de cultura, quanto de produtos amplificados pela PCR de colônias utilizando os iniciadores P1/P2 (fragmentos de 200 pb da 5' UTR de TS).

- Produtos obtidos pela PCR de colônias

Para cada cepa/clone de *T. cruzi* analisado, foram selecionados entre 1 a 4 produtos de trans-sialidase clonados (4 clones para TcI, TcIII, TcIV e TcV, 3 para TcII, e 1 para TcVI), os quais continham em seu inserto as sequências identificadas com o estudo dos fragmentos de 20 nt mais frequentes, contendo sítios polimórficos exclusivos para cada DTU (item **3.10.6**). Após a medida das concentrações de cada produto amplificado a partir dos clones recombinantes, estes produtos foram diluídos para as concentrações de 1 pg/ μ L, e usados em duplicatas nos ensaios de HRM

- DNA genômico de epimastigotas de cultura

Foram utilizadas amostras de DNA previamente diluídas para as concentrações de 1 pg/ μ L, das seguintes cepas/clones de *T. cruzi*: Colombiana, D8 e DM28c (TcI), Y e PR1281 (TcII), 3663 (TcIII), 4167 (TcIV), LL014 e SO3 (TcV), CL Brener (TcVI).

- Amostras de soro e sangue contaminadas artificialmente

Amostra de 5 mL de sangue de indivíduo soronegativo para *T. cruzi* foi contaminada artificialmente com epimastigotas de *T. cruzi* das cepas: DM28c (TcI), Y (TcII), 4167 (TcIV), Bug (TcV) e CL-Brener (TcVI) para as concentrações finais de 10^3 parasitos /mL. Os 5 mL de sangue contaminados artificialmente com parasitos foram divididos em partes iguais para posterior obtenção de DNA de sangue e de soro. Para a obtenção de soro, o tubo contendo 2,5 mL de sangue foi mantido por pelo menos 30 minutos a temperatura ambiente (geração de coágulo + fase sérica). Para sangue e soro, a extração de DNA foi realizada como descrito no item 3.2, porém com volume de eluição de 100 μ L. O DNA eluído foi armazenado a -20°C para os ensaios de PCR HRM.

3.12.3 Condições de reagentes e termociclagem da PCR HRM

O DNA extraído de cultura de parasitos e produtos de reação de PCR convencional foram diluídos para a concentração de 1 pg/mL, a fim de adequar o valor do ciclo inicial de amplificação, Ct (ciclo threshold) para 20. As amostras de DNA foram dosadas pelo equipamento Picodrop e diluídas em água pura.

As reações ocorreram em um volume final de 10 μ L nas seguintes

condições: MeltDoctor™ HRM Master Mix (Applied Biosystems®) 1x, 600nM de cada iniciador que flanqueia a região para cada fragmento único da sequência (item 3.8) e aproximadamente 2 µL de DNA. Os ensaios foram realizados no equipamento ViiA7 Applied Biosystems da Plataforma de PCR em Tempo Real RPT09A, FIOCRUZ, IOC.

Foram utilizados dois protocolos para a PCR, um padrão e outro chamado de COLD PCR. No protocolo padrão, as condições de termociclagem para 40 ciclos, foram: desnaturação a 95 °C por 15 seg, anelamento a 58 °C por 1 min. Este programa foi precedido de um ciclo a 94 °C 10 min para ativação da enzima. Na temperatura de 58 °C, foram coletadas as fluorescências para construção do valor de Ct de amplificação. Após a PCR, seguiu-se para o ciclo do HRM, que teve início a uma temperatura de 95°C por 10 minutos, 60 °C por 1 minuto, a rampa de aquecimento (*melting*) de 60 °C a 95 °C e, finalmente, 60°C por 15s. Para construção das temperaturas de *Melting*, os dados foram captados na rampa a 0,025°C /segundo.

Para o protocolo de COLD PCR, segundo Mancini e cols., 2010. Este protocolo tem a capacidade de aumentar a especificidade de detectar os mutantes sem interferência dos heteroduplex formados durante a reação. A termociclagem foi realizada com um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos (ativação da enzima) seguido de dois ciclos sucessivos, contendo 3 temperaturas cada. O primeiro ciclo constituiu-se de 20 repetições a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Em seguida ocorreu o segundo ciclo com 35 repetições: 82,5 °C por 3 segundos, seguindo com a temperatura de 58 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos. Por fim, um último ciclo foi uma etapa de extensão a 72 °C por 20 minutos. O ciclo de HRM seguiu o perfil de desnaturação: 95 °C por 5 minutos, 40 °C por um minuto e uma variação de *melting* de 70 °C a 95 °C usando a rampa de temperatura a 0,025 °C/ segundo, e finalizando com 60 °C por 15s.

3.12.4 Análise dos resultados dos ensaios de HRM

As análises dos resultados dos ensaios de HRM foram realizadas através da normalização dos dados obtidos pela relação entre a fluorescência emitida e temperatura de dissociação (*melting*) dos produtos, além do gráfico das diferenças,

o qual demonstra visualmente as variações entre as sequências das amostras. As diferenças são calculadas pela subtração da fluorescência normalizada de um determinado genótipo, definido como padrão, pelos dados de fluorescência das demais amostras. O gráfico é gerado a partir da posição de cada amostra em relação ao *baseline* (genótipo ou amostra padrão) *versus* a temperatura. As amostras amplificadas são automaticamente agrupadas em variantes de acordo com a similaridade de sequências entre elas, estabelecida pelo programa ViiA 7 RUO .

3.13 Validação dos Ensaio com Amostras Clínicas de Pacientes acometidos pela doença de Chagas

Amostras de lisado de sangue periférico (10 mL de sangue + 10 mL de solução de guanidina-HCl 6M e EDTA 0,2mM pH 8.0; GEB = Guanidine EDTA Blood), de 70 pacientes acometidos pela doença de Chagas do Instituto Nacional de Infectologia (INI) Evandro Chagas/Fiocruz, foram usadas para validar os resultados do presente trabalho. Em paralelo, 20 amostras de sangue de indivíduos soronegativos para infecção pelo *T. cruzi* foram utilizadas como controles negativo. O uso das amostras de pacientes foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisas do IPEC/ FIOCRUZ – RJ (ANEXO C).

3.13.1 Extração de DNA das amostras clínicas

Anterior a extração de DNA, as amostras GEB foram fervidas por 10 min a 100 °C e mantidas a temperatura ambiente por 24 h. O DNA foi extraído a partir de 300 µL de GEB, seguindo o protocolo de extração de sangue do *kit QIAamp DNA Mini kit* (Qiagen, Valencia, CA), com pequenas modificações em relação ao volume de eluição, onde o DNA foi eluído em 100 µL ao invés de 200 µL. O material genômico foi armazenado a -20 °C imediatamente ao término da extração.

3.13.2 Quantificação de DNA de *T. cruzi* nas amostras de pacientes crônicos

A confirmação diagnóstica para infecção pelo *T. cruzi* foi realizada por sorologia (IFI e ELISA realizados no INI/Fiocruz) e PCR convencional para o kDNA (SCHIJMAN et al., 2011), e todos os 70 pacientes analisados no presente trabalho eram acometidos pela doença de Chagas crônica. A partir de um protocolo consenso estabelecido por Moreira e cols (2013) e descrito no item **3.3**, foi estimada a carga parasitária nestes 70 pacientes. Para isso, foi construída uma curva padrão a partir de sangue humano soronegativo para *T. cruzi*, contaminado artificialmente com parasitos da cepa CL Brener diluídos serialmente na faixa entre 10^4 a 0,5 parasitos por mililitro de sangue. A eficiência e a inclinação da curva seguiram os parâmetros de Moreira e cols (2013).

3.13.3 Sensibilidade e Especificidade da PCR convencional para a região 5' UTR de TS a partir de amostras clínicas

A sensibilidade e a especificidade clínicas do ensaio de PCR convencional, com os iniciadores P1/P3, foram estimadas de acordo com Ferreira e Ávila (2001), utilizando uma tabela de dupla entrada relacionando o diagnóstico da doença e o resultado do teste. A sensibilidade do teste foi calculada pela percentagem de resultados positivos entre os indivíduos sabidamente infectados pelo *T. cruzi* ($n = 70$) e a especificidade, pela percentagem de resultados negativos, entre os indivíduos não infectados ($n = 20$). Esses parâmetros foram analisados de acordo com nível de significância de 95 %.

3.13.4 Sequenciamento da região 5' UTR de TS a partir de amostras de sangue de pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica

Oito amostras de sangue de pacientes foram selecionadas aleatoriamente para serem amplificadas com os iniciadores P1/P3 e posteriormente sequenciadas. As análises para a busca de identidade com sequências de trans-sialidases de *T. cruzi* disponíveis no NCBI, foram processadas com auxílio da ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.13.5 Ensaio de PCR HRM a partir de amostras de pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica

As mesmas amostras de pacientes que tiveram as 5' UTRs sequenciadas (item **3.13.4**), foram submetidas a COLD-PCR HRM utilizando os conjuntos de iniciadores P1/P4 e P5/P3. As amostras foram comparadas com os perfis gerados a partir de DNA genômico de epimastigotas das diferentes cepas/clones de *T. cruzi*, testados juntos em um mesmo ensaio de HRM.

4 RESULTADOS

Parte I

Avaliação do uso de soro para a detecção e quantificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* para o diagnóstico molecular da infecção

4.1 Avaliação da migração do DNA para o soro

Com o intuito de avaliarmos o uso de soro como alternativa para o diagnóstico molecular do parasito, o primeiro ensaio buscou verificar a quantidade de DNA presente no soro, após coagulação do sangue, através da comparação com amostras de sangue reconstituídas experimentalmente e amostras de cultura de *T. cruzi* CL-Brener. Os DNAs recuperados de cada tipo de amostra (soro, sangue e cultivo) foram submetidos à ensaios de qPCR multiplex para o alvo DNA satélite de *T. cruzi*, contendo o gene RNase P humano, como controle interno de amplificação, e o DNA sintético Exo-IPC, como controle positivo exógeno.

Após a coagulação do sangue e obtenção do soro, pôde ser observada a detecção dos alvos para *T. cruzi*, Exo-IPC e RNase P nas amostras de DNA extraídas de soro. As médias de Ct foram 32,48; 29,38 e 30,15, respectivamente, demonstrando assim a migração de DNAs do parasito, exógeno e humano para o soro durante a coagulação do sangue (Figura 6). No entanto, estes valores de Ct foram maiores nas amostras de soro, em relação ao sangue ou amostras de *T. cruzi* de cultura ($p < 0,05$), que apresentaram médias de Ct para amostras de DNA extraídas de sangue: 25,22 para *T. cruzi*, 27,90 para Exo-IPC e 26,31 para RNase P, e para as amostras de DNA extraídas do parasito em cultura: 25,79 para *T. cruzi* e 27,02 para Exo-IPC (Figura 6). Mesmo com valores de Ct aumentados, estes resultados indicaram a possibilidade de detectar o parasito em amostras de soro por qPCR.

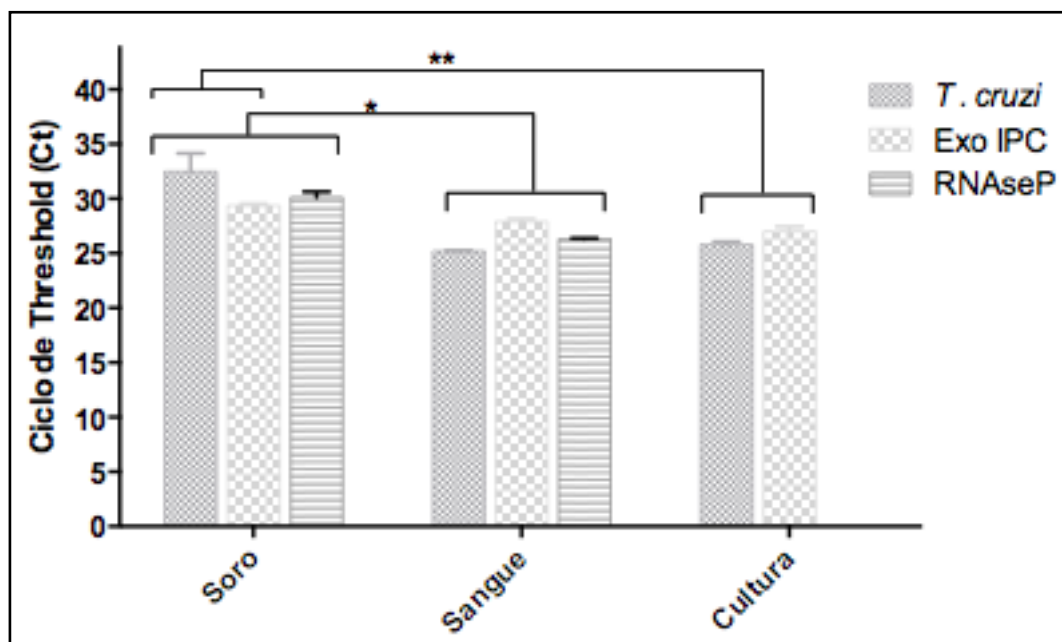


Figura 6. Detecção do DNA em soro, sangue e *T. cruzi* CL Brener de cultura por qPCR. Sangue total foi contaminado artificialmente com Exo-IPC (1X) ou células de *T. cruzi* (1 par. eq./mL) antes do preparo do soro. Os resultados estão expressos como mediana dos valores de Ct (ciclo threshold) e representam a média a partir de cinco réplicas de cada amostra \pm desvio padrão [* , ** $p < 0.05$].

4.2 Faixa de detecção de DNA de *T. cruzi* entre amostras de sangue e soro por qPCR

Com o objetivo de comparar a linearidade de detecção da amplificação de DNA de *T. cruzi* entre amostras de sangue e soro, foram construídas três curvas padrão independentes na faixa de 10^5 a 0,5 equivalentes de parasito/mL (eq. par./mL) contendo DNAs extraídos de sangue contaminado artificialmente; de soro obtido a partir de sangue contaminado artificialmente; e DNA de epimastigotas de *T. cruzi* CL Brener (Figura 7). Através de análise de regressão linear, foi observada uma linearidade elevada para as três curvas ($R^2 = 0,99$) e slopes adequados (-3.51 ;

-3.68 e -3.46 para soro, sangue e amostras de cultivo de *T. cruzi*, respectivamente) para a quantificação do parasito.

A curva padrão para as amostras de soro demonstrou valores de Ct mais elevados do que aqueles obtidos com as amostras de sangue e epimastigotas de *T. cruzi*, indicando assim uma menor concentração de DNA do parasito em soro. Entretanto, a linearidade e a inclinação (slope) da curva com as amostras de soro foram equivalentes ou maiores, respectivamente, em relação ao observado para a curva padrão com sangue, indicando desta forma, o potencial uso de soro em ensaios de quantificação de DNA de *T. cruzi* por qPCR.

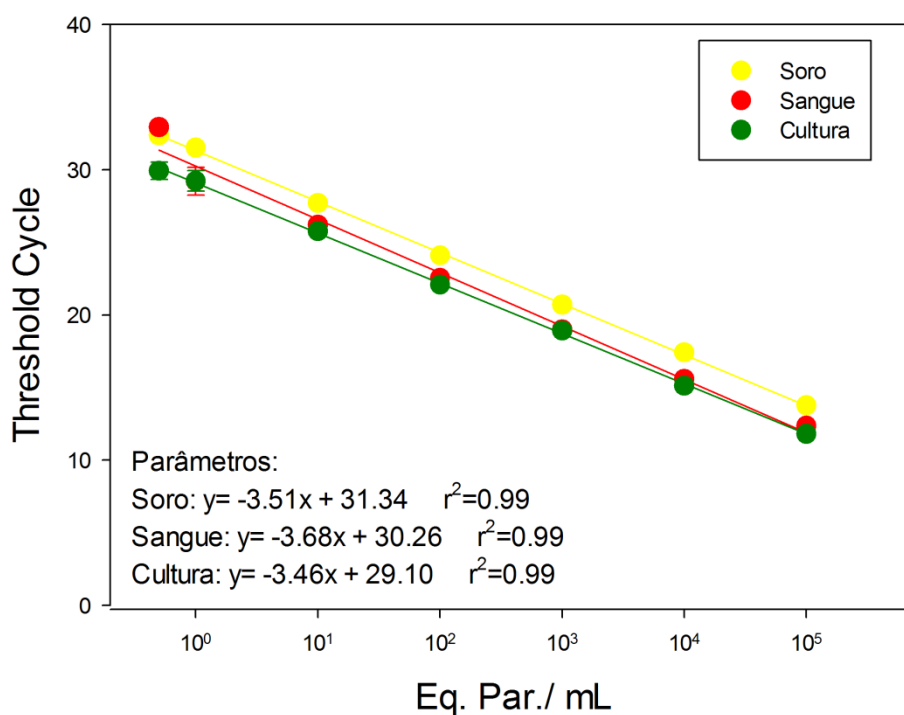


Figura 7. Faixa de detecção de DNA de *T. cruzi* e quantificação por qPCR em Tempo Real. O sistema TaqMan de qPCR foi realizado a partir de diluições seriadas de DNA extraído de amostras de soro, sangue ou parasitos de cultura, na faixa de 10⁵ a 0,5 eq. par./mL. Cada ponto das curvas foi testado em cinco réplicas. As equações obtidas por regressão linear estão indicadas.

4.3 Ensaio de qPCR TaqMan duplex com amostras pareadas de sangue e soro de pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica

A sensibilidade e especificidade da qPCR duplex em Tempo Real foram comparadas entre amostras pareadas de soro e sangue de 40 pacientes portadores da doença de Chagas crônica (grupo doença de Chagas) e em 20 indivíduos soronegativos (grupo controle). O grupo doença de Chagas foi formado por 22 mulheres (idade média 57,77 anos) e 18 homens (idade média 51,61 anos). Para estimar os valores de sensibilidade e especificidade, a sorologia foi considerada como padrão ouro. Para cada indivíduo, foram realizados dois testes sorológicos empregando preparações de antígenos distintas (ELISA convencional e recombinante), e os resultados foram concordantes entre eles. A qPCR demonstrou sensibilidades de 97,5 % e 95 % para a detecção de DNA de *T. cruzi* em amostras de sangue e soro, respectivamente, e 100 % de especificidade para ambas as amostras (Tabela 4).

Tabela 4. Sensibilidade e especificidade da qPCR em Tempo Real em amostras de sangue e soro

	Amostras de Sangue		Amostras de Soro	
	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
qPCR +	39 (97,5 %)	0 (0%)	38 (95 %)	0(0%)
qPCR -	1 (2,5 %)	20 (100 %)	2 (5 %)	20 (100 %)
Total	40	20	40	20

Para calcular os valores de Sensibilidade e Especificidade, a sorologia foi considerada como padrão ouro.

Para a estimativa da carga parasitária através do uso da PCR multiplex em Tempo Real para quantificação absoluta de DNA de *T. cruzi*, foram utilizadas as curvas padrão correspondentes para as amostras de sangue e soro. Nas amostras de sangue dos 40 pacientes, a carga parasitária variou de 0,067 a 2,553 com uma

mediana de 1,23 eq. par. /mL. Em comparação, nas amostras de soro, a quantificação variou entre 0,085 a 2,03 com mediana de 1,12 eq. par. /mL (Figura 8). Não foi observada diferença significativa entre os valores de mediana para estas amostras. Como esperado, as cargas parasitárias estimadas para estes pacientes crônicos foram baixas e próximas ao limite inferior da faixa de detecção da qPCR, o que pode interferir na precisão da quantificação de *T. cruzi*.

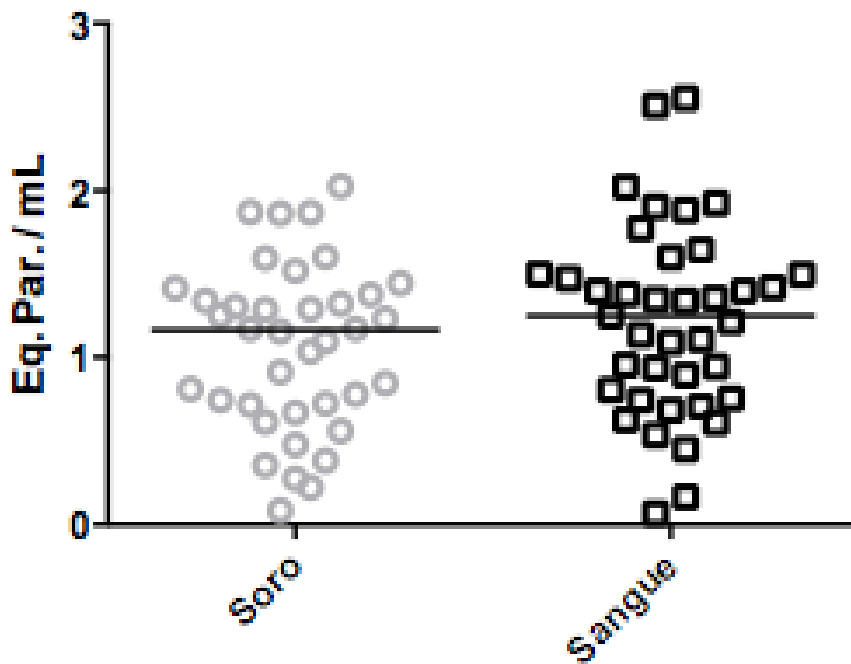


Figura 8. Comparação entre as cargas parasitárias em amostras de soro e sangue de pacientes com doença de Chagas crônica. Círculos cinzas e quadrados pretos representam a quantificação de *T. cruzi* em soro e sangue, respectivamente, por ensaios de qPCR duplex. Os valores de mediana estão indicados pelas linhas horizontais.

Os pacientes foram divididos em quatro grupos, de acordo com as manifestações clínicas da doença de Chagas: Forma Cardíaca (FC = 23), Forma Digestiva (FD = 4), Forma Indeterminada (FI = 6) e Forma Mista (cardíaca e digestiva) (FM = 7). Quando os pacientes foram analisados segundo as manifestações clínicas, nenhuma diferença significativa foi observada entre as medianas de carga parasitária das distintas formas da doença, tanto em sangue (FM = 1,11; FC = 1,39; FD = 0,68; FI = 1,18 eq. par./mL) quanto em soro (FM = 0,85; FC = 1,17; FD = 0,85; FI = 0,86 eq. par./mL) (Figura 9).

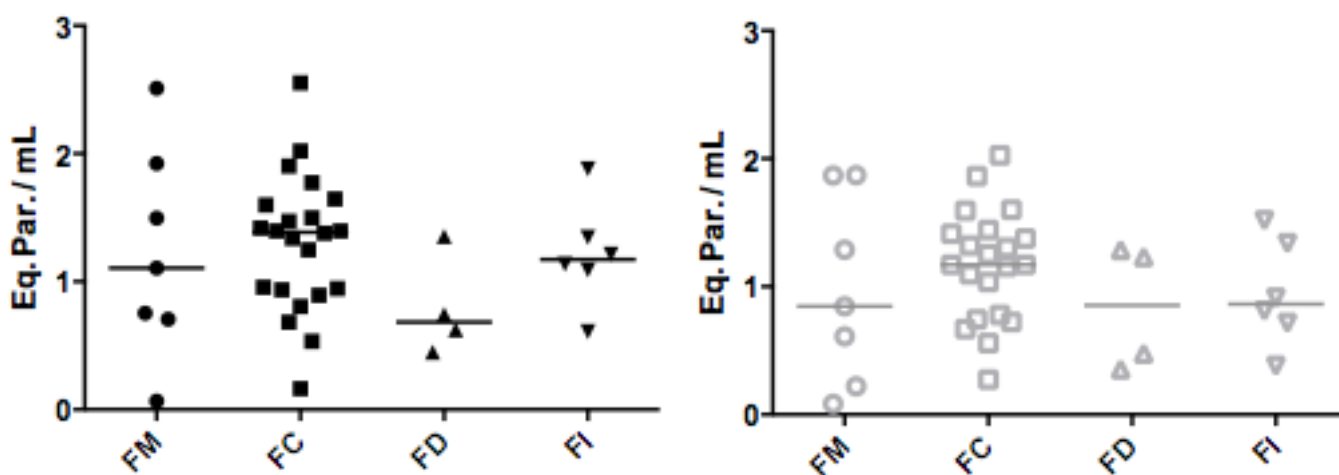


Figura 9. Distribuição das cargas parasitárias em sangue e soro entre pacientes crônicos com diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas. (A) Símbolos pretos representam as cargas parasitárias estimadas nas amostras de sangue por qPCR multiplex em Tempo Real. (B) Símbolos cinzas representam as cargas parasitárias respectivas nas amostras de soro. Os valores de mediana estão indicados pela linha horizontal. FM = Forma Mista (n = 7); FC = Forma Cardíaca (n = 23); FD = Forma Digestiva (n = 4); FI = Forma Indeterminada (n = 6).

Apesar da ausência de diferenças significativas entre as formas clínicas da doença, alguns pacientes que apresentaram as formas mista (cardiodigestiva) e cardíaca, demonstraram um leve aumento na parasitemia em ambas as amostras, sangue e soro. No entanto, como observado na Figura 8, todas as cargas parasitárias foram muito baixas, podendo comprometer a precisão da quantificação.

Parte II

Potencial de aplicação das 5' UTRs da família gênica de trans-sialidases para diferenciar entre os grupos populacionais de *Trypanosoma cruzi*

4.4 Desenho dos oligonucleotídeos e amplificação da região 5' UTR de Trans-sialidases

Na Figura 5, estão representadas as posições dos cinco iniciadores desenhados para o segmento selecionado contendo a região 5' UTR de TS de *T. cruzi*. Inicialmente, a partir do alinhamento de 400 sequências de genes de trans-sialidases disponibilizadas nos bancos de dados do NCBI e TriTryDB, foram definidos os iniciadores mais externos para a região de interesse, os quais denominamos P1 e P2, estando P1 localizado na extremidade 5' da UTR e P2 situado aproximadamente 94 nucleotídeos após o ATG da anotação genômica. As sequências dos iniciadores estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Iniciadores para a região 5'UTR de Trans-sialidase

Código	Iniciadores	Sequências	Aplicação
P1	5'UTR TS senso	CTA ATC GCT ACT GTG AAA TT	PCR convencional em amostras de cultura e sangue / Sequenciamento
P2	5'UTR TS reverso	GCC GGG ACA TGT TGG GCC TC	PCR convencional em amostras de cultura / Sequenciamento
P3	5'UTR TS reverso	CGC TGG ATC CGG TCA CG	PCR convencional em amostras de sangue / Sequenciamento

Através de uma PCR convencional, o par de iniciadores P1/P2 foi avaliado quanto a capacidade de amplificar o segmento genômico contendo a região 5' UTR de TS das cepas/clones de *T. cruzi*: Colombiana e DM28c (TcI), Y (TcII), 3663 (TcIII), 4167 (TcIV), LL014 (TcV), CL Brener (TcVI). Neste primeiro experimento, também foram incluídos DNAs de cultura de *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma rangeli*. Após a corrida em gel de agarose a 1,5 %, foram visualizados os produtos

de 200 pb, apenas nas amostras relacionadas ao *T. cruzi* (Figura 10). Os produtos amplificados foram clonados e sequenciados, e todas as sequências geradas (de cerca de 200 nucleotídeos) apresentaram 90% de identidade com os segmentos equivalentes aos genes de trans-sialidases depositados no banco de dados do NCBI.

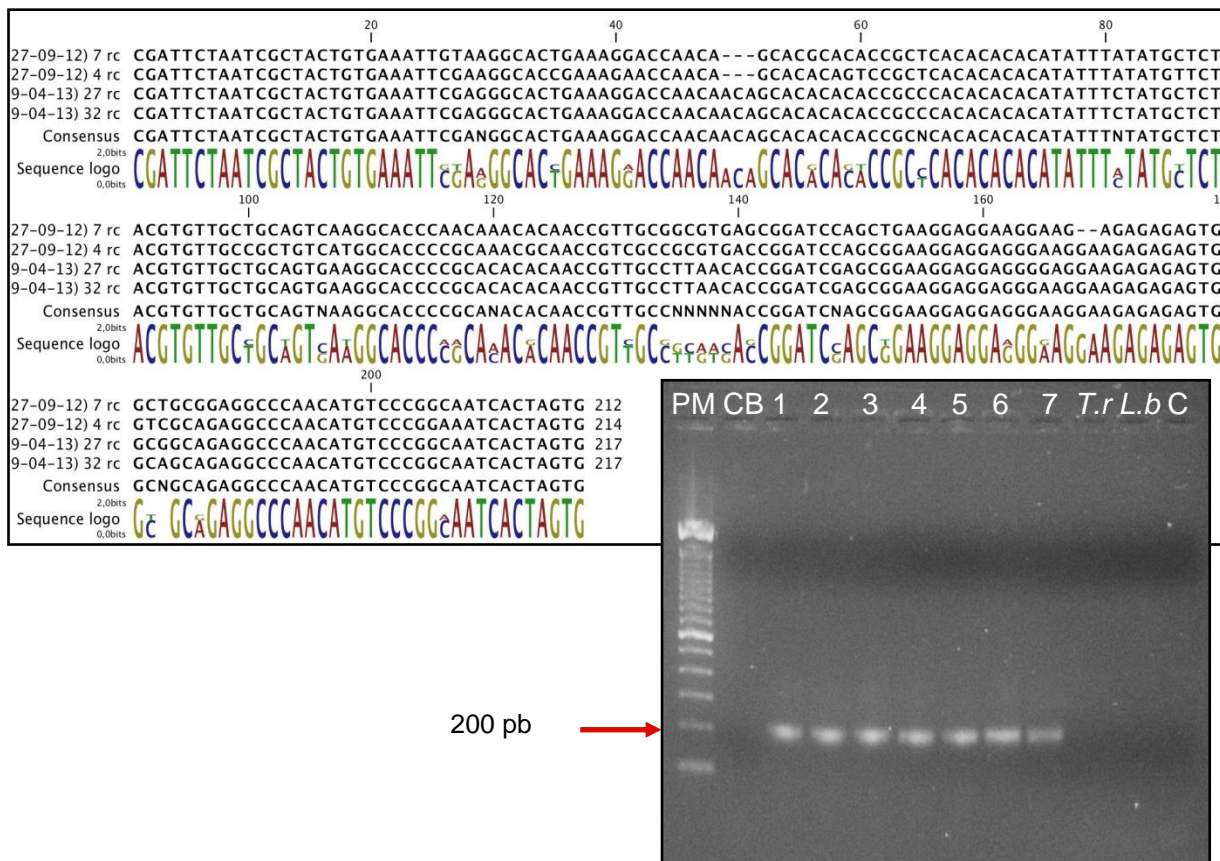


Figura 10. Alinhamento dos fragmentos amplificados do alvo 5' UTR do gene de Trans-Sialidase de *T. cruzi* pela PCR convencional. PM- Peso Molecular, C - Controle Branco (todos os reagentes sem DNA), 1- Cepa Colombiana, 2- DM28c, 3 - Cepa Y, 4- 3663, 5- 4167, 6- LL014, 7- CL, T.r- *Trypanosoma rangeli*, L.b - *Leishmania braziliensis*.

4.5 Padronização da PCR convencional para a região 5' UTR de Trans-Sialidases

Amostras de lisado de sangue (GEB) contaminadas artificialmente com diferentes cepas/clones de *T. cruzi* e contendo concentrações distintas de parasitos por mililitro de sangue, compuseram as onze curvas padrão empregadas na avaliação da sensibilidade dos ensaios de PCR convencional direcionados para a região 5' UTR de trans-sialidases de *T. cruzi* com os iniciadores P1/P2 (5' UTR TS). As seguintes cepas/clones foram usadas para a obtenção das onze curvas padrão: DM28c, D8 (TcI); Y, PR1281 (TcII); 3663, 222 (TcIII); 4167, AM14 (TcIV); Bug, LL014 (TcV) e CL Brener (TcVI). Como pode ser observado na Tabela 4, para o alvo 5' UTR TS, a sensibilidade alcançada variou de acordo com a cepa/clone de *T. cruzi*, na faixa de 0,5 a 50 parasitos /mL, sendo a maior sensibilidade observada para os representantes de TcI e TcVI, sendo igual a 0,5 parasitos/mL. Em relação à TcII e TcIV, a sensibilidade foi de 5 parasitos/mL, e de 50 parasitos/mL para TcIII e TcV.

Curiosamente, nestes ensaios de PCR realizados em amostras de sangue reconstituídas, pôde ser observado um fragmento com tamanho em torno de 700 pb, além do produto esperado de 200 pb, correspondente ao fragmento contendo a região 5' UTR de *T. cruzi*, com os iniciadores P1/P2.

A fim de otimizar a temperatura de anelamento dos iniciadores e buscando minimizar o aparecimento do produto de 700 pb, foram realizados ensaios de PCR gradiente com as mesmas amostras descritas acima. As temperaturas utilizadas foram (55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C e 60 °C), sendo 56 °C a temperatura de anelamento selecionada, uma vez que nesta temperatura, para todas as cepas/clones de *T. cruzi* testadas, as amostras contendo as menores concentrações de parasito apresentaram uma melhor visualização (resolução) do fragmento de 200 pb, nas repetições dos ensaios em dias diferentes. Assim, a temperatura de 56 °C foi a que forneceu a melhor reprodutibilidade nos ensaios com as amostras mais diluídas, para todas as cepas/clones de *T. cruzi*. A Figura 11A exemplifica este resultado com a cepa CL Brener. Temperaturas acima de 60 °C também foram avaliadas, assim como ajustes na concentração do íon Mg⁺, sem haver qualquer alteração quanto a presença do fragmento amplificado de 700 pb.

É interessante observar na Figura 11A que a intensidade deste fragmento aumenta proporcionalmente, à medida que a concentração de parasitos diminui no sangue. E nas diluições menores que 5×10^3 (linhas 3 a 6 – Fig. 11A), fragmentos maiores que 700 pb também são visualizados em gel de agarose a 1,5 %.

Para cada cepa/clone de *T. cruzi* analisado pela curva padrão, foram eluídos dos géis quatro fragmentos com cerca de 700 pb que foram submetidos ao sequenciamento para identificação. Através da ferramenta BLAST foi identificada identidade acima de 90 % destes fragmentos com sequencias do cromossomo 11 humano depositadas no banco de dados NCBI. Pelo alinhamento das sequencias geradas pelas quadruplicatas de fragmentos de todas as cepas/clones, foi observado que apenas o iniciador P2 hibridizava nas duas extremidades do fragmento (Figura 11B).

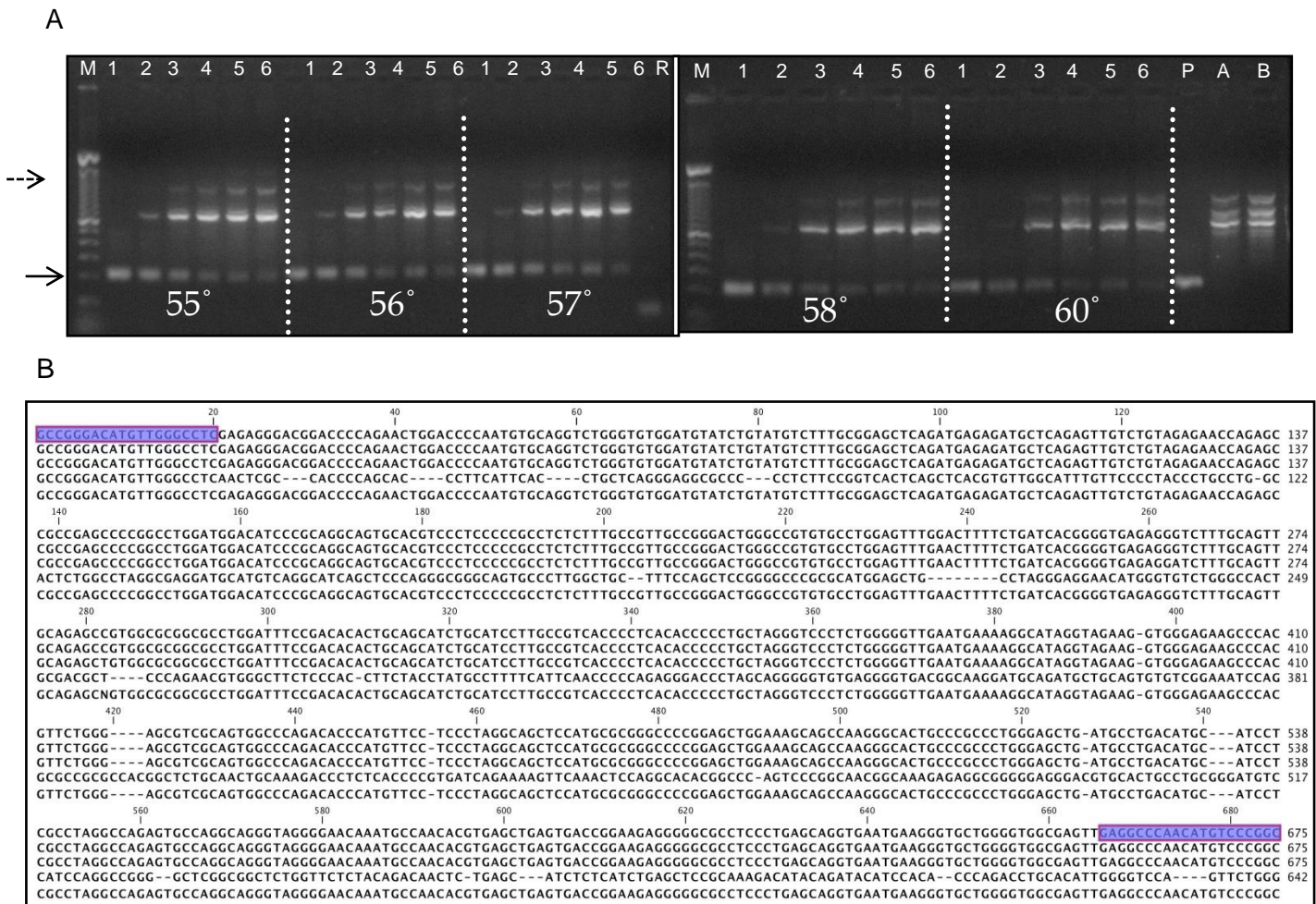


Figura 11. Exemplo da PCR gradiente empregando amostras de sangue reconstituídas com diferentes concentrações de epimastigotas CL Brener (TcVI) e os iniciadores externos P1/P2 e alinhamento das sequencias geradas para o fragmento de 700 pb. Gel de agarose 1,5 % corado com Nancy. M- Peso molecular de 100 pb; 1- 5×10^4 parasitos/mL; 2- 5×10^3 parasitos/mL; 3- 5×10^2 parasitos/mL; 4- 5×10^1 parasitos/mL; 5- 5 parasitos/mL; 6 - 0,5 parasito/mL, R- Controle negativo da reação - todos os reagentes sem DNA; P- Controle positivo -100 ng de DNA CL Brener; A e B - DNA extraído de sangue não contaminado. As setas representam o fragmento maior de 700 pb e o fragmento de 200 bp contendo a região 5' UTR de TS de *T. cruzi*. Os retângulos em ambas as extremidades indicam a posição do iniciador P2 em duas regiões distintas. Seta contínua – fragmento com 200 pb e seta descontínua – fragmento ~600 pb.

Com a finalidade de melhorar a especificidade de detecção do alvo 5' UTR de TS de *T. cruzi* em sangue, foi proposto o desenho de um terceiro iniciador (P3) localizado em posição mais interna em relação ao iniciador P2, para ser usado em conjunto com P1 (Figura 5; Tabela 3). A nova combinação de iniciadores (P1/P3) na PCR convencional com as amostras de sangue reconstituídas, forneceu um único produto de amplificação de cerca de 144 pb, o qual apresentou alta identidade (95 %) com as sequências de trans-sialidases depositadas no banco de dados NCBI.

O próximo passo foi avaliar comparativamente a sensibilidade analítica da PCR com os iniciadores P1/P2, P1/P3 e aqueles mais frequentemente usados no diagnóstico molecular da doença de Chagas, para a detecção do kDNA de *T. cruzi* (121/122) (BRITTO et al., 1993; WINCKER et al. 1994b). Para estes ensaios também foram utilizadas as onze curvas padrão representativas das seis DTUs de *T. cruzi* e os resultados estão apresentados na Tabela 6. Dentro da faixa de concentrações avaliada, o alvo kDNA usando os iniciadores 121/122, foi o que demonstrou maior sensibilidade de detecção em todas as onze curvas, amplificando até a concentração de 0,5 parasito /mL, independente da DTU. Por outro lado, assim como observado para os iniciadores externos P1/P2, a mesma faixa de variação de sensibilidade, entre 0,5 a 50 parasitos/ mL, foi encontrada pela amplificação com os iniciadores P1/P3, os quais geram um fragmento mais interno da 5' UTR. A variação na sensibilidade de detecção da região 5' UTR de trans-sialidases de *T. cruzi* está associada com a cepa/clone (DTU) analisada (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação da sensibilidade das PCRs para a região 5' UTR de Trans-sialidases e para o kDNA de *T. cruzi* empregando onze curvas padrão representando cada cepa/clonagem do parasito

Cepas / Clones		DTUs	Iniciadores	Parasitas / mL sangue					
				50000	5000	500	50	5	0,5
DM28c	D8	Tc I	121/122*	[Positive]					
			P1/P2**	[Positive]					
			P1/P3***	[Positive]					
Y	PR1281	Tc II	121/122	[Positive]					
			P1/P2	[Positive]					[Negative]
			P1/P3	[Positive]				[Negative]	
3663	222	Tc III	121/122	[Positive]					
			P1/P2	[Positive]				[Negative]	
			P1/P3	[Positive]			[Negative]		
4167	AM14	Tc IV	121/122	[Positive]					
			P1/P2	[Positive]					[Negative]
			P1/P3	[Positive]				[Negative]	
Bug	LL014	Tc V	121/122	[Positive]					
			P1/P2	[Positive]				[Negative]	
			P1/P3	[Positive]			[Negative]		
CL	-	Tc VI	121/122	[Positive]					
			P1/P2	[Positive]					
			P1/P3	[Positive]					

* 121/122 iniciadores para o alvo kDNA ** P1/P2 e ***P1/P3 iniciadores para o alvo 5' UTR de TS

Em paralelo, foi avaliada a especificidade analítica da PCR convencional para a região 5' UTR de TS, com os iniciadores P1/P2 ou P1/P3, utilizando amostras de DNA de outros kinetoplastídeos, *Toxoplasma gondii*, assim como testado o desempenho da reação para a detecção de DNA extraído de coração e fígado de camundongo infectado com a cepa Y de *T. cruzi*. Os resultados da PCR demonstraram que ambos os conjuntos de iniciadores apresentaram especificidades apenas para *T. cruzi* (6 DTUs), *T. cruzi* (*Tcbat*) e *T. cruzi* marinkellei, uma vez que produtos de 200 pb (P1/P2) ou 144 pb (P1/P3) correspondentes às amostras de DNA desses parasitos foram visualizados em gel de agarose (Figura 12). As amostras relacionadas à *Toxoplasma gondii*, *Phytomonas* sp., *Chritidia oncopelti*, *Chritidia fasciculata*, diferentes espécies de *Leishmania* spp e *T. rangeli* não amplificaram com ambos os conjuntos de iniciadores para o alvo 5' UTR de trans-sialidases (Figura 12).

Neste experimento foi possível detectar DNA de amostras de tecidos (coração, fígado) de animal infectado com a cepa Y de *T. cruzi*, com ambos os conjuntos de iniciadores para a 5' UTR TS. A Figura 12A mostra o fragmento amplificado de 200 pb gerado com os iniciadores P1/P2, em ambos os tecidos de camundongo.

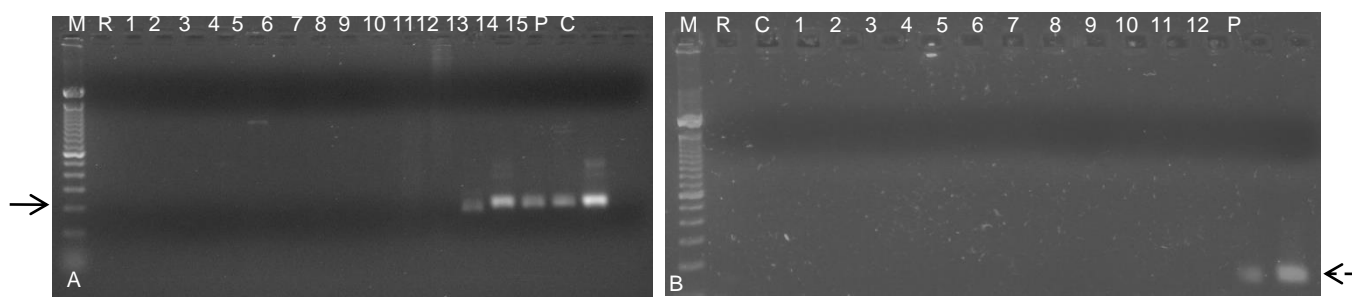


Figura 12: Teste de especificidade dos iniciadores para a região 5' UTR de trans-sialidasas a partir de amostras de DNA de diferentes parasitos. Gel de agarose a 1,5% corado por Nancy. Seta contínua representa o fragmento com 200 pb (P1/P2) e seta descontínua representa o fragmento com 144 pb (P1/P3). **A.** Especificidade analítica da PCR com os iniciadores P1/P2. M - Peso Molecular (100 pb); R - Controle negativo da reação (todos os reagentes sem DNA); 1-2 *Toxoplasma gondii*; 3- *Phytomonas* sp; 4- *Chritidia oncopelti*; 5- *Chritidia fasciculata*; 6- *L. braziliensis*; 7- *L. shawi*; 8- *L. lainsoni*; 9- *L. major*; 10-11 *T. rangeli*; 12- *T. cruzi* (*Tcbat*); 13- *T. cruzi marinkellei*; 14- Coração de camundongo infectado com cepa Y; 15- Fígado de camundongo infectado com cepa Y; P- Controle Positivo (100ng de DNA de CL Brener de cultura); C- Controle da capela (somente água). **B.** Especificidade analítica da PCR com os iniciadores P1/P3. M- Peso Molecular (100 pb); R- Controle negativo da reação (todos os reagentes sem DNA); C- Controle da capela (somente água); 1-2 *Toxoplasma gondii*; 3- *Phytomonas* sp; 4- *Chritidia oncopelti*; 5- *Chritidia fasciculata*; 6- *L. braziliensis*; 7- *L. shawi*; 8- *L. lainsoni*; 9- *L. major*; 10-11 *T. rangeli*; 12- *T. cruzi* (*Tcbat*); P- Controle positivo (100ng de DNA de CL Brener de cultura).

O conjunto de iniciadores P1/P3 (fragmento de 144 pb) foi empregado nos ensaios de PCR convencional com amostras clínicas de pacientes acometidos com a doença de Chagas, buscando eliminar o pareamento inespecífico do iniciador P2 com sequencias do cromossomo 11 humano (fragmento de 700 pb).

4.5.1 Sensibilidade e Especificidade clínica da PCR convencional para os alvos da região 5' UTR de *Trans-sialidases*

A fim de comparar a sensibilidade e especificidade clínica da PCR convencional com o iniciador P1/P3 (fragmento com 144 pb), foi utilizado um painel de amostras de sangue (GEB) de 70 pacientes com doença de Chagas crônica cardíaca e 20 indivíduos soronegativos para a doença de Chagas como controles. A PCR com os iniciadores para o kDNA foi considerada como padrão ouro para o cálculo da sensibilidade e especificidade. Para cada indivíduo, duas amostras foram utilizadas para confirmar a infecção pelo *T. cruzi*, sendo os resultados concordantes entre eles. A PCR para o gene de β -globina humana foi utilizada como controle interno da reação (controle de inibição e da qualidade do DNA extraído). A qPCR com os iniciadores para o DNA nuclear satélite de *T. cruzi* foi utilizada para quantificar carga parasitária em sangue de 70 pacientes, os quais apresentaram parasitemias entre 0,11 a 1173,39 equivalentes de parasitos / mL de sangue (Tabela 7).

Tabela 7 - Quantificação da carga parasitária de *T. cruzi* por qPCR em 10 pacientes do INE / FIOCRUZ-RJ

Nº	Sorologia	PCR Convencional (kDNA)	PCR em Tempo Real – qPCR (DNA satélite)	
			*Qt	Qt SD
1	Positiva	Positiva	1173,39	± 13,65
2	Positiva	Positiva	324,82	± 67,15
3	Positiva	Positiva	284,6	± 39,71
4	Positiva	Positiva	280,22	± 40,61

5	Positiva	Positiva	237,01	± 15,64
6	Positiva	Positiva	234,13	± 20,13
7	Positiva	Positiva	224,99	± 43,53
8	Positiva	Positiva	212,54	± 13,65
9	Positiva	Positiva	205,89	± 75,29
10	Positiva	Positiva	191,35	± 62,88
11	Positiva	Positiva	146,73	± 26,65
12	Positiva	Positiva	145,1	± 18,65
13	Positiva	Positiva	134,28	± 30,25
14	Positiva	Positiva	131,70	± 7,40
15	Positiva	Positiva	125,93	± 17,15
16	Positiva	Positiva	124,98	± 3,74
17	Positiva	Positiva	117,42	± 6,96
18	Positiva	Positiva	110,88	± 3,89
19	Positiva	Positiva	107,58	± 18,00
20	Positiva	Positiva	97,37	± 1,92
21	Positiva	Positiva	93,68	± 11,85
22	Positiva	Positiva	89,07	± 28,77
23	Positiva	Positiva	74,13	± 4,05
24	Positiva	Positiva	73,66	± 9,92
25	Positiva	Positiva	70,81	± 28,58
26	Positiva	Positiva	68,02	± 7,41
27	Positiva	Positiva	66,98	± 29,03
28	Positiva	Positiva	66,40	± 10,64
29	Positiva	Positiva	65,16	± 1,22
30	Positiva	Positiva	62,18	± 10,10
31	Positiva	Positiva	0,13	± 0,01
32	Positiva	Positiva	56,76	± 4,82
33	Positiva	Positiva	55,97	± 19,11
34	Positiva	Positiva	36,91	± 1,55
35	Positiva	Positiva	51,40	± 13,60
36	Positiva	Positiva	50,94	± 40,09
37	Positiva	Positiva	50,30	± 20,61
38	Positiva	Positiva	47,00	± 17,65
39	Positiva	Positiva	44,18	± 9,73
40	Positiva	Positiva	33,71	0,69
41	Positiva	Positiva	41,68	± 20,26
42	Positiva	Positiva	41,57	± 9,26
43	Positiva	Positiva	41,31	± 4,40
44	Positiva	Positiva	41,25	± 12,14
45	Positiva	Positiva	40,73	± 3,21
46	Positiva	Positiva	37,52	± 15,86
47	Positiva	Positiva	37,17	± 8,75
48	Positiva	Positiva	36,74	± 8,19

49	Positiva	Positiva	91,39	± 16,42
50	Positiva	Positiva	33,91	± 2,03
51	Positiva	Positiva	17,55	± 12,45
52	Positiva	Positiva	0,25	± 0,08
53	Positiva	Positiva	62,74	± 2,89
54	Positiva	Positiva	35,32	± 14,16
55	Positiva	Positiva	58,56	± 1,25
56	Positiva	Positiva	28,67	± 5,32
57	Positiva	Positiva	48,69	± 18,42
58	Positiva	Positiva	4,09	± 3,27
59	Positiva	Positiva	250,26	± 12,92
60	Positiva	Positiva	19,26	± 2,07
61	Positiva	Positiva	33,89	± 3,66
62	Positiva	Positiva	35,93	± 7,08
63	Positiva	Positiva	0,11	± 0,05
64	Positiva	Positiva	9,69	± 3,55
65	Positiva	Positiva	30,76	± 25,14
66	Positiva	Positiva	0,16	± 0,02
67	Positiva	Positiva	54,83	± 10,61
68	Positiva	Positiva	43,19	± 6,54
69	Positiva	Positiva	35,91	± 13,46
70	Positiva	Positiva	6,52	± 0,32

As amostras de sangue correspondem ao pré-tratamento.

Qt – quantificação; SD – desvio padrão; *equivalentes de parasitos/ mL

Sorologia – IFI e ELISA

Em vermelho as amostras com resultado falso-positivo na PCR 5' UTR

Comparando com os resultados da PCR kDNA, a PCR para a região 5' UTR de TS apresentou 58 resultados verdadeiros positivos e 12 falso-negativos (aproximadamente 83% de sensibilidade), e as amostras controle não amplificaram (100% de especificidade) (Tabela 8).

Tabela 8 – Sensibilidade e especificidade clínicas

	PCR kDNA +	PCR kDNA -
PCR 5' UTR +	58 (82,9 %)	0 (0%)
PCR 5' UTR -	12 (17,1 %)	20 (100 %)
Total	70	20

5' UTR – iniciadores P1/P3 (produto de 144 pb)
kDNA – iniciadores 121/122 (produto de 330 pb)

Os produtos amplificados de oito pacientes, com resultados positivos para P1/P3, foram submetidos ao sequenciamento capilar (SANGER). As seqüências destes pacientes apresentaram identidade de 89 % com as seqüências de TS depositadas no banco de dados do NCBI (Figura 13).

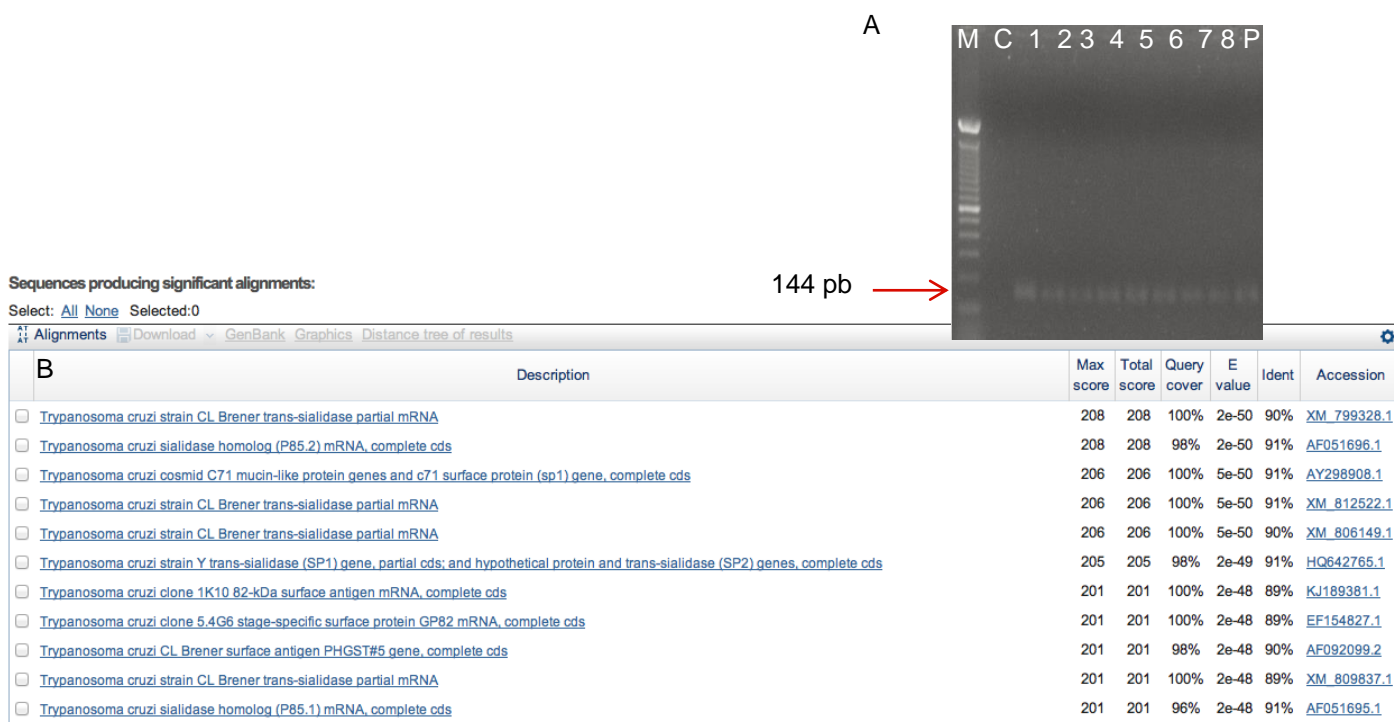


Figura 13: Identidade das sequências amplificadas com os iniciadores P1/P3 a partir de amostras de pacientes acometidos pela doença de Chagas com as sequências de genes de Trans-sialidases depositadas no banco de dados da NCBI GenBank. A - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com *Nancy* - 520, PM- Peso molecular, C - controle da reação, 1 a 8 pacientes acometidas pela doença de Chagas, P - controle positivo (100 ng de DNA CL Brener de cultura). B - Identificação das sequências do banco de dados do NCBI que apresentaram identidade acima de 89% com as sequências dos pacientes, através da ferramenta BLAST.

4.6 Sequências obtidas pelo SANGER e ION Torrent

Os produtos de 200 pb da 5' UTR de TS das cepas Colombiana, D8 e DM28c (TcI), Y (TcII), 3663 (TcIII), 4167 (TcIV), LL014 (TcV) e CL Brener (TcVI) foram clonados e sequenciados após a PCR convencional com o par de

iniciadores P1/P2. Um total de 479 sequências (Colombiana = 77, D8 = 25, DM28c = 35, Y = 72, 3663 = 49, 4167 = 50, LL014 = 129, CL Brener = 42) foram geradas pelo sequenciamento por capilar (metodologia SANGER). Estas sequências apresentaram mais de 90 % de cobertura e identidade com 32 genes de trans-sialidases, sendo a maioria genes que codificam proteínas de superfície e mucinas, em todas as cepas, apresentando alta identidade (acima de 98 %) e cobertura (99 %) (Tabela 9). Todas as sequências que apresentaram o tamanho esperado de aproximadamente 200 pb e, que continham pelo menos um dos iniciadores na sua composição, foram utilizadas para analisar a composição nucleotídica.

Tabela 9 - Genes de trans-sialidases de *T. cruzi* disponíveis no banco de dados que apresentaram identidade com as sequências geradas neste estudo para o alvo 5' UTR de TS

Genes homólogos mRNA parcial de TS da cepa CL	Tc00.1047053510025.50	Tc00.1047053510047.80	Tc00.1047053509419.131	Tc00.1047053508873.60	Tc00.1047053510021.180	Tc00.1047053504115.10	Tc00.1047053506537.200	Tc00.1047053508103.30
	Tc00.1047053508853.20	Tc00.1047053511643.110	Tc00.1047053508873.330	Tc00.1047053510061.30	Tc00.1047053508607.50	Tc00.1047053506537.200	Tc00.1047053506173.70	Tc00.1047053506471.120
	Tc00.1047053506459.230	Tc00.1047053508521.100	Tc00.1047053504081.80	Tc00.1047053505699.10	Tc00.1047053511839.40	Tc00.1047053511843.70	Tc00.1047053506955.240	Tc00.1047053511885.20
	Tc00.1047053511233.140	Tc00.1047053508221.650	Tc00.1047053506309.60	Tc00.1047053508221.590	Tc00.1047053509581.10	Tc00.1047053511401.30	Tc00.1047053504313.10	Tc00.1047053511875.20
Outras homologias	Trypanosoma cruzi sialidase homolog (P85.2) mRNA, complete cds	Trypanosoma cruzi cosmid C71 mucin-like protein genes and c71 surface protein (sp1) gene, complete cds	Trypanosoma cruzi clone 5.4G6 stage-specific surface protein GP82 mRNA, complete cds	Trypanosoma cruzi clone C6:24B7 telomeric region	Trypanosoma cruzi cosmid C2 mucin-like protein and gp85-like protein (gp-85) genes, complete cds; and unknown genes	Trypanosoma cruzi amastigote surface protein-2 (ASP-2) mRNA, partial cds	Trypanosoma cruzi complement regulatory protein (CRP-10) mRNA, complete cds	Trypanosoma cruzi strain Y trans-sialidase (SP1) gene, partial cds; and hypothetical protein and trans-sialidase (SP2) genes, complete cds

Foi considerado e-value > ne-80, cobertura e identidade ≥ 90% para serem consideradas sequencias homólogas.

Em paralelo, os produtos de 200 pb da 5` UTR de TS de 21 cepas/clones representando as seis DTUs de *T. cruzi*, além de uma amostra *T. cruzi* (*Tcbat*) e a subespécie *T. cruzi marinkellei* (Tabela 9) foram submetidos ao sequenciamento NGS, em quatro corridas independentes. As sequências analisadas apresentaram valores de Phred maiores que vinte ($\geq Q20$). A Figura 14 mostra um exemplo de carregamento do primeiro cartucho de leitura, o qual apresentou 71 % de eficiência no carregamento, sendo que 100 % das *beads* (esferas) carregadas continham o material amplificado. Dessas, 78 % eram clonais e 22 % eram policlonais, isto é, após a realização da PCR de emulsão com as esferas, espera-se que apenas um tipo de molécula de DNA (uma cópia do produto amplificado) se ligue, portanto, quando mais de uma cópia (policlonal) é observada na esfera, esta é descartada. Finalmente, após a seleção das esferas monoclonais, 83 % das leituras foram aproveitadas, o restante foi descartado devido à baixa qualidade de leituras. O sequenciamento por NGS na primeira corrida totalizou em aproximadamente 8 milhões de esferas carregadas no cartucho de leitura, o que resultou em 5.145.163 leituras. A cada preenchimento de um novo cartucho, foi realizada uma nova biblioteca do material amplificado, seguindo posteriormente os parâmetros de carregamento das esferas.

O histograma da Figura 14 indica o tamanho, em pares de bases, das leituras das sequências geradas. Como esperado, as sequências apresentaram tamanhos de aproximadamente 200 pb, visualizados em um único pico no histograma. Todas as sequências tiveram os adaptadores retirados para as análises de bioinformática. Outros três histogramas foram gerados para os demais cartuchos, totalizando quatro corridas independentes.

O total de sequências obtidas no primeiro sequenciamento por NGS foi de 3.685.738 leituras. Nas demais corridas, foram obtidos valores menores de leituras, uma vez que foram utilizados cartuchos com menor capacidade de volume da biblioteca, porém com qualidade $\geq Q20$. A Tabela 10 consiste no resultado do sequenciamento por NGS, com obtenção de 1.445.988, 159.192, 92.803 e 116.629 leituras com informações completas (mapeadas), para o primeiro, segundo, terceiro e quarto cartuchos de leitura, respectivamente.

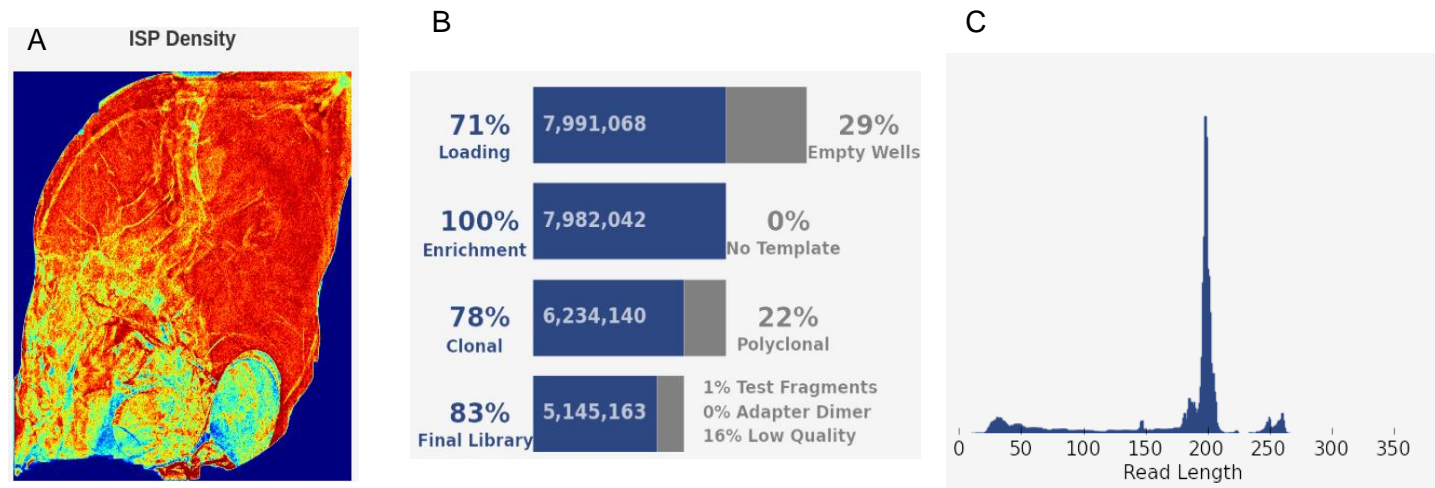


Figura 14 - Processamento do sequenciamento por Nova Geração (NGS). A. Carregamento. Escala de cores que representa o número de beads que foram carregadas no cartão de leitura; quanto mais quente, maior o número de beads carregadas. B. Percentual de leituras realizadas após a eliminação das beads policlonais. C. Distribuição do tamanho das sequências lidas em cada bead; pico único de 200 pb, mostrando que a maioria das sequências apresentou o mesmo tamanho.

Tabela 10 - Quantidade de sequências geradas pelos três cartuchos de leitura após o sequenciamento por NGS

Cepas/ clones	Sequências	Leituras Mapeadas	
	TOTAL	N	%
Primeiro sequenciamento			
3663	315.849	143.693	45,49
4167	325.813	123.854	38,01
CLBrener	323.611	117.292	36,24
Colombiana	329.242	108.981	33,10
D8	327.545	120.934	36,92
Dm28c	342.463	123.525	36,07
G	282.324	109.422	38,76
LL014	288.878	124.852	43,22
Y	374.578	130.901	34,95
Peruana	388.957	151.592	38,97
Tulahuen c10	386.478	190.942	49,41
Total	3.685.738	1.445.988	
Segundo sequenciamento			
12SF	11.363	3.275	28,82
222	47.300	14.771	31,23
3663	24.936	11.402	45,73
4167	18.501	8.526	46,08
AM14	53.460	23.095	43,20
CANIII	18.600	6.319	33,97
CLBrener*	23.934	9.787	40,89
Colombiana	8.987	1.880	20,92
D8	20.301	4.573	22,53
DM28c	18.102	2.683	14,82
G	120.619	26.558	22,02
LL014	17.460	5.785	33,13
PR1281	33.159	14.427	43,51
SO3	37.527	16.359	43,59
Y	3.330	810	24,32
Tulahuen c10	37.379	8.942	23,92
Total	494.958	159.192	
Terceiro sequenciamento			
Bug	30.940	17.179	55,52
CLBrener*	16.785	10.229	60,94
<i>TcBat</i>	31.210	4.704	15,07
<i>TMarinkelei</i>	44.513	26.181	58,82
Peruana	30.868	17.081	55,34
CP300	31.787	17.429	54,83
Total	186.103	92.803	
Quarto sequenciamento			
DTU I a	20.549	11.060	53,8
DTU I b	21.715	10.785	49,7
DTU II a	23.160	11.710	50,6
DTU II b	18.624	9.562	51,3
DTU III a	19.563	9.377	47,9
DTU III b	17.111	7.965	46,5
DTU IV a	20.995	10.850	51,7
DTU IV b	14.269	6.404	44,9
DTU V a	19.919	9.967	50,0
DTU V b	18.140	9.796	54,0
DTU VI a	19.509	10.186	52,2
DTU VI b	19.659	8.967	45,6
Total	233.213	116.629	

Colombiana, D8, G, DM28c e Tulahuen c10 - TcI; Y, 12SF e PR1281 - TcII; 3663 e 222 - TcIII; 4167, CAN III e AM14 - TcIV; LL014, Bug 2149 e SO3 - TcV; CL Brener e CP300 – TcVI; * CL Brener Maringá.

4.6.1 Identificação de fragmentos polimórficos na região 5' UTR de *Trans-sialidases de T. cruzi*

As 1.445.988 sequências mapeadas da primeira leitura do sequenciamento de NGS foram submetidas à análise de fragmentos (*K-mer*). Nesta análise foram identificados 1371 fragmentos, com 20 nucleotídeos, que apresentaram composição nucleotídica semelhante entre as cepas/clones de uma mesma DTU e foram diferentes entre as DTUs. Estes se encontraram distribuídos da seguinte forma: TcI = 26, TcII = 173, TcIII = 335, TcIV = 709, TcV = 45, TcVI = 83. A frequência de ocorrência desses fragmentos em cada DTU variou entre 1000 a 17.279 ocorrências (Figura 16). Através da ferramenta BLAST, foram identificados 22,5% destes fragmentos (n = 309) em 31 sequências geradas pelo método de SANGER. Estas sequências foram alinhadas para melhor visualização da composição nucleotídica entre elas (Figura 15). Foi possível visualizar uma região com deleção e/ou adição de nucleotídeos (INDEL) próxima a região entre o iniciador senso e o primeiro ATG. Também foi observada a presença de outro códon iniciador (ATG) na composição de algumas sequências.

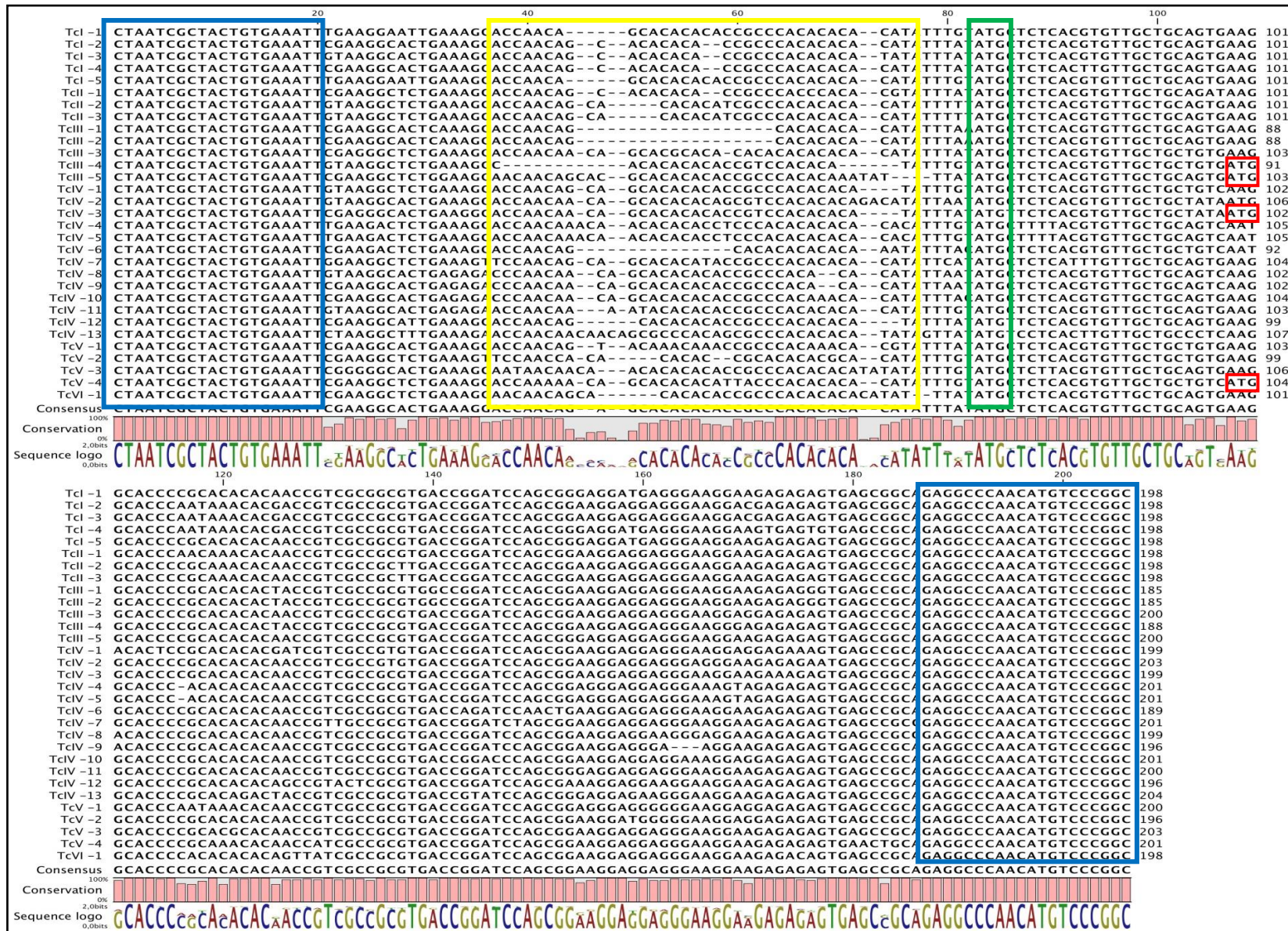


Figura 15 - Alinhamento das 31 seqüências que apresentaram em sua composição os fragmentos com 20 nt mais frequentes de cada DTU. Retângulos em azul indicam os iniciadores P1/P2; em amarelo está indicada a região INDEL; em verde o ATG da anotação científica e em vermelho, prováveis ATG adicionais.

Desta forma, foram identificadas 31 sequências, geradas pelo SANGER, que continham em sua composição os fragmentos de 20 nt com maior frequência de ocorrência (Figura 15). Para TcI foram identificadas cinco sequências que apresentaram em sua composição 92,31% (n = 24) dos fragmentos gerados pela análise de *k-mer* (NGS) para esta DTU. Nas sequências de TcIV, 225 fragmentos (31,7 %) foram encontrados em 13 sequências. Em TcII, TcIII e TcV foram detectados 14 (8,1 %), 12 (3,6 %) e 14 (31,1 %) fragmentos, distribuídos em 3, 5 e 4 sequências, respectivamente. Para TcVI apenas uma sequência apresentou 24% dos 83 fragmentos obtidos por NGS. Nas sequências obtidas por SANGER, com exceção de TcI, um percentual menor dos fragmentos de 20 nt gerados pela análise de *K-mer* (NGS) foi identificado. Porém, as sequências das demais DTUs apresentaram em sua composição fragmentos de 20 nt com distribuição uniforme dos valores mínimo e máximo (TcII e TcV) ou apenas os valores máximos (TcIII e TcVI) das frequências observadas pela análise de *k-mer* (Figura 16).

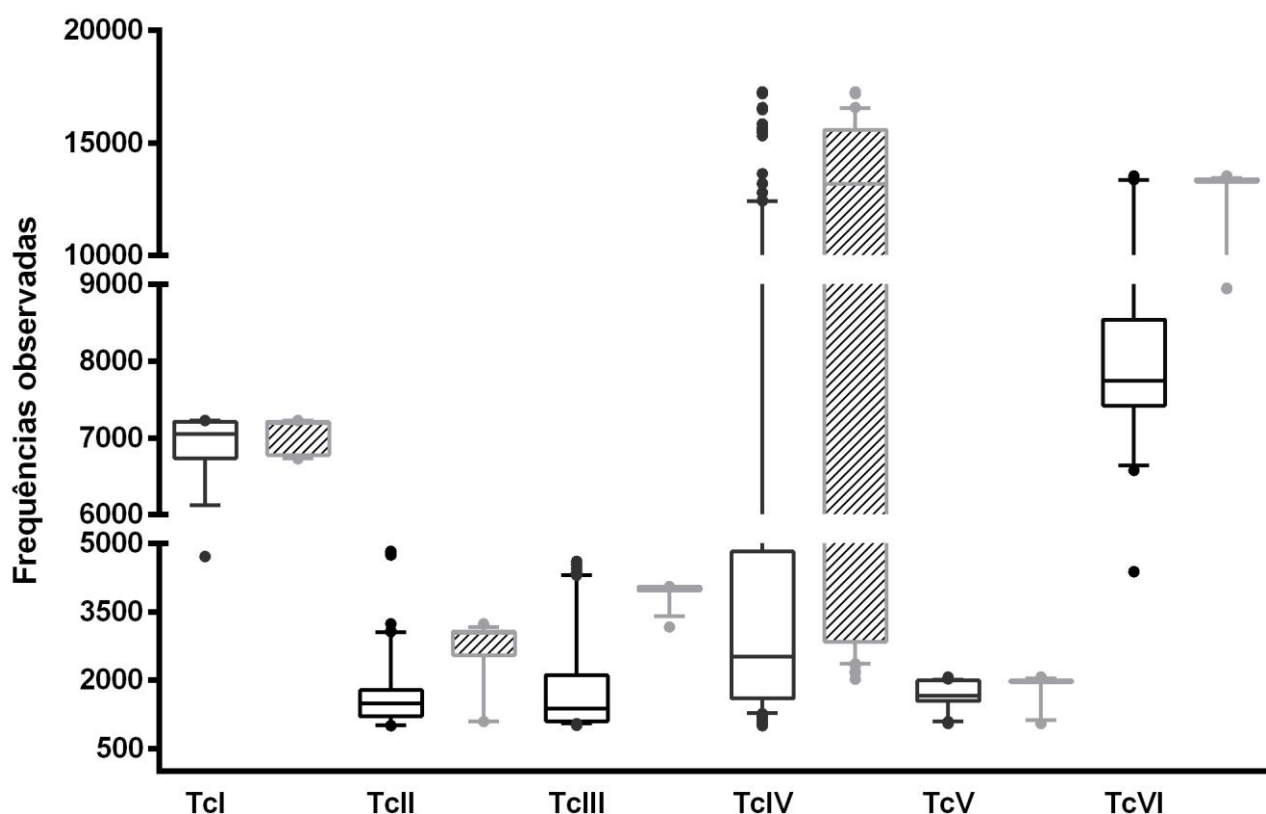


Figura 16 – Representação das frequências de ocorrência dos fragmentos de 20 nt gerados pela análise de *k-mer* (NGS) e observados nas sequências geradas pelo sequenciamento capilar (SANGER). Valores mínimo e máximo de frequência de ocorrência dos fragmentos totais por NGS em TcI: 4718 e 7230, TcII: 1001 e 4831, TcIII: 1009 e 4614, TcIV: 1000 e 17.279, TcV: 1053 e 2073, TcVI: 4383 e 13535. Símbolo vazio - valores máximo e mínimo das frequências observadas por NGS. Símbolo hachurado - valores máximo e mínimo das frequências observadas apenas dos fragmentos identificados nas sequências do SANGER. As linhas horizontais representam a mediana e as caixas compreendem os quartis superior e inferior. As linhas acima e abaixo indicam os percentis 90 e 10 respectivamente e os círculos representam os valores *outliers* ($P > 0,05$; ANOVA - *Tukey's multiple comparisons test*).

A partir das 31 sequências da 5' UTR de TS geradas pelo método de SANGER, foram obtidos os consensos para cada DTU; para TcVI apenas uma sequência foi gerada. Embora represente um número pequeno de sequências, estas apresentaram a mesma tendência de distribuição composicional de dinucleotídeos (DI), quando comparadas com as sequências referência para os genes de TS da cepa CL Brener depositadas no banco de dados NCBI (Figura 17) (Apêndice B).

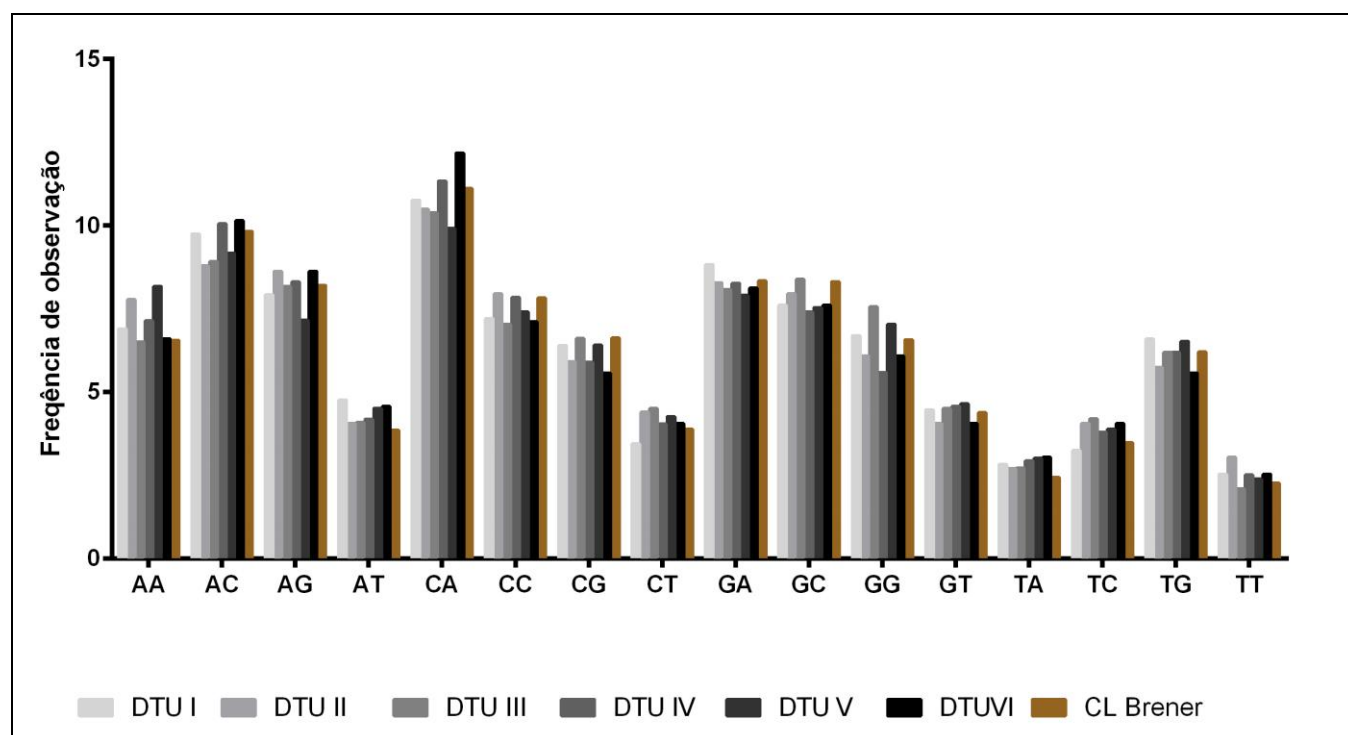


Figura 17. Comparação entre as tendências da distribuição composicional dos 16 dinucleotídeos na região 5' UTR das diferentes DTUs. Foram utilizadas na comparação as sequências de referências dos genes de TS de *T. cruzi* CL Brener depositadas no banco de dados NCBI.

Através do alinhamento dos consensos da 5' UTR de TS para cada DTU, obtidos a partir das 31 sequências, foi possível localizar os fragmentos de 20 nt, os quais continham sítios polimórficos que foram comuns entre as sequências de cepas/clones representantes de uma mesma DTU. Por esta análise, foram identificados dois blocos conservados na 5' UTR de TS, presentes nas sequências consenso das seis DTUs (primeiro bloco: ATG CTC TCA CGT GTT e segundo bloco: CCG GAT CCA GCG). Na região entre o iniciador senso até o primeiro bloco, foram localizados os fragmentos de 20 nt de TcIII e TcIV. Entre os blocos conservados, foram identificados os fragmentos de cinco DTUs, com exceção de TcVI, onde os fragmentos se encontraram mais próximos ao iniciador reverso, entre o segundo bloco conservado e o iniciador reverso (Figura 18).

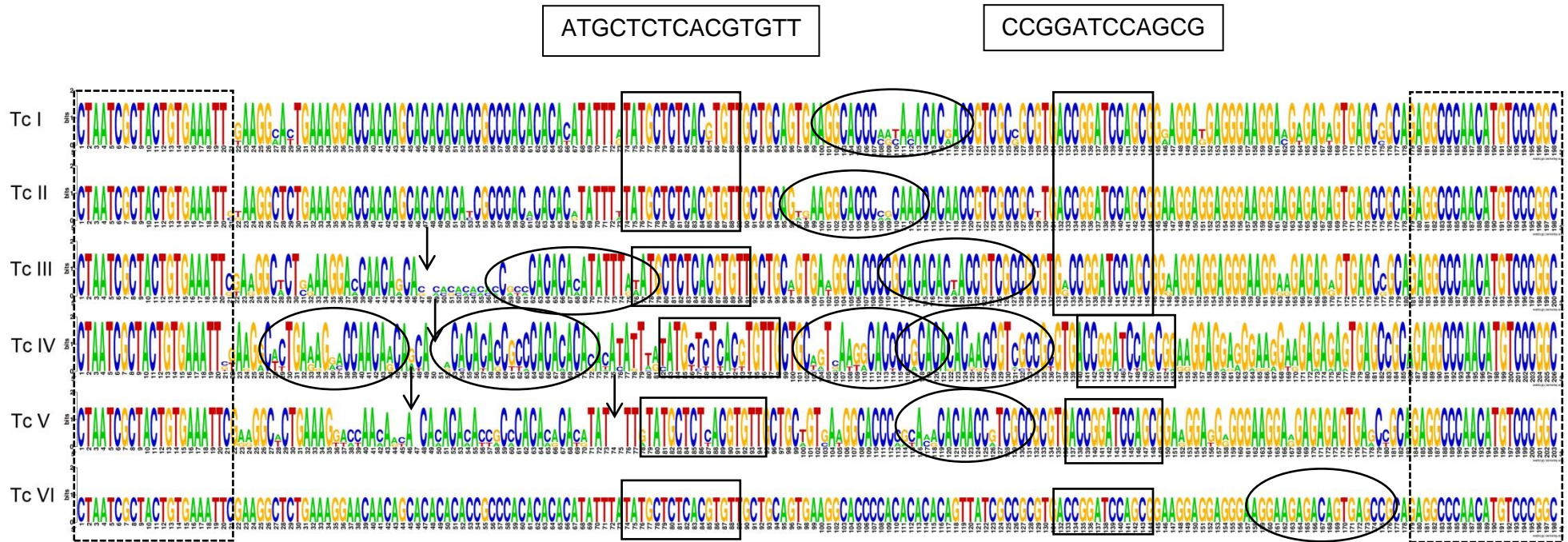


Figura 18 - Sequências consenso da 5' UTR de TS das seis DTUs geradas a partir do alinhamento das 31 sequências obtidas pelo SANGER e localização dos fragmentos com 20 nucleotídeos de cada DTU de *T. cruzi*. Retângulos em linhas descontínuas - posição dos iniciadores P1 e P2. Retângulos em linhas contínuas - Blocos conservados, Círculos - localização dos fragmentos com 20 nucleotídeos, seta - região com provável deleção.

4.6.2 Análise composicional das sequências de 5' UTR de TS de *T. cruzi*

A análise da distribuição dos 16 dinucleotídeos (DI) foi realizada com as 31 sequências da 5' UTR de TS (cerca de 200 pb) (Figura 15), após a divisão desta região em três seções. A quantidade dos DI apresentou distribuição uniforme com medianas 31,59; 32,54 e 29,65 para as seções 1, 2 e 3 respectivamente (Figura 19).

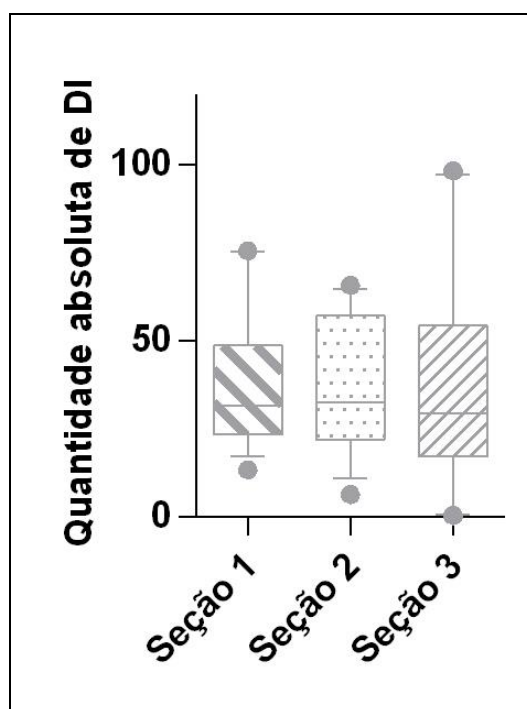


Figura 19 – Quantidades dos 16 dinucleotídeos nas três seções da região 5' UTR de Trans-sialidase de *T. cruzi*. Seção 1 – iniciadores P1/P4, seção 2 – iniciadores P5/P3 e seção 3 – iniciadores P5/P2. As linhas horizontais representam a mediana e as caixas compreendem os quartis superior e inferior. As linhas acima e abaixo das caixas indicam os percentis 90 e 10 respectivamente e os círculos representam os valores *outliers* ($P > 0,05$; ANOVA- *Tukey's multiple comparisons test*).

Para todas as DTUs, a primeira seção, entre o iniciador senso até o primeiro bloco conservado, apresentou uma maior frequência de AC e CA, semelhantes entre si ($*p>0,05$) e diferentes dos demais DI ($*p<0,05$). A seção 2, entre os blocos conservados, apresentou maior homogeneidade na distribuição dos DI, sem haver diferenças significativas entre as suas frequências ($*p>0,05$). Embora esta seção tenha apresentado uma semelhança nas frequências dos DI, esta foi a região onde se localizaram os fragmentos de 20 nt para as DTUs: Tc I, TcII, TcIII, TcIV e TcV. A distribuição dos 16 DI na seção 3 apresentou uma maior frequência de AG, GA e GG, significativamente distinta dos demais (Figura 20).

Após a análise da distribuição das frequências dos 16 DI, nas três seções da 5' UTR de TS, foram observadas diferenças significativas na frequência dos dinucleotídeos AA, CC, AG, CA e GG entre as DTUs (Figura 20). Na primeira seção, a frequência de AA diferenciou TcV de TcI / TcII, assim como, CC diferenciou TcI / TcII e TcIV de TcIII. Na segunda seção, a frequência de AA foi mais observada em TcII, sendo significativamente maior que TcIII, TcIV e TcVI; o mesmo foi observado para TcI em relação à TcVI. A elevada frequência de CA na composição dessa segunda seção distinguiu TcVI de TcV, TcIII e TcI. Na terceira seção do fragmento de 200 pb, TcIII e TcV diferenciaram-se dos demais grupos, exceto TcI, pela elevada frequência de GG. Todas as diferenças foram estatisticamente significantes ($**p<0,05$) (Figura 20).

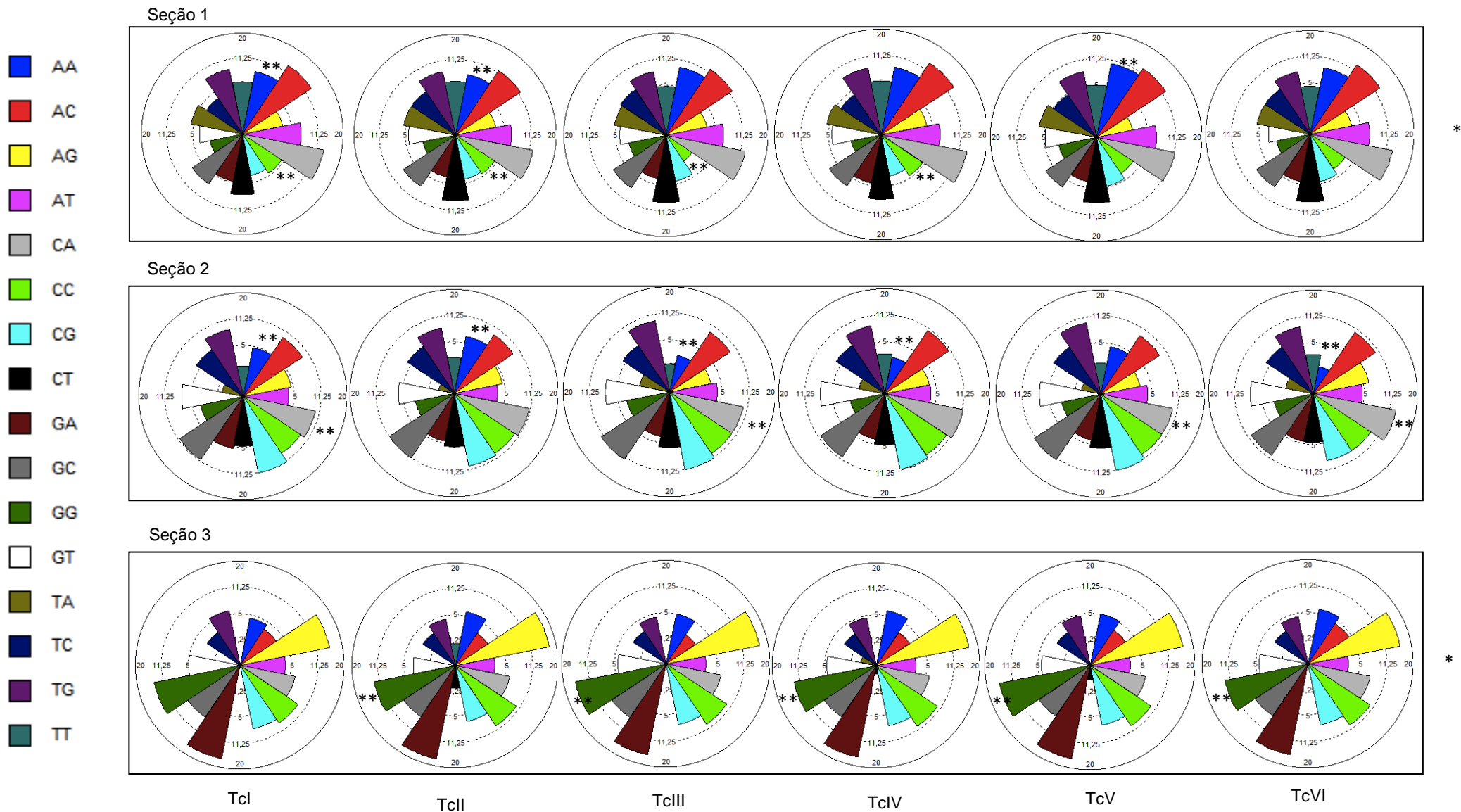


Figura 20 – Distribuição dos valores da frequência de DI por seção da 5' UTR de TS entre cepas/clones representantes de cada DTU. * - **AC** e **CA**, mais frequentes com diferenças significativas entre os demais DI na seção 1; * - **AG**, **GA** e **GG**, mais frequentes com diferenças significativas entre os demais DI na seção 3. ** - Seção 1: TcI, TcII, TcIV estatisticamente diferentes de TcIII para **CC**; TcV estatisticamente diferente de TcI e TcII para **AA**; ** Seção 2: Em relação a AA, TcI e TcII são significativamente diferentes de TcVI, além de TcII ser diferente de TcIII e TcIV. Para **CA**, TcVI é significativamente diferente de TcI, TcIII e TcV; ** Seção 3: TcIII e TcV são diferentes estatisticamente de TcII, TcIV e TcVI para **GG**. *, ** p<0,05.

4.7 PCR em Tempo Real e *High-Resolution Melting*

4.7.1 Iniciadores para a reação de PCR-HRM

A partir da análise composicional dos dinucleotídeos da região 5' UTR de TS e com a identificação de fragmentos de 20 nt contendo sítios polimórficos entre as distintas DTUs, o conjunto dos cinco iniciadores para a amplificação do fragmento inteiro da 5' UTR (200 pb) ou das suas respectivas seções (1, 2 ou 3), foi aplicado em ensaios de PCR em Tempo Real por *High Resolution Melting* (HRM), em combinações distintas, com o objetivo de identificar/agrupar as cepas/clones de *T. cruzi* através das variações observadas nas análises das sequências (Tabela 11).

Tabela 11- Iniciadores para aplicação no HRM

ID	Sequências	Aplicação
P1	CTA ATC GCT ACT GTG AAA TT	PCR convencional em amostras de cultura e sangue / Sequenciamento / PCR HRM
P2	GCC GGG ACA TGT TGG GCC TC	PCR convencional em amostras de cultura / Sequenciamento / PCR HRM
P3	CGC TGG ATC CGG TCA CG	PCR convencional em amostras de sangue / Sequenciamento / PCR HRM
P4	GCA GCA ACA CGT GAG AGC ATA	PCR HRM
P5	ATG CTC TCA CGT GTT GCT GC	PCR HRM
Combinação		
P1/P2 = fragmento da região 5' UTR de TS		
P1/P4 = seção 1 da região 5' UTR de TS		
P5/P3 = seção 2 da região 5' UTR de TS		
P5/P2 = seção 2 e 3 da região 5' UTR de TS		

ID- Identificação dos iniciadores

4.7.2 Genotipagem de *T. cruzi* a partir de PCR HRM com alvo na trans-sialidase

A variabilidade na composição nucleotídica das três seções da região 5' UTR de TS foi avaliada através do HRM, inicialmente, para os clones de trans-sialidase obtidos a partir de produtos de PCR para cada cepa de *T. cruzi* analisada, os quais continham em seu inserto as sequências anteriormente identificadas com o estudo dos fragmentos de 20 nt mais frequentes (Figura 15). Como descrito nos Materiais e Métodos, o DNA destes clones foi diluído para a concentração de 1 pg/ μ L, a fim de adequar o valor de Ct para 20. A classificação das amostras foi obtida pelos gráficos de diferenças, gerados pelo programa ViiA7 RUO, para cada produto amplificado com os pares de iniciadores: P1/P4 (seção 1), P5/P3 (seção 2), P5/P2 (seções 2 e 3) e P1/P2 (fragmento inteiro) (Figura 21).

A PCR HRM com os iniciadores P1/P2, para toda a região 5' UTR de TS, agrupou os clones em seis variantes (Figura 20, A e B). Também foi observada uma aproximação entre as variantes 2 e 6 no gráfico das diferenças, alinhadas abaixo da amostra padrão (Figura 21B). A variante 1 (azul) apresentou curvas semelhantes as variantes alinhadas abaixo (2 e 6) e acima (3, 4 e 5) da amostra padrão. A amostra padrão foi um dos produtos de TS clonado, utilizado em todas as reações. Para estes ensaios foi escolhido como referência um clone da cepa/clone 4167 (localizado sempre no poço 1 A de todas as placas).

O gráfico das diferenças gerado pelos iniciadores P1/P4 alinhou as variantes 2 e 3 (rosa e lilás) próximas e abaixo do padrão (Figura 21 D). Da mesma forma que o gráfico com os iniciadores P1/P2, as amostras geradas com P5/P3 e P5/P2 foram alinhadas nos dois eixos do gráfico (Figuras 21, F e H), na seguinte forma: P5/P3 - variante 1 (em azul) – alinhada tanto acima e abaixo do padrão; variante 2 (verde) e variantes 3 e 4 (amarelo e cinza) acima e abaixo da linha padrão, respectivamente; P5/P2 - variante 1 (amarelo) – alinhada com o padrão; variantes 2, 3 e 4 (laranja, vermelho e verde musgo) e variante 5 (azul) acima e abaixo da amostra padrão, respectivamente.

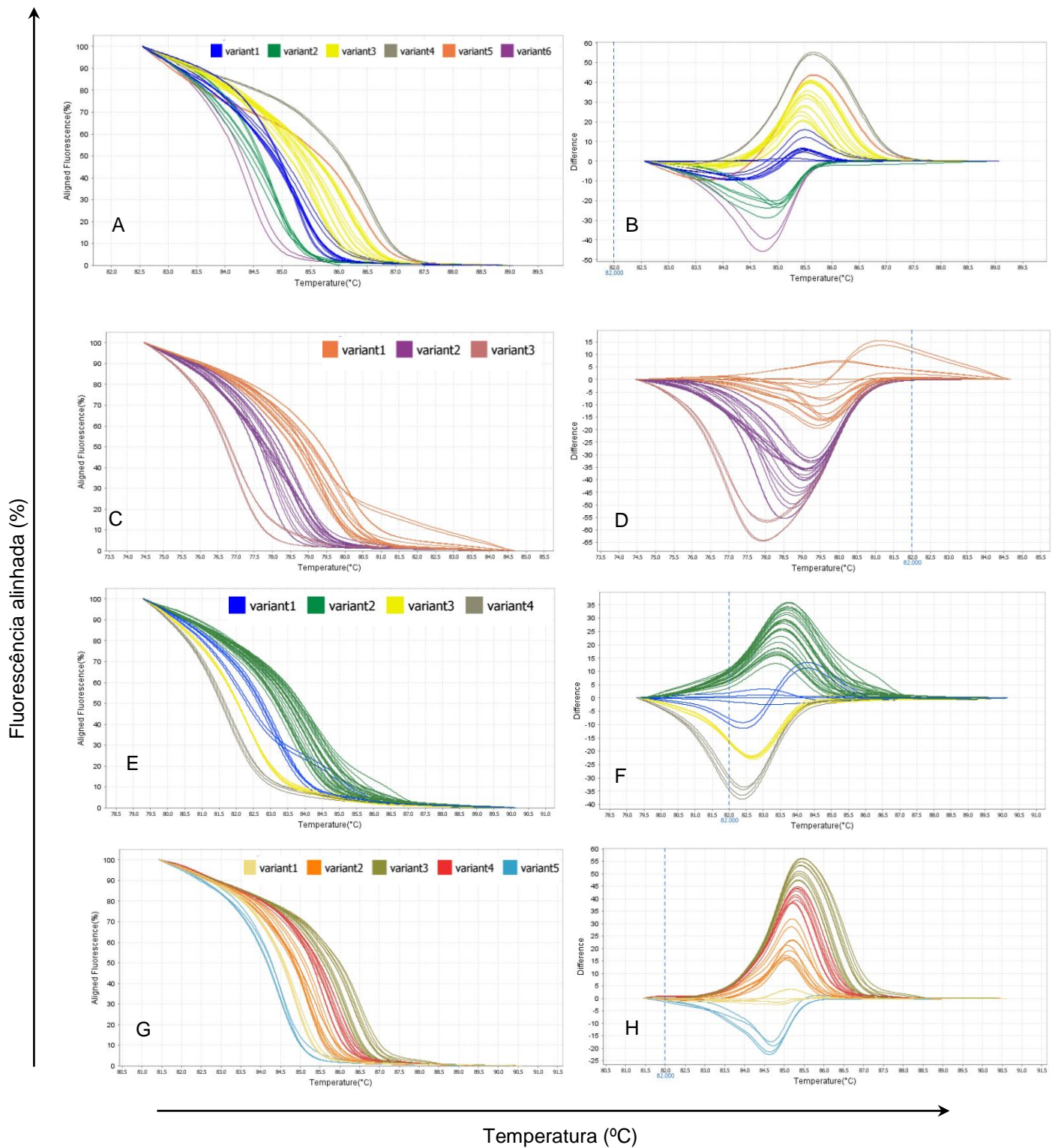


Figura 21. Ensaio por HRM dos clones da trans-sialidase de *T. cruzi*. Os produtos de PCR foram clonados, e sequenciados por SANGER e continham em sua composição os fragmentos de 20 nt com alta frequência. A e B - Amplificação com os iniciadores P1/P2 (fragmento inteiro com 200 pb); C e D - Amplificação com os iniciadores P1/P4 (Seção 1); E e F - Amplificação com os iniciadores P5/P3 (Seção 2); G e H - Amplificação com os iniciadores P5/P2 (Seções 2 e 3). A, C, E e G Curva de dissociação normalizada e B, D, F e H Gráfico das diferenças. As cores indicam as variantes.

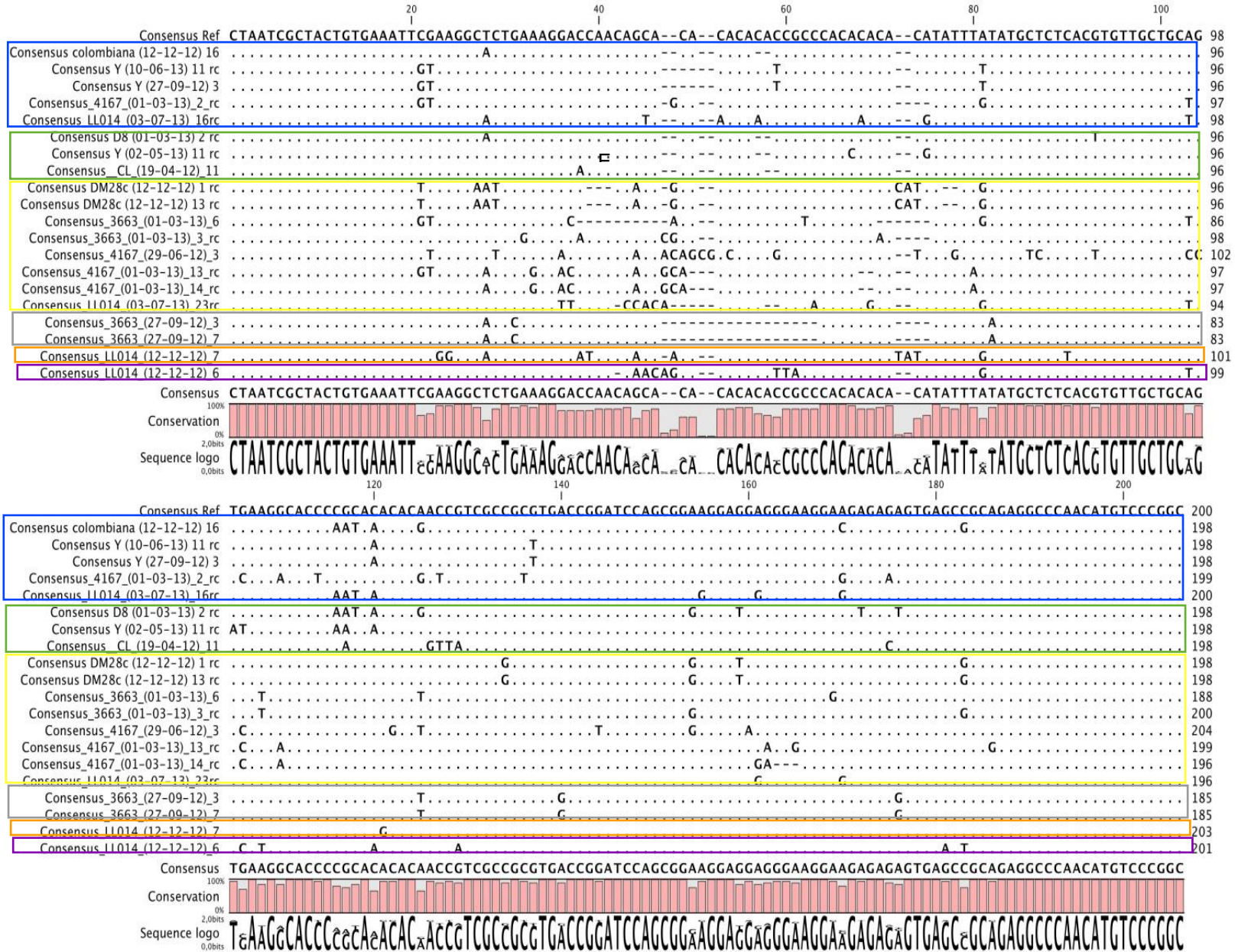
Para identificar, entre os produtos de PCR da trans-sialidase clonados, quais polimorfismos foram responsáveis pelo agrupamento destes produtos (Figura 22), as sequências de cada variante foram alinhadas de acordo com a seção amplificada pela PCR HRM e comparadas ao consenso de referência (sequências de CL Brener depositadas no NCBI). Como pode ser observado na Figura 22 A, as variantes 1 e 2 (em azul e amarelo), geradas pela amplificação com os iniciadores P1/P2 (Figura 21, A e B), apresentaram um maior número de polimorfismos em toda sua extensão (200 pb). Por outro lado, as demais variantes consistiram em poucos pontos polimórficos (Figura 22 A).

Dentre as 6 variantes geradas com os iniciadores P1/P2, os 4 produtos de TS clonados de LL014 foram as que se localizaram em 4 distintas variantes: variante 1 (em azul), variante 3 (em amarelo), variante 5 (em rosa) e variante 6 (em lilás). Foi observada uma composição distinta de CA entre as variantes, na região antes do ATG, e algumas trocas de nucleotídeos, principalmente G>A e C>A. Em TcI, os produtos clonados de TS foram agrupados em 3 distintas variantes: 1 (em azul) - Colombiana, 2 – (em verde) D8 e 3 – (em amarelo) as duas sequências de DM28c. A variação observada nestas sequências foram a inserção de três nucleotídeos (CAT) em DM28c, e trocas de nucleotídeos (C>T e C>A). Já as sequências das cepas Y, 3663 e 4167, cada uma foi agrupada em 2 variantes: Y - variantes 1 e 2 (azul e verde); 3663 - variante 3 e 4 (amarelo e cinza); 4167 - variantes 1 e 3 (azul e amarelo). As sequências da cepa Y apresentaram uma menor quantidade de variações nucleotídicas entre si, com trocas entre T>G, A>T e C>A. Nas sequências de 3663, foram observadas variações na composição da região rica em CA e trocas nucleotídicas, com destaque para T>A. E as sequências da cepa 4167 apresentaram alterações principalmente entre G>A (Figura 22 A).

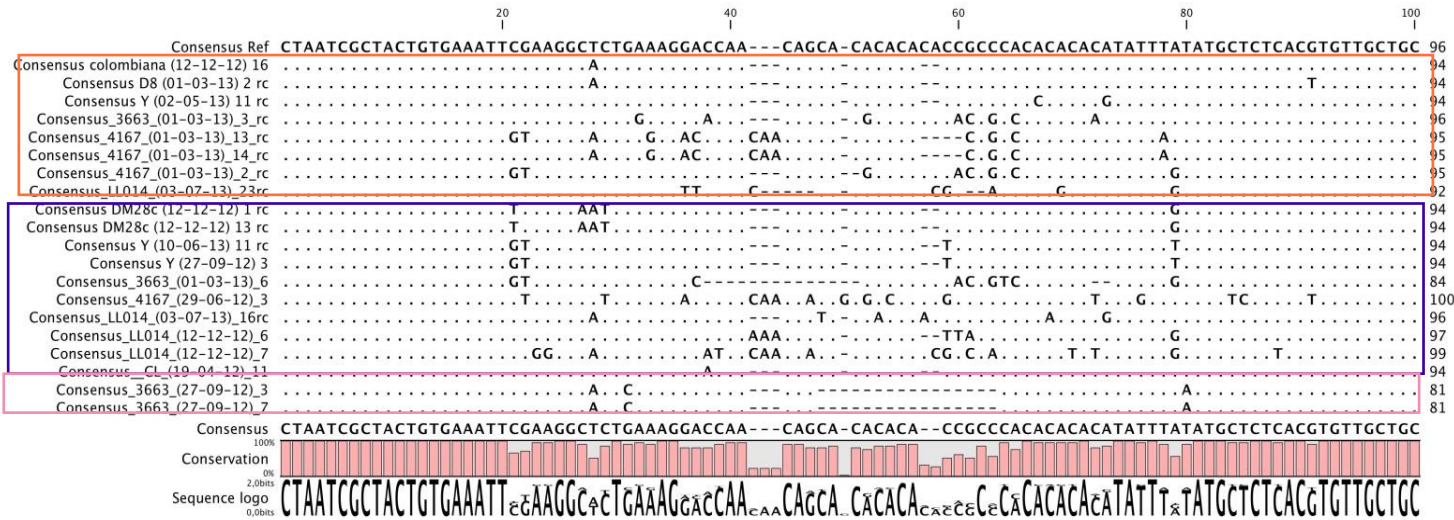
Os produtos de TS clonados submetidos a PCR HRM com os iniciadores P1/P4 (seção 1) foram agrupados em 3 variantes. As variantes 1 e 2 (laranja e lilás) apresentaram maior número de polimorfismos, sendo o nucleotídeo T mais presente na variante 2 (Figura 22 B). Por outro lado, a terceira variante (rosa) apresentou apenas 3 sítios polimórficos. Na seção 2 (P5/P3), os polimorfismos presentes nas variantes 3 e 4 (amarelo e cinza) foram muito similares entre os nucleotídeos 34-38 (Figura 22 C), o que gerou um gráfico de diferenças bem próximas (Figura 21 F). Mesmo apresentando 4 diferentes variantes, esta seção agrupou a maioria dos produtos de TS clonados em 3 ou 2 variantes, apenas os 4 produtos de TS clonados da cepa 3663 se encontram juntos na variante 1 (azul). Nos ensaios de PCR HRM para seção 2 e 3 juntas, amplificadas pelos

iniciadores P5/P2, as variantes 3 e 5 (verde e azul) foram diferentes, apresentando presença de G/T e A/T respectivamente, enquanto que, as variantes 1, 2 e 4 (amarela, laranja e vermelha) apresentaram polimorfismos similares entre os nucleotídeos 24 a 40 (variantes 1 e 2) e 74 a 82 (variante 1 e 4) (Figura 22 D). Da mesma forma que observado na seção 2 (P5/P3), a distribuição dos produtos de TS clonados ocorreu em 2 ou 3 variantes, e os clones de 3663 foram agrupados juntos numa única variante (3 - em verde).

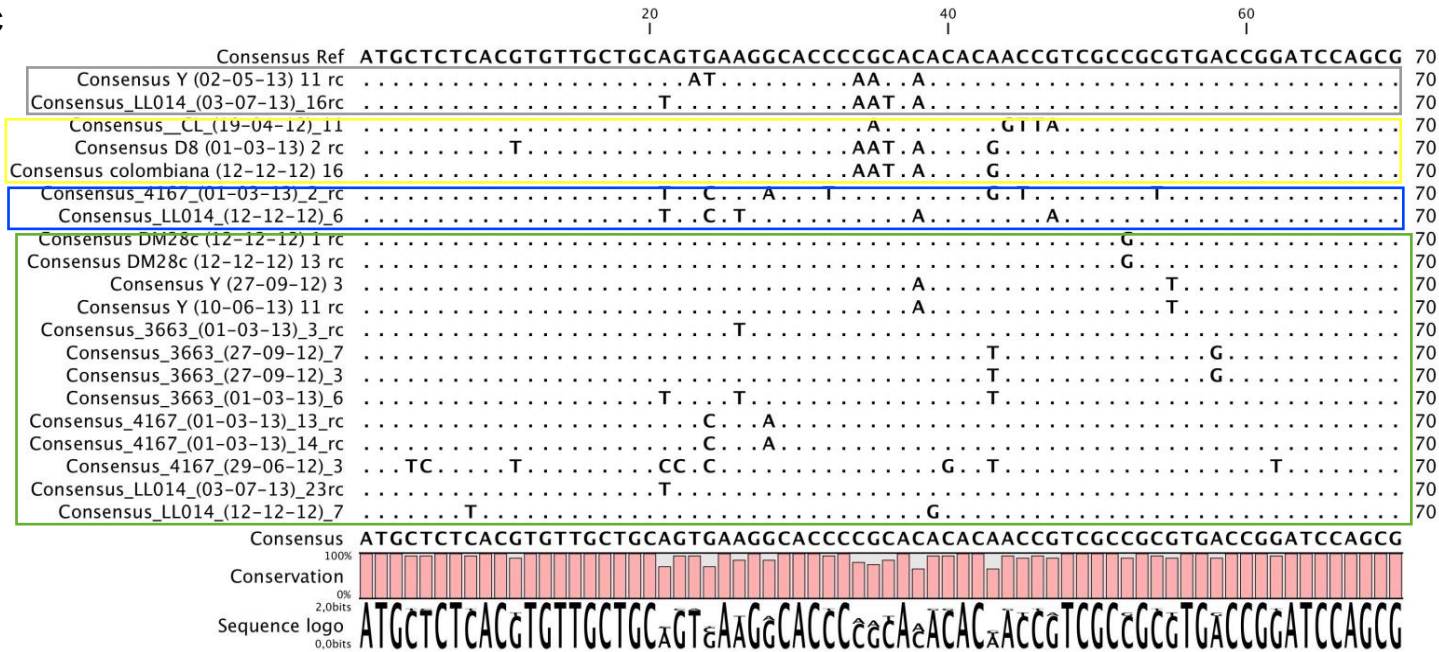
A



B



C



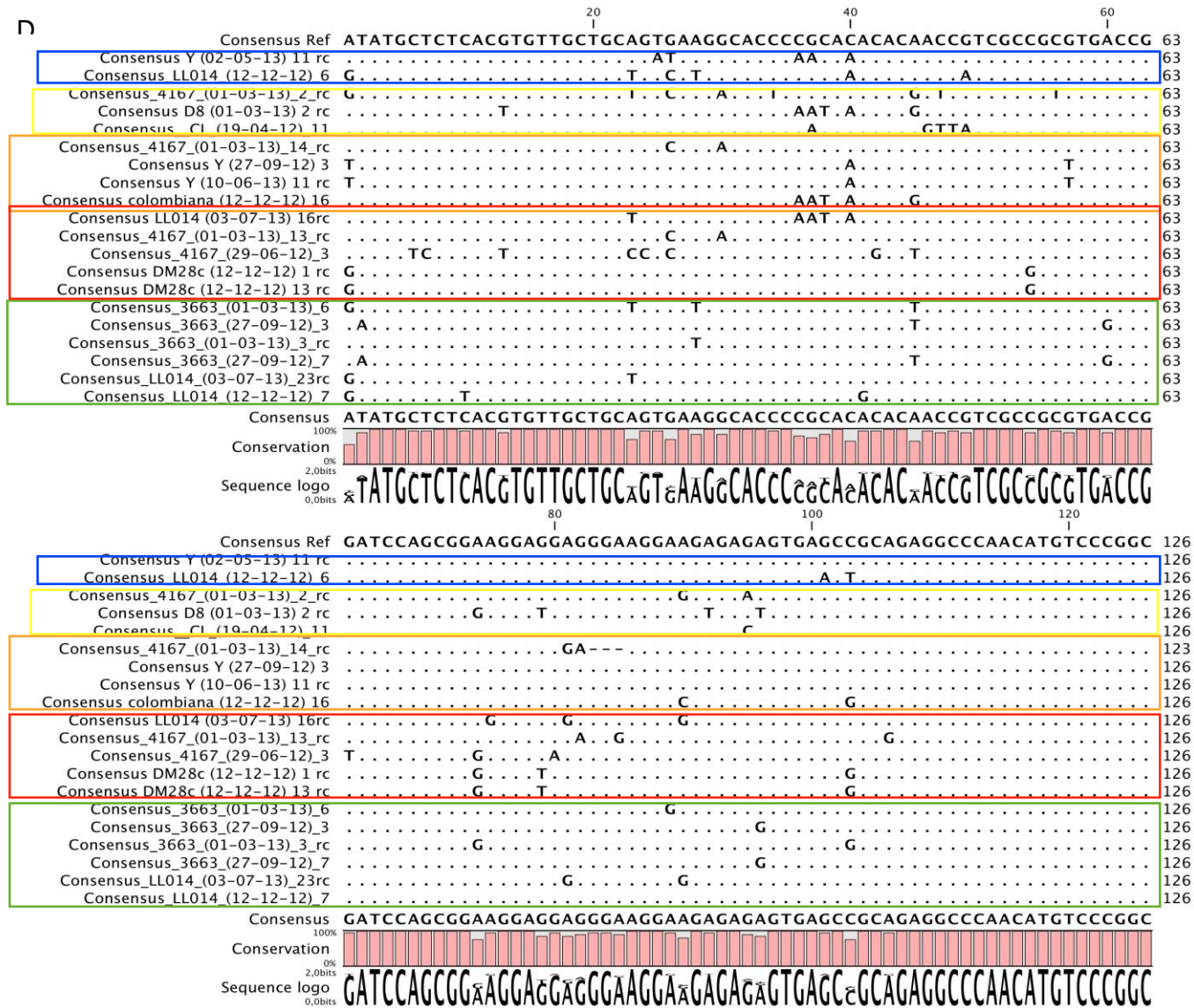


Figura 22. Identificação dos polimorfismos observados entre as sequências dos clones recombinantes após o agrupamento pela PCR HRM para cada seção. A- seção amplificada com os iniciadores P1/P2, B-seção amplificada pelos iniciadores P1/P4, C- seção amplificada pelos iniciadores P5/P3 e D – seção amplificada pelos iniciadores P5/P2. As cores dos retângulos estão associadas com as cores de cada variante gerada pelo PCR HRM.

Em sequência, a reação de PCR HRM com amostras de DNA genômico obtido de cepas/clones de cultura foi padronizada para permitir a classificação dos genótipos, tendo como base a identificação de sítios polimórficos na região 5' UTR de TS, nas cepas/clones de *T. cruzi* analisadas.

Foram realizadas alterações na etapa de ciclagem da PCR HRM. Entre as alterações, a adição da temperatura crítica (TC) teve a finalidade de gerar uma maior definição entre as variáveis, uma vez que a pré-dissociação dos fragmentos durante a ciclagem diminuiu a formação de heterodúplex, principalmente em amostras heterogêneas (família multigênica de TS).

A temperatura crítica foi selecionada após a avaliação da faixa entre 81 e 83 °C. As temperaturas críticas de desnaturação para os produtos amplificados com cada conjunto de iniciadores (P1/P2, P1/P4, P5/P3 e P5/P2) foram selecionadas através da visualização da curva de dissociação (Figura 23 A) e dos fragmentos em gel de agarose (Figura 23, B a E). Na temperatura de 82,5 °C para os iniciadores P1P4 (seção 1, Figura 23C), nenhuma amostra apresentou fragmentos de heterodúplex. Esta mesma temperatura foi utilizada com os iniciadores P1/P2 (fragmento inteiro com 200 pb), P5/P3 (seção 2) e P5/P2 (seção 2 e 3 juntas), porém em algumas amostras foram observados fragmentos com tamanhos diferentes, sendo a reação com os iniciadores P1/P2 não foi visualizado o fragmento esperado com 200 pb (Figura 23B) e P5/P2 (seção 2 e 3) geraram maior formação de heteroduplex (Figura 23E).

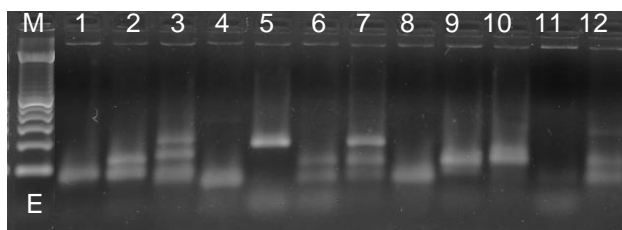
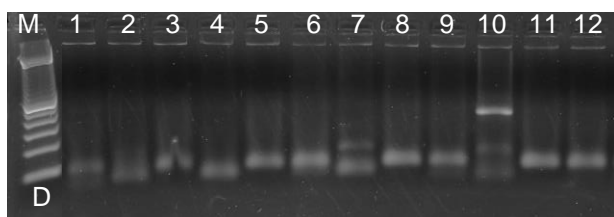
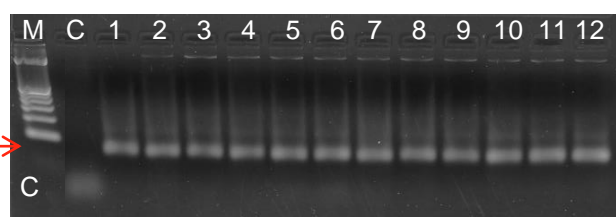
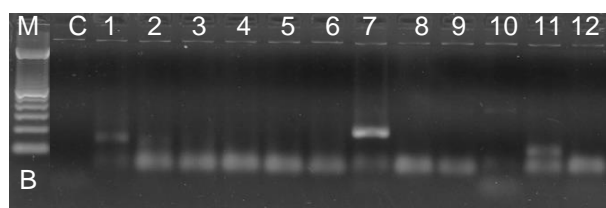
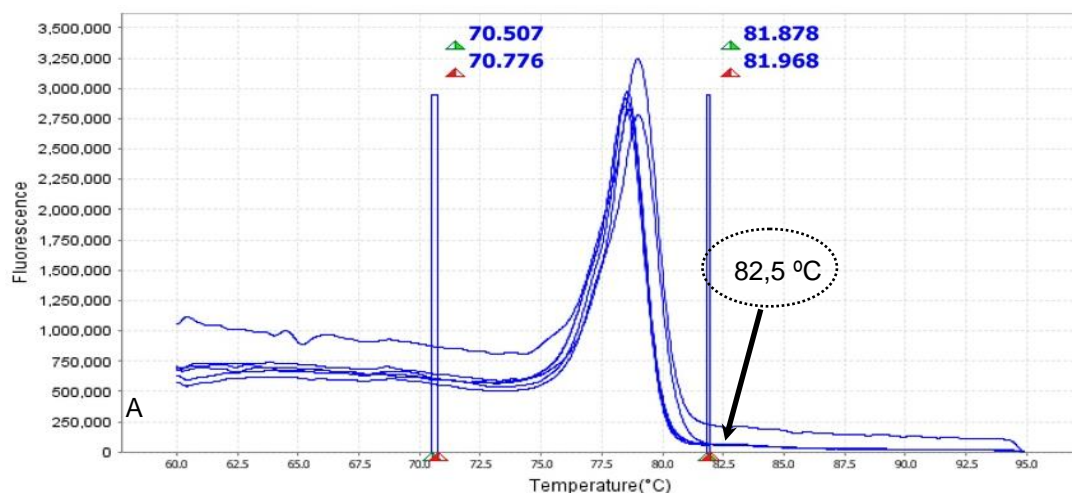


Figura 23. Determinação da Temperatura Crítica (TC) utilizada na qPCR HRM. A - Exemplo da curva derivativa de dissociação da qPCR com amostra CL Brener e os iniciadores P1/P4, P1/P2, P5/P3 e P5/P2; B - Eletroforese dos produtos amplificados com os iniciadores P1/P2; C - Eletroforese dos produtos amplificados com os iniciadores P1/P4; D - Eletroforese dos produtos amplificados com os iniciadores P5/P3; E - Eletroforese dos produtos amplificados com os iniciadores P5/P2. C – Controle reagente (todos os reagentes sem DNA), 1- CL Brener (TcVI), 2 - DM28c (Tcl), 3 - Y (TcII), 4 - 3663 (TcIII), 5 - 4167 (TcIV), 6 - LL014 (TcV), 7 - D8 (Tcl), 8 - PR1281, 9 - AM14 (TcIV), 10 - SO3 (TcV), 11 - Colombiana (Tcl) e 12 - 222 (TcIII). Gel de agarose a 2% corado com *Nancy-520 DNA Gel Stain*.

A PCR HRM com a nova padronização foi avaliada a partir de 10 cepas/clones de *T. cruzi*: DM28c, D8 e Colombiana (Tcl), Y e PR1281(TcII), 3663 (TcIII), 4167 (TcIV), LL014 e SO3 (TcV) e CL Brener (TcVI). Neste ensaio, as curvas de dissociação normalizadas foram capazes de discriminar as amostras em variantes (Figura 24 A, C e E), assim como foi observado nos ensaios a partir dos clones recombinantes (Figura 20). Para a PCR HRM com os iniciadores P1/P2, P1/P4 e P5/P2 foram geradas 3 variantes (Figura 24 B, D e H) enquanto para os iniciadores P5/P3 (seção 2) duas variantes (Figura 24 F).

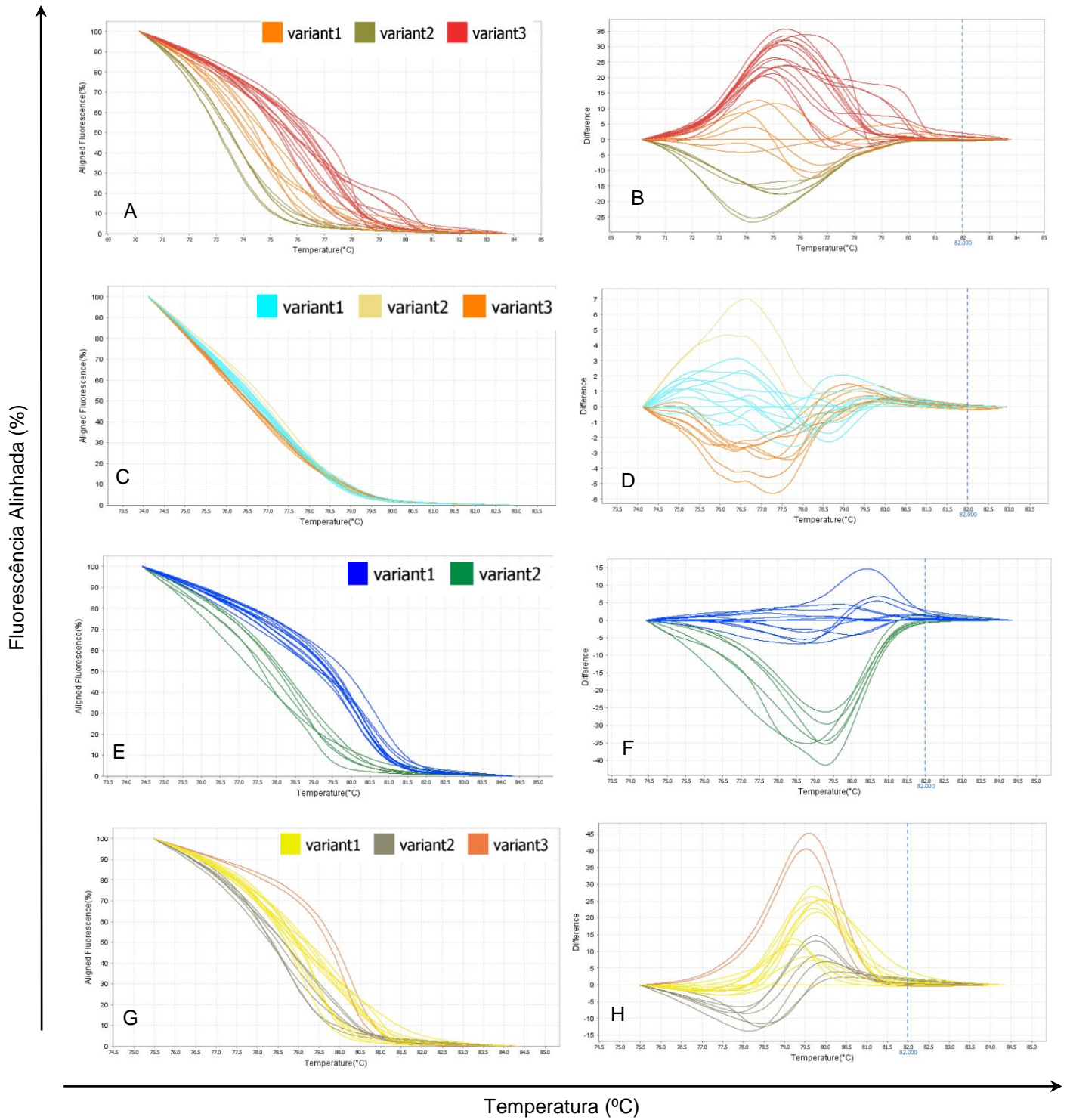


Figura 24. Ensaio por HRM de DM28c, D8 e Colombiana (TcI), Y e PR1281(TcII), 3663 (TcIII), 4167 (TcIV), LL014 e SO3 (TcV) e CL Brener (TcVI). A e B - Amplificação com os iniciadores P1/P2 (fragmento inteiro com 200 pb); C e D - Amplificação com os iniciadores P1/P4 (Seção 1); E e F - Amplificação com os iniciadores P5/P3 (Seção 2); G e H - Amplificação com os iniciadores P5/P2 (Seções 2 e 3). A, C, E e G Curva de dissociação normalizada e B, D, F e H gráfico das diferenças.

As variantes geradas pela amplificação com os iniciadores P1/P4 e P5/P3 foram capazes de agrupar cepas/clones com maior precisão em comparação aos iniciadores P1/P2 e P5/P2, pois estes podem ter amplificado polimorfismos semelhantes entre as variantes, agrupando as mesmas cepas/clones em variantes distintas (Tabela 12).

Tabela 12 - Distribuição das cepas/clones em variantes.

Variante	Fragmento inteiro (P1/P2)	Seção 1 (P1/P4)	Seção 2 (P5/P3)	Seção 2 e 3 (P5/P2)
1	Y, LL014, CL Brener, 4167, D8 (curvas em laranja)	CL Brener, Y, 3663, 4167, D8, LL014 (curvas em azul)	CL Brener, Y, 4167, LL014, PR1281, SO3 (curvas em azul)	CL Brener, Y, 3663, LL014, D8, SO3, Colombiana, PR1281, DM28c (curvas em amarelo)
2	SO3, Colombiana, PR1281, LL014, DM28c, 3663, (curvas em vermelho)	DM28c, Colombiana, PR1281 (curvas em laranja)	DM28c, 3663, D8, Colombiana (curvas em verde)	CL Brener, Y, 3663, LL014, D8, PR1281 (curvas em cinza)
3	DM28c, 3663, CL Brener, 4167, D8 (curvas em cinza)	SO3 (curvas em amarelo)	-	4167, DM28c (curvas em laranja)

As cepas representadas por cores indicam aquelas que foram agrupadas em mais de uma variante em cada ensaio.

Para validar a metodologia de genotipagem de *T. cruzi* desenvolvida neste estudo, amostras de sangue foram contaminadas artificialmente com diferentes cepas/clones de *T. cruzi*, na concentração de 10^3 parasitos /mL, e o DNA foi extraído a partir do sangue e do soro obtido destas amostras. As cepas/clones utilizadas foram: DM28c (TcI), Y (TcII), 3663 (TcIII), 4167 (TcIV) e CL Brener (TcVI). O DNA foi submetido a PCR HRM com os iniciadores P1/P2, P1/P4, P5/P3 e P5/P2.

A reação com os iniciadores P5/P3 gerou duas variantes. As cepas/clones foram agrupadas da mesma maneira para ambas as amostras (soro e sangue), ou seja, não apresentaram diferenças nas variantes, independente do tipo de amostra utilizada (Figura 25 A a D). O agrupamento deste ensaio corroborou com o resultado da PCR HRM com DNA de parasitos de cultura (Figura 24, E e F). As cepas/clones Y, 4167 e CL Brener se encontraram na mesma variante (verde), enquanto DM28c e 3663 em outra variante (azul). Com os iniciadores P1/P4 também foram observadas duas variantes: Y, 4167, CL Brener e 3663 (cinza) e, DM28c (amarela) para ambos os tipos de amostra, sangue e soro (Figura 25 E a H).

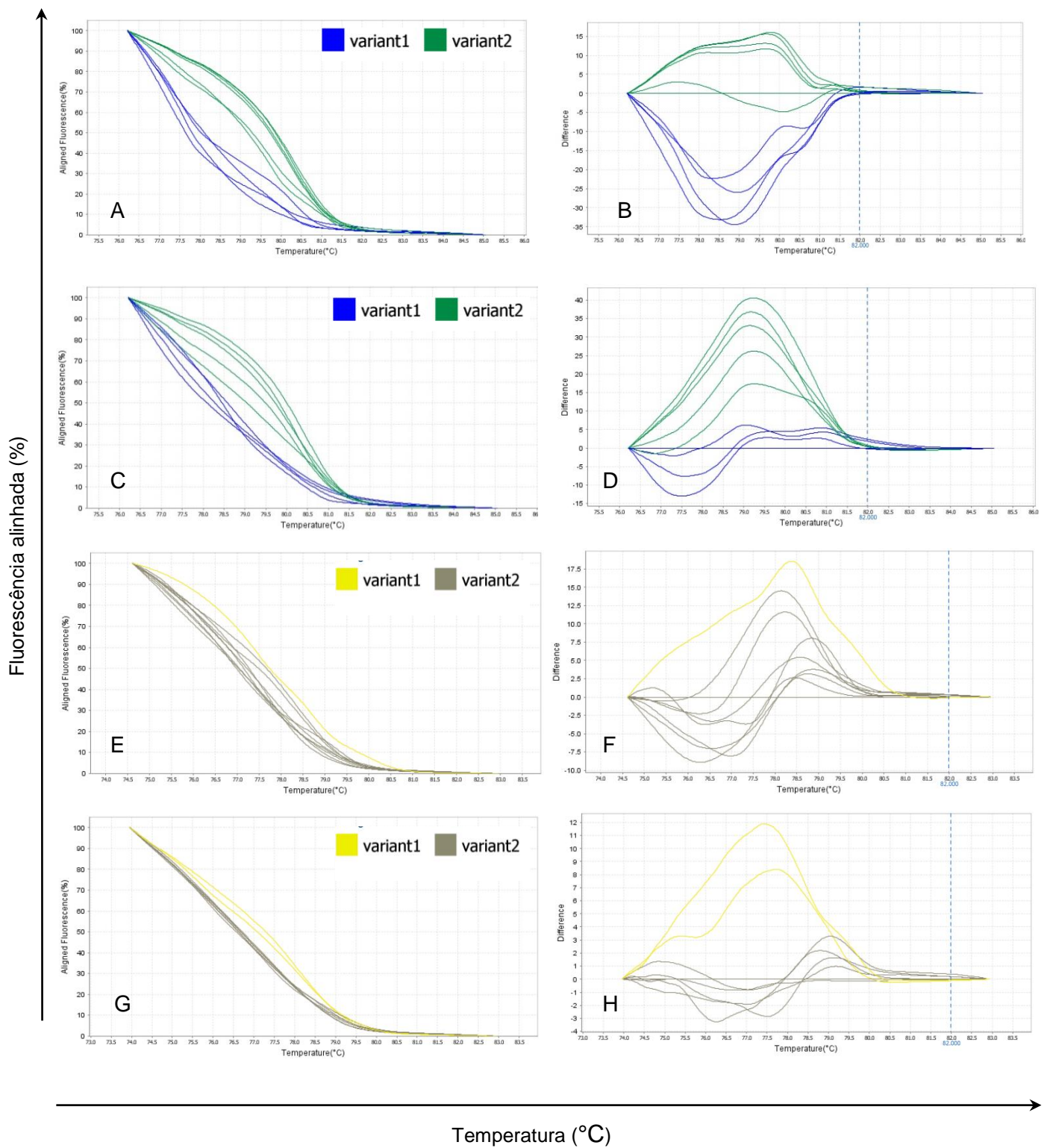


Figura 25. Ensaio por HRM com amostras de sangue e soro contaminadas artificialmente com cepas/clones de *T. cruzi*. (10^3 parasitos /mL): DM28c, Y, 4167, 3663, CL Brener. A e B - Amplificação com os iniciadores P5/P3 (seção 2) a partir de amostras de sangue; C e D - Amplificação com os iniciadores P5/P3 (seção 2) a partir de amostras de soro. E e F - Amplificação com os iniciadores P1/P4 (seção 1) a partir de amostras de sangue. G e H - Amplificação com os iniciadores P1/P4 (seção1) a partir de amostras de soro. A, C, E e G - Curva de dissociação normalizada e B, D, F e H - Gráfico das diferenças.

Os ensaios com os iniciadores P1/P2 e P5/P2 não apresentaram resultados satisfatórios, não geraram grupos semelhantes aos observados com amostras de cultura, uma vez que houve interferência da inespecificidade do iniciador P2 ao hibridizar com DNA humano.

Para realizar a validação com amostras clínicas, DNA proveniente de amostras de sangue de oito pacientes acometidos com doença de Chagas crônica, além de 10 amostras de cultura de *T. cruzi* DM28c, D8 e Colombiana (TcI), Y e PR1281 (TcII), 3663 (TcIII), 4167 (TcIV), LL014 e SO3 (TcV) e CL Brener (TcVI) foi submetido a PCR HRM padronizada. A reação com os iniciadores P5/P3 (seção 2) agrupou os pacientes em duas variantes (Figura 26, E e F), assim como foi observado com as amostras de epimastigotas de cultura das diferentes cepas/clones de *T. cruzi* (Figura 26, A e B). Os pacientes 1, 2, 4, 5 e 8 formaram a variante 1 (em azul), enquanto os pacientes 3, 6 e 7 a variante 2 (em verde).

A PCR HRM com os iniciadores P1/P4 (seção 1) gerou três variantes quando foi utilizado DNA de cultura de parasitos (Figura 26, C e D), e duas variantes para as amostras de pacientes, sendo apenas o paciente 3 isolado na variante 1 (cinza) e os demais na variante 2 (amarelo) (Figura 26, G e H). Os polimorfismos identificados nas variantes dos pacientes foram similares aos observados nas variantes de cultura de *T. cruzi* para ambas as amplificações dos iniciadores P1/P4 e P5/P3 (Apêndice C).

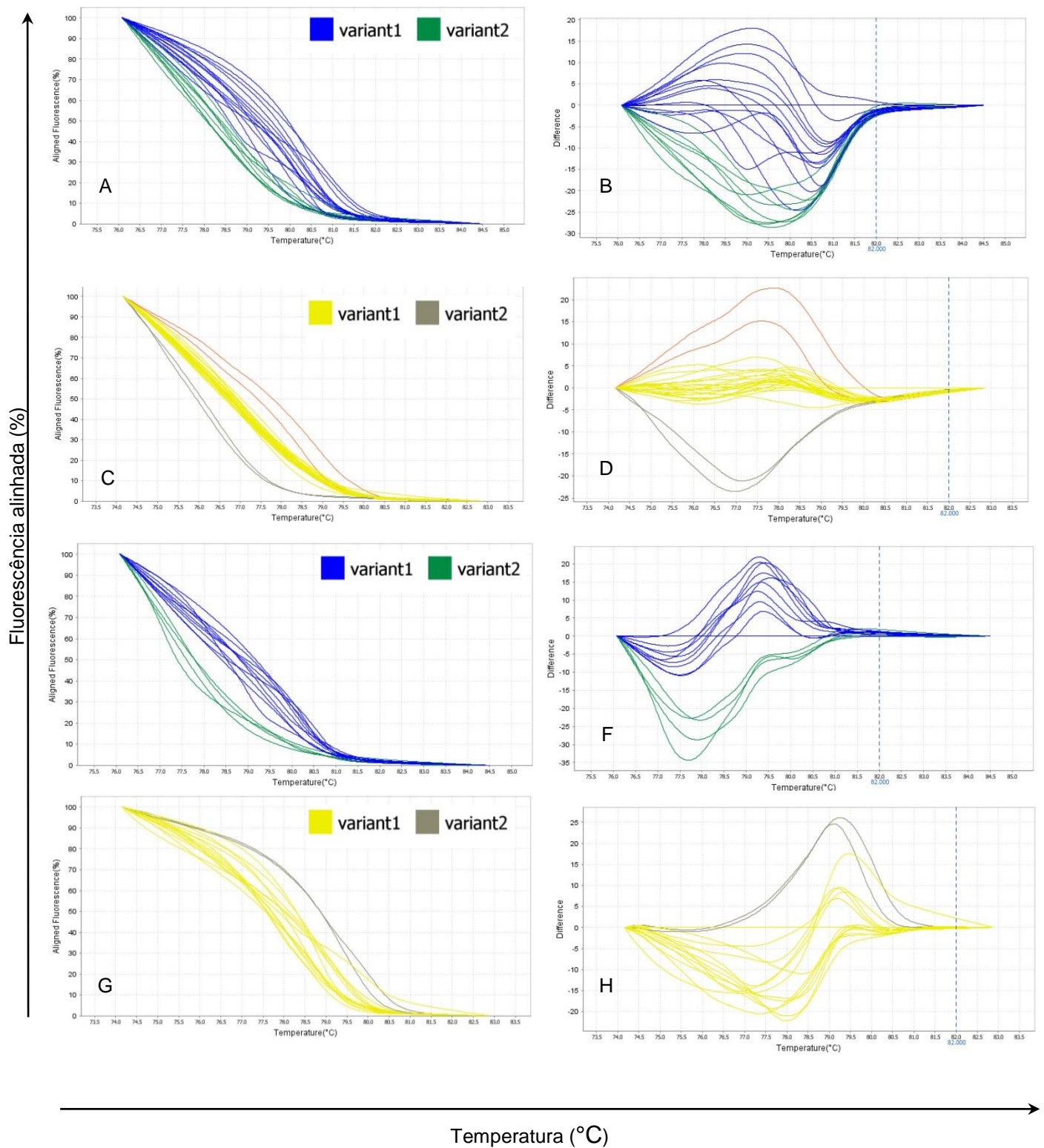


Figura 26 - Ensaio por HRM com amostras de sangue de pacientes acometidos pela Doença de Chagas e epimastigotas de cultura das seguintes cepas de *T. cruzi*: DM28c, D8 e Colombiana (TcI), Y e PR1281(TcII), 3663 (TcIII), 4167 (TcIV), LL014 e SO3 (TcV) e CL Brener (TcVI). A e B - Amplificação com os iniciadores P5/P3 (seção 2) a partir de amostras de cepas/clones de *T. cruzi*; C e D - Amplificação com os iniciadores P1/P4 (seção 1) a partir de amostras de cepas/clones de *T. cruzi*. E e F - Amplificação com os iniciadores P5/P3 (seção 2) a partir de amostras de sangue de pacientes acometidos pela doença de Chagas. G e H - Amplificação com os iniciadores P1/P4 (seção 1) a partir de amostras de sangue de pacientes acometidos pela doença de Chagas. A, C, E e G - Curva de dissociação normalizada e B, D, F e H - Gráfico das diferenças.

4.8 Construção das árvores filogenéticas a partir dos dados do ION Torrent

Um total de 4.600.012 sequências foi obtido com o sequenciamento por NGS em quatro corridas independentes (Tabela 10). Após a filtragem, a quantidade de sequências mapeadas foi em torno de 39,34% (1.797.183) e apresentaram um tamanho médio de 145 pb. Essas sequências foram utilizadas para o estudo de *K-mers*, assim como para o agrupamento das cepas/clones de *T. cruzi* (construção das árvores).

Após a edição e seleção, as sequências mapeadas foram submetidas a um processo de *clusterização*, com o intuito de avaliar a diversidade entre elas. A diminuição dos *clusters* formados foi proporcional à diminuição dos valores de identidade entre as sequências (99 % a 80 %). O cluster para as sequências com 99% de identidade correspondeu a um filtro estridente, pois a taxa de erro pode ser maior do que esse valor, ou seja, se a mesma sequência genômica for sequenciada mais de uma vez, a probabilidade de que apareça uma diferença, do que nenhuma, é bem maior. Pelo critério de 80 %, as diferenças de erro de sequenciamento foram pouco relevantes e levou em consideração a elevada variação genômica do alvo estudado.

Devido a taxa de erros do sequenciamento, o grau de divergência entre as cópias da família de TS associado à diferenças na quantidade de cópias (genes) de TS idênticas no genoma das cepas/clones de *T. cruzi* analisados, não foi possível estimar o número de cópias com as sequências geradas.

Em uma primeira análise para a classificação das DTUs, foram identificados os fragmentos com 20 nucleotídeos mais frequentes na composição das sequências de cada cepa/clone analisado. Foram empregados dois parâmetros para a construção das árvores, o fragmento com 20 nt e a seleção de *K-mers* com frequências entre 20 a 40%, os quais geraram árvores sugestivas para classificar as cepas/clones nas suas respectivas DTUs, baseadas na 5` UTR de TS de *T. cruzi*. Para a construção das árvores foi necessária a normalização de todos os *K-mers*, como descrito no item **3.11.2**. A Tabela 13 mostra a quantidade identificada de *K-mers*, de acordo com o valor de *delta*. Quanto menor o valor de *delta* maior o número de fragmentos, e vice-versa.

Tabela 13 – Quantidade de *K-mers* (delta)

	N
Normalização dos <i>K-mers</i>	1.049.005
<i>K-mers</i> delta \geq 2	178.558
<i>K-mers</i> delta \geq 3	106.985
<i>K-mers</i> delta \geq 5	77.069
<i>K-mers</i> delta \geq 10	51.718
<i>K-mers</i> delta \geq 20	29.981
<i>K-mers</i> delta \geq 50	11.252
<i>K-mers</i> delta \geq 100	4.008

As árvores foram construídas a partir de 1000 repetições dos dados com *K-mers* de 20 nucleotídeos. De maneira geral, independente dos valores de delta (\geq 2, 3, 5, 10, 20, 50 e 100), foi possível separar as DTUs. Foi observado que para alguns valores de delta, o *bootstrap* não atingiu 100 %, em alguns ramos críticos, porém sem afetar o resultado final. Quanto maior o delta, maior o poder discriminatório, pela grande variabilidade das sequências entre as amostras, porém com a geração de um menor número de dados. Todos os *bootstraps* para delta \geq 5 foram de 100 % (com 1000 replicatas), com exceção do ramo que separa DTU VIa e VIb das duas cepas CL Brener, para o qual o valor de *bootstrap* foi de 861, além do ramo que separa DTU III das demais, que apresentou o valor de 975. E finalmente, o ramo que separou *T. marinkellei* dos demais, com *bootstrap* de 807, possibilitou o seu isolamento em relação às DTUs de *T. cruzi*. Em geral, os valores de *bootstrap* gerados na construção da árvore possibilitaram discriminar as cepas/clones nas suas respectivas DTUs (Figura 27).

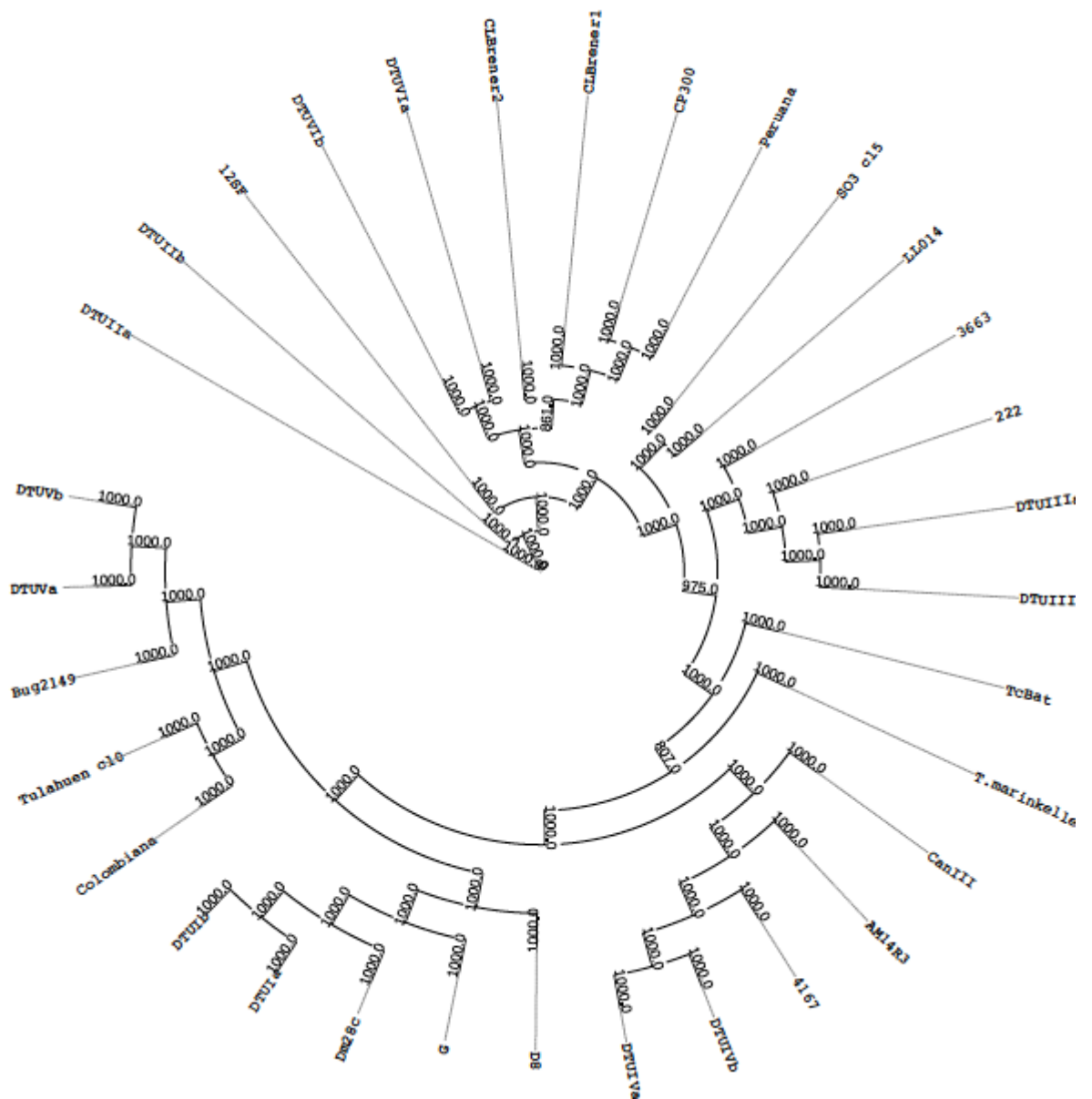


Figura 27 – Árvore filogenética das cepas/clones de *T. cruzi* construída a partir das sequências com do segmento 5' UTR de trans-sialidasas. Fragmentos com 20 nt e *K-mers* delta ≥ 5 . Ensaio realizado em 1000 replicatas.

5 DISCUSSÃO

Parte I: Avaliação do uso de soro para a detecção e quantificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* para o diagnóstico molecular da infecção

Embora o número de pacientes avaliado tenha sido pequeno ($n = 40$), os dados levam à uma discussão sobre a aplicação da PCR em Tempo Real em amostras de soro para o diagnóstico e quantificação de *T. cruzi*, considerando o monitoramento de pacientes acometidos pela doença de Chagas, especialmente em situações, para as quais, o soro representa a única amostra disponível.

Atualmente, o consenso Brasileiro em doença de Chagas recomenda o uso simultâneo de dois testes sorológicos para o diagnóstico da doença de Chagas crônica, como a hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e ensaios imunoenzimáticos (ELISA), baseados na detecção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* (MS 2005). Entretanto, globalmente, existe um número elevado de resultados sorológicos inconclusivos nos bancos de sangue, resultando em um aumento, não apenas, no descarte de bolsas de sangue, como também no risco de transmissão do parasito por transfusão com sangue contaminado (SCHMUNIS 2007; BASILE et al., 2011). Este mesmo consenso Brasileiro determina o uso da PCR para confirmar os testes sorológicos inconclusivos nos pacientes crônicos, o que resulta, assim, na coleta de uma nova amostra de sangue do paciente (MS 2005). Neste contexto, foi proposto investigar a possibilidade de realizar o diagnóstico molecular e a quantificação da carga parasitária, usando a mesma amostra de soro obtida para os testes sorológicos, tendo como base um estudo prévio que confirmou o uso de soro para a detecção de DNA de *T. cruzi* por PCR em neonatos (RUSSOMANDO et al., 1988). Não obstante, este trabalho corresponde ao primeiro relato sobre o uso de um ensaio de qPCR multiplex, capaz de detectar e quantificar *T. cruzi* a partir de amostras de soro.

No presente estudo, torna-se evidente a migração do DNA de *T. cruzi*, após a coagulação do sangue para o soro. Quando o sangue total foi artificialmente contaminado com DNA exógeno (Exo-IPC) ou com epimastigotas de *T. cruzi*, antes do isolamento do soro, ambos os DNAs puderam ser detectados pelo ensaio de qPCR multiplex em Tempo Real, em conjunto com a detecção de DNA humano de células nucleadas do sangue (RNase P). Como esperado, os valores mais elevados

de Ct observados no soro, comparados com as amostras de sangue e de parasitos de cultura, indicaram que apenas parte do DNA do parasito e de humano, migra para o soro após coagulação sanguínea. Apesar disso, a sensibilidade para a detecção de *T. cruzi* nos pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica, foi apenas ligeiramente mais baixa no soro (95 %) em relação ao sangue (97,5 %), e a mesma especificidade (100 %) foi observada para ambas as amostras, o que torna possível o uso de amostras de soro para a detecção de DNA de *T. cruzi* por qPCR (SCHIJMAN et al., 2011).

Através do uso de métodos sorológicos como padrão ouro, a sensibilidade clínica para ensaios de PCR convencional e em Tempo Real, apresenta grande variabilidade entre os distintos estudos (ÁVILA et al., 1993; FITZWATWER et al., 2008; RAMÍREZ et al., 2009; SCHIJMAN et al., 2011; DUFFY et al., 2013; GILBER et al., 2013). Adicionalmente, empregando o mesmo conjunto de iniciadores e sonda TaqMan, usado no presente estudo, direcionado para o alvo DNA nuclear satélite de *T. cruzi*, Duffy et al. (2013) relataram valores de sensibilidade variando de 60,3 – 100 %, para a detecção do parasito em amostras de sangue de pacientes procedentes de diferentes áreas geográficas (Venezuela e Argentina). Estes pacientes foram infectados por vias de transmissão distintas (infecção oral, crônicos e neonatos de mães portadoras da doença de Chagas crônica), e apresentaram diferentes valores para as medianas de carga parasitária (2,75 – 691,8 equivalentes de parasito/mL).

Por outro lado, Fitzwater e cols. (2008), alcançaram 60,1 %, 46,5 % e 40 % de sensibilidade, a partir de amostras de coágulo, camada leucocitária e sangue total, respectivamente, em um ensaio de PCR convencional para o kDNA do parasito. De fato, fatores múltiplos parecem influenciar estes resultados, tais como, os iniciadores usados (kDNA verso DNA satélite), o método de extração de DNA, reagentes da PCR, genótipo de *T. cruzi* (DTUs) e a carga parasitária. Seguindo a metodologia deste presente estudo, mesmo considerando baixas as cargas parasitárias estimadas, foram alcançados valores elevados e similares de sensibilidade para sangue e soro.

Nos dias de hoje, esforços estão sendo conduzidos para padronizar a qPCR em Tempo Real para a quantificação de *T. cruzi* em sangue (RAMIREZ et al., 2015). Seguindo as recomendações do workshop internacional promovido pela OPAS/OMS em 2011, Duffy e cols. (2013) relataram o desempenho analítico da qPCR multiplex para a quantificação do DNA satélite de *T. cruzi* em amostras de sangue. Os autores observaram uma faixa de detecção entre 1 e 6 log₁₀ eq. par./10 mL para um isolado

Tcl (Silvio X10) e 0,25 a 6 log₁₀ eq. par./10 mL para um isolado TcVI (CL Brener). Além disso, para o isolado CL Brener, foi observado um Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) de 0,6979 e 1,531 eq. par./mL, respectivamente. Neste presente estudo, usando o mesmo conjunto de iniciadores para o DNA nuclear satélite de *T. cruzi*, em conjunto ao gene humano RNase P, ao invés do Controle Interno de Amplificação (IAC), foi observada uma faixa de linearidade de detecção na ordem de 10⁵ a 0,5 eq. par./mL (Figura 7), para os DNAs extraídos de soro, sangue ou amostras de células de *T. cruzi* (CL Brener). Do mesmo modo que Duffy e cols. (2013), os resultados foram factíveis para quantificação da carga parasitária em pacientes acometidos pela doença de Chagas, que apresentam parasitemias moderadas.

Neste trabalho, a baixa carga parasitária encontrada nas amostras de sangue e soro reproduz os resultados observados em estudos recentes, quanto ao uso da qPCR em pacientes portadores da doença de Chagas crônica (DUFFY et al., 2009, 2013; MOREIRA et al., 2013). A mediana da carga parasitária em sangue (1,23 eq. par./mL) não foi estatisticamente diferente daquela verificada nas amostras de soro (1,12 eq. par./mL) (Figura 8), fato este que corrobora o uso de DNA extraído de soro para os ensaios de qPCR. Porém, comparando com o LOQ previamente determinado por Duffy e cols. (2013), alguns pacientes analisados no presente estudo, apresentaram cargas parasitárias abaixo do limite de quantificação, mas acima do limite de detecção.

Quando os pacientes apresentando manifestações clínicas distintas foram comparados (Figura 9), também não foram encontradas diferenças significativas entre as medianas de carga parasitária nos grupos avaliados, embora muitos pacientes com a forma cardíaca (FC) pareceram apresentar uma concentração mais alta de parasitos tanto em sangue quanto em soro. Neste estudo, houve uma limitação quanto ao número de pacientes analisados, em particular, para aqueles com a forma digestiva da doença (n = 4). Assim, para que possa investigar apropriadamente “carga parasitária” como um biomarcador para progressão e severidade da doença de Chagas, torna-se necessário um estudo robusto que reúna um grupo representativo de pacientes portadores das diferentes manifestações clínicas da doença.

Os avanços alcançados neste estudo sugerem o uso de amostras mantidas nos bancos de soro em estudos retrospectivos relacionados ao desenvolvimento da doença, bem como o monitoramento de pacientes sob tratamento. Em paralelo, para

validar este ensaio de diagnóstico molecular nos bancos de sangue, uma nova investigação deve ser incentivada, envolvendo um número consideravelmente maior de pacientes com doença de Chagas, especialmente aqueles indivíduos assintomáticos, que podem estar atuando como potenciais doadores de sangue mundialmente.

Parte II: Potencial de aplicação das 5' UTRs da família gênica de trans-sialidases para diferenciar entre os grupos populacionais de *Trypanosoma cruzi*

Desde a descoberta da doença de Chagas, a heterogeneidade das cepas de *T. cruzi* tem sido considerada um fator fundamental na evolução clínica da doença, uma vez que, juntamente com o genótipo do hospedeiro, está envolvida na dispersão do parasito para os diferentes tecidos, na fisiopatologia, eventual desfecho da infecção pelo parasito, susceptibilidade a drogas e na ampla diversidade regional da doença de Chagas (ANDRADE, 1974; ANDRADE et al., 1985; CHUENKOVA & PEREIRA 1995; ZHANG & TARLETON 1999; URBINA & DOCAMPO 2003; CAMPBELL et al., 2004; MACEDO et al., 2004; FREIRE-DE-LIMA et al., 2012). A associação entre as DTUs e a apresentação clínica da doença vem sendo proposta em estudos taxonômicos em *T. cruzi*, e no âmbito do diagnóstico molecular da doença de Chagas (DUFFY et al., 2009; LIARTE et al., 2009; RAMIREZ et al., 2010). Portanto, marcadores genéticos com maior poder de resolução em tipagem vêm sendo requeridos, uma vez que, a extensa diversidade fenotípica do parasito pode gerar complicações para a identificação de determinantes genéticos de patogênese e virulência (ZINGALES et al., 2012).

Os ensaios de PCR como ferramenta para o diagnóstico molecular da doença de Chagas, para os alvos mais frequentemente utilizados (kDNA e DNA Sat), não são capazes de classificar a cepa de *T. cruzi* diretamente de amostras clínicas. Como comentado, a identificação da cepa do parasito e até mesmo das diferentes linhagens que possam estar infectando um determinado paciente, torna-se relevante para o prognóstico da doença e para estudos epidemiológicos. Alguns estudos vêm otimizando a técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) para a detecção, quantificação e classificação da linhagem do parasito em seis DTUs (DUFFY et al., 2009; RAMIREZ et al., 2010; HAMILTON et al., 2011; HIGUERA et al., 2013; CURA et al., 2015). Nestes ensaios, o uso de corantes ou sondas que emitem fluorescência,

possibilita o aumento do poder de discriminação da técnica, além de gerar resultados mais rápidos e menos subjetivos, quando comparado aos ensaios de PCR convencional para mais de um marcador genômico, através de algoritmos (COSENTINO & AGÜERO 2012).

No presente trabalho, foram desenhados iniciadores para um segmento genômico de *T. cruzi* que contém parte da região 5' UTR de trans-sialidases e parte da sua região codificante com o objetivo de identificar sítios polimórficos entre diferentes cepas e clones representativos das seis DTUs, os quais possibilitem a caracterização molecular do parasito por ensaios de PCR convencional e PCR-HRM, diretamente de amostras de pacientes acometidos pela doença de Chagas.

O sequenciamento dos fragmentos de 200 pb amplificados (iniciadores P1/P2) de amostras de sangue humano contaminado artificialmente com parasitos de *T. cruzi*, demonstrou a hibridização do iniciador P2 com a sequência de DNA do cromossomo 11 humano, mesmo após a padronização da PCR convencional, testando diferentes temperaturas de anelamento. Portanto, foi necessário desenhar outro iniciador (P3) a uma distância aproximada de 23 nucleotídeos anterior a posição do iniciador P2, o que conseqüentemente gerou fragmentos menores com aproximadamente 144 pb (P1/P3).

Os ensaios de PCR com os iniciadores P1/P2 ou P1/P3 apresentaram a mesma sensibilidade analítica, variando entre 0,5 a 50 parasitos/ mL dependendo da DTU. Esta faixa de sensibilidade para a região 5' UTR de TS, parece ser adequada para o diagnóstico de pacientes crônicos do Brasil, os quais apresentam parasitemias baixas, uma vez que, a carga parasitária (mediana) observada em amostras de pacientes com doença de Chagas crônica do Brasil foi de aproximadamente 0,1 eq. parasitos/mL de sangue (SCHIJMAN et al., 2011; MOREIRA et al., 2013). Com a finalização do estudo BENEFIT (BENZnidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis), a quantificação de 284 amostras de pacientes crônicos cardiopatas, referentes ao pré-tratamento, revelaram medianas da carga parasitária para o Brasil, variando entre 0,095 a 290,490 eq. parasitos/ mL de sangue (dados não publicados).

A sensibilidade analítica para os iniciadores P1/P2 e P1/P3 foi, para algumas cepas e clones, menor que a sensibilidade alcançada para o alvo kDNA. Este resultado era esperado, conhecendo-se o elevado número de alvos para os iniciadores 121/122 (quatro blocos conservados por molécula de minicírculo do kDNA), perfazendo em torno de 20.000 a 40.000 cópias por genoma mitocondrial, ou

seja, 14 a 28,5 vezes maior que o número de cópias de TS presente no genoma de *T. cruzi* (~1400 cópias) (EL SAYED et al., 2005). Por outro lado, a variação da sensibilidade identificada para o alvo 5' UTR de TS, nas diferentes cepas, pode estar associada a diferenças no número de genes de TS entre as amostras analisadas. Pela Tabela 6, pode ser observado que cepas e clones representantes de TcI e TcVI apresentaram sensibilidades maiores (0,5 parasitos/ mL), o que corrobora os dados de Burgos e cols. (2013), os quais por qPCR quantificaram um total de 28 a 32 cópias de TS/ genoma haplóide entre as cepas representantes de TcI e, entre 1 a 48 cópias de TS/ genoma haplóide em cepas representantes de TcVI.

Os iniciadores P1/P2 e P1/P3 foram 100% específicos e amplificaram apenas DNA de *T. cruzi*, sem amplificar material genômico de *Toxoplasma gondii*, *Phytomonas sp.*, *Chritidia oncopelti*, *Chritidia fasciculata*, diferentes espécies de *Leishmania spp* e *T. rangeli*. Estes dados estão de acordo com as análises *in silico*, realizadas no início deste estudo para o desenho dos iniciadores para as 5' UTRs de TS de *T. cruzi*.

Quando aplicados os iniciadores P1/P3 na PCR convencional para inferir a sensibilidade/especificidade clínica com amostras de sangue de pacientes crônicos, com sorologia positiva e resultados positivos para a PCR-kDNA, foram reveladas sensibilidade de 83% e especificidade de 100% para a PCR-5' UTR de TS. Dados da literatura têm demonstrado diferentes níveis de sensibilidade da PCR para o uso clínico, variando entre 40% a 100%, e que esta variação pode ser influenciada por diferentes fatores, tais como: características epidemiológicas (diferentes áreas geográficas, população de estudo, linhagem do parasito), volume de sangue coletado (principalmente no caso de pacientes crônicos) e características intrínsecas do método (alvo selecionado, reagentes, concentrações e ciclagem térmica) (SCHIJMAN et al 2003; PIRON et al 2007; FITZWATER et al 2008; BRITTO, 2009).

Para o estudo composicional da região 5' UTR de TS, os produtos amplificados com P1/P2 das cepas e clone pertencentes aos grupos TcI (Colombiana, D8 e DM28c), TcII (Y), TcIII (3663), 4167 TcIV (4167), TcV (LL014) e TcVI (CL-Brener) foram clonados e sequenciados pelo método de Sanger. Os mesmos produtos também foram sequenciados pelo método de NGS (ION Torrent), porém neste caso, um número maior de cepas/clones foi adicionado. Um total de 479 sequências obtidas por Sanger apresentou identidade acima de 90% com genes de trans-sialidases (32 genes, entre mucinas e proteínas de superfície - gp85, gp82, gp 90). Estes genes estão distribuídos em diferentes cromossomos e classificados

em grupos de trans-sialidases tendo como base nos resíduos catalíticos das enzimas (SHENKMAN et al., 1994; FREITAS et al., 2011). No entanto, os 32 genes identificados foram classificados em três grupos de trans-sialidases (II, V e VIII), os quais possuem número maior de genes em relação aos grupos I, III, IV e VII, e estão envolvidos com a adesão/invasão celular e com a inibição das vias alternativa e clássica de ativação do complemento do hospedeiro (FREITAS et al., 2011). Neste trabalho de Tese, foi possível identificar nas diferentes cepas/clones, os genes de trans-sialidases mais frequentes encontrados no genoma do *T. cruzi*, após sequenciamento por Sanger.

Em paralelo, o resultado do ION Torrent contribuiu, inicialmente, para a identificação de fragmentos exclusivos para cada DTU. O estudo de kmers com 20 nt, para o primeiro sequenciamento, gerou uma lista com um total de 1371 fragmentos exclusivos. Estes fragmentos foram a base para a identificação das 31 sequências obtidas pelo Sanger, as quais apresentaram em sua composição os fragmentos exclusivos. Através do alinhamento das 31 sequências do segmento 5' UTR de TS, foi possível localizar os fragmentos exclusivos de cada DTU, assim como a presença de dois blocos conservados posicionados na região codificante de TS descrita pela anotação genômica. Desta forma, foi realizado um estudo composicional dos dinucleotídeos em 3 seções, delimitadas pelos blocos conservados. A análise composicional de dinucleotídeos é uma ferramenta bastante utilizada em estudos de assinatura genômica, distância evolucionária e nas análises de similaridades tanto em genes de eucariotos quanto de procariotos (BURGE et al., 1992; CARDON et al., 1994; KARLIN & BURGE 1995; KARLIN & MRÁZEK 1997; CAMPBELL et al., 1999; PEREIRA & BRANDÃO, 2013). A frequência de distribuição de dinucleotídeos foi utilizada neste estudo para identificar a variabilidade na composição das 31 sequências de TS, o que possibilitou identificar diferenças entre as cepas/clones de *T. cruzi*.

Na análise dos 16 dinucleotídeos por seções, foram observadas diferenças significativas na distribuição dos dinucleotídeos AC e CA na seção 1, os quais foram os mais frequentes em todas DTUs e, na seção 3, os dinucleotídeos AG, GA e GG foram os mais frequentes. Estudos observaram uma elevada frequência de CA na região regulatória (5' UTR) de diversos genes de *T. cruzi*, e demonstraram a relevância de CA como alvo específico para ligação de proteínas de cadeia simples envolvidas com a transcrição de genes (DUHAGON et al., 2001; 2011). Posteriormente, foi sugerido que a região rica em CA nas UTRs possua uma função

estratégica espécie-específica na regulação da expressão gênica (PASTRO et al., 2013).

Em cerca de 10% dos genes de *T. cruzi*, foram identificadas, nas respectivas UTRs, repetições acima de oito dinucleotídeos CA. Em relação à família de trans-sialidases, foi observada na região 5' UTR uma maior quantidade de CA na região 5' UTR, em torno de 61,5% (em 39 genes estudados) (BRANDÃO & JIANG 2009; PASTRO et al., 2013). A presença de CA (8 a 10 repetições) também foi identificada a partir do alinhamento das 31 sequências de 5' UTR de TS geradas no presente trabalho, e estas repetições foram localizadas anteriormente ao ATG dos genes de trans-sialidases. Foi observado, em *T. cruzi*, que os genes que contêm poliCA também apresentam uma frequência de GT em sua composição, que do ponto de vista da termodinâmica, favorece a geração de uma estrutura secundária em dupla fita devido a complementaridade com os dinucleotídeos CA presentes na região UTR (PASTRO et al., 2013). Similarmente, foi identificada neste trabalho, a presença de GT após o ATG em baixa frequência, principalmente na seção 2.

Ao analisar a distribuição de frequências de dinucleotídeos entre as DTUs, observou-se diferenças significativas de acordo com as seções da região 5' UTR de TS analisadas independentemente. Na seção 2, foram observadas diferenças entre TcVI e TcI e na seção 3, estas diferenças foram significativas entre TcIII / TcV e TcII / TcIV / TcVI. Em contra partida, apenas a seção 1, mesmo apresentando diferenças na distribuição de AA e CC entre as DTUs, estas não foram capazes de gerar possíveis agrupamentos. De modo geral, as variações identificadas no segmento 5' UTR de TS não foram suficientes em gerar assinaturas genômicas capazes de caracterizar as DTUs isoladamente. Por outro lado, possibilitaram o agrupamento de cepas/clones que apresentaram frequências semelhantes de dinucleotídeos.

A partir destas análises composicionais e pela identificação de blocos conservados na 5' UTR de TS, foram desenhados novos iniciadores para posterior aplicação na PCR HRM. Esta metodologia é capaz de identificar amostras mutantes a partir de variações nucleotídicas de até um único polimorfismo (VOSSEN et al., 2009; VORKAS et al., 2010; TRUJILLO et al., 2012). A análise por HRM pode ser realizada com fragmentos maiores que 600 pb, porém a técnica apresenta maior sensibilidade e melhor desempenho com a utilização de fragmentos menores, entre 150 a 250 pb, sendo que, para identificar variações específicas é recomendado o uso de fragmentos entre 50 a 100 pb (VOSSEN et al., 2009). Uma vez que, pequenas perturbações na sequência podem resultar em diferenças relativamente

grandes e facilmente mensuráveis no sinal de fluorescência a uma dada temperatura. Portanto, a redução do fragmento para análise por HRM apresenta um grande impacto na acurácia da técnica em discriminar e identificar o genótipo das amostras. Por outro lado, para a busca de diferenças em sequências desconhecidas, a melhor estratégia é a utilização de fragmentos mais longos (200 a 500 pb), para a aplicação no rastreamento de genes ou para determinação da variação dentro de uma população (FISHER et al., 2010; TAYLOR et al., 2010). Neste sentido, os iniciadores desenhados para as diferentes seções da 5'UTR de TS de *T. cruzi* geraram produtos com tamanhos entre 70 a 200 pb para os ensaios de PCR HRM (P1/P4 - produtos com aproximadamente 100 pb, P5/P3 - produtos com aproximadamente 70 pb; P5/P2 - produtos com aproximadamente 125 pb e P1/P2 - produtos com aproximadamente 200 pb).

Inicialmente, foram utilizados clones de sequências de TS obtidas a partir de produtos da PCR de colônia para cada cepa/clone de *T. cruzi* analisada, os quais continham em sua composição os fragmentos de 20 nt mais frequentes, exclusivos para cada DTU. Este primeiro ensaio foi realizado para avaliar a acurácia dos iniciadores em distinguir as sequências clonadas de TS de cada cepa/clone representante das seis DTUs. O ensaio com os iniciadores P1/P2 gerou 6 variantes, porém apenas distinguiu as 4 sequências da cepa LL014 (variantes: 1, 3, 5 e 6) e, separou Colombiana (variante 1) D8 (variante 2) e DM28c (variante 3) em três variantes distintas, devido ao conjunto de variações nucleotídicas (substituição e deleções) presentes na composição destas cepas/clones. Também foi capaz de agrupar em dois grupos, cada sequência de Y (variante 1 e 2), 3663 (variante 3 e 4) e 4167 (variante 1 e 3). Embora os conjuntos de iniciadores P5/P3 e P5/P2 tenham gerado 4 e 5 variantes, respectivamente, não conseguiram distinguir as sequências clonadas de TS das cepas/clones de *T. cruzi*, porém P5/P2 conseguiu separar as sequências clonadas de TcI em três distintas variantes, como observado em P1/P2. E a PCR HRM com os iniciadores P1/P4 formou apenas 3 variantes. Portanto, o ensaio com os iniciadores P1/P2 gerou fragmentos maiores (200 pb), os quais foram mais informativos e discriminativos para agrupar sequências com polimorfismos desconhecidos, como observado na literatura.

Em outro ensaio de PCR HRM utilizando os mesmos conjuntos de iniciadores, foram analisadas amostras de DNA genômico das diferentes cepas/clones de *T. cruzi*. Diferente do ensaio anterior com os produtos clonados de TS a análise de DNA genômico, por representar um conjunto da família multigênica de trans-

sialidades, constitui em uma amostra heterogênea com mais de 1400 cópias. Devido a esta complexidade, foi preciso aprimorar alguns parâmetros da técnica de PCR HRM, a fim de melhorar o desempenho e a especificidade da detecção da sequência alvo. No caso de amostras complexas, heterogêneas, o aquecimento e resfriamento na reação de PCR levam à geração de produtos com fitas duplas distintas (heteroduplex), os quais conseqüentemente alteram o perfil da curva de *melting* (REED et al., 2007; VOSSSEN et al., 2009). A formação de heteroduplex é comumente observada em estudos de identificação de mutação alélica ou da pesquisa de alelos heterozigóticos (ERALI et al., 2008; TINDALL et al., 2009; VOSSSEN et al., 2009; WITTEWER, 2009). Para melhorar a acurácia da técnica, tem sido proposta uma mistura proporcional dos produtos amplificados de uma amostra aleatória da reação, ou a adição de produtos com sequências conhecidas, às demais amostras amplificadas, a fim de identificar os heteroduplexes no gráfico das diferenças ou na curva de dissociação normalizada, sendo possível assim realizar uma análise correta das mutações (REED et al., 2007; VOSSSEN et al., 2009). Desta forma, as análises por HRM em amostras clínicas representam um desafio para a interpretação entre os “verdadeiros” alelos heterozigóticos e as variantes que não são de interesse clínico (heteroduplex) durante a pesquisa por mutações/variações nucleotídicas (ERALI et al., 2008).

Neste sentido, Mancini e cols. (2010) utilizaram a técnica de COLD-PCR (COamplification at Lower Denaturation temperature) (LI et al., 2008; ZUO et al., 2009) nos ensaios com HRM, visando o aumento da especificidade de detecção de mutantes sem a interferência dos heteroduplexes formados durante a reação. Inicialmente esta abordagem foi utilizada para ampliar a seletividade da PCR convencional em detectar as sequências mutantes minoritárias (até 1%) a partir de uma mistura de sequências selvagens e mutantes (PRITCHARD et al., 2010). O princípio desta abordagem é incluir na reação de PCR, a temperatura de desnaturação crítica (TC), a qual é menor que a temperatura de *melting* (TM) gerada para cada sequência de DNA, passo necessário para o aumento da eficiência de amplificação quando se trabalha com amostras heterogêneas (ZUO et al., 2009; MANCINI et al., 2010; PRITCHARD et al., 2010; PAGANINI et al., 2014).

Com o intuito de identificar os fragmentos exclusivos de cada DTU (fragmentos com 20 nt mais freqüentes) presentes nas sequências de TS, as amostras foram submetidas a PCR-HRM com a ciclagem da COLD-PCR. Antes da reação, foi necessário identificar a temperatura de desnaturação crítica (TC) dos

produtos gerados pelos iniciadores P1/P2, P1/P4, P5/P3 e P5/P2. Para todas as sequências clonadas de TS de *T. cruzi*, a TC foi 82,5 °C. Os iniciadores P1/P4 e P5/P3 amplificaram com maior eficiência em relação aos outros conjuntos de iniciadores, uma vez que, geraram produtos com tamanhos esperados de cerca de 90 pb e 100 pb, respectivamente, e menor formação de heteroduplexes. Embora não tenham seguido o mesmo perfil do formato da curva (gráfico de diferenças) gerado com as sequências clonadas de TS, foram capazes de agrupar com clareza as cepas/clones de *T. cruzi* ao comparar com os resultados de P1/P2 e P5/P2. As cepas/clones Y (TcII), CL Brener (TcVI), 4167 (TcIV) e LL014 (TcV) apresentaram sítios polimórficos semelhantes, possibilitando o agrupamento destas quando submetidas a PCR HRM com os iniciadores P1/P4 e P5/P3, assim como foi observado com DM28c e Colombiana (TcI). As cepas/clones D8 (TcI), PR1281 (TcII), 3663 (TcIII) e SO3 (TcV) agruparam de forma variável de acordo com os iniciadores utilizados na PCR HRM.

A baixa precisão da PCR HRM com os iniciadores P1/P2 e P5/P2 a partir de DNA genômico extraído de cepas/clones de *T. cruzi*, podem estar relacionada com o tamanho dos fragmentos e maior variabilidade composicional. Wittwer (2009) descreveram que para ensaios HRM com amostras heterogêneas, deve-se analisar produtos com tamanhos menores, uma vez que, produtos longos podem apresentar múltiplos domínios de *melting*, ocasionando alterações no formato das curvas (gráfico das diferenças). A PCR com os iniciadores P1/P2 e P5/P2 não geraram produtos tão longos (aproximadamente 200 e 125 pb, respectivamente) porém, os polimorfismos presentes nestes produtos podem ter contribuído para a formação de diferentes domínios, gerando curvas de dissociação e gráfico das diferenças, distintos, num mesmo ensaio, para uma mesma amostra. Enquanto que, os produtos menores gerados pelos iniciadores P1/P4 e P5/P3 apresentaram um número menor de sítios polimórficos, e assim, uma menor variação no formato da curva, em todas as repetições da PCR HRM.

A aplicação do ensaio de PCR HRM com a adaptação da ciclagem da COLD-PCR em amostras de sangue contaminadas artificialmente com parasitos de cinco cepas/clones de *T. cruzi* mostrou que o ensaio apresentou a mesma eficácia em identificar e classificar as amostras reconstituídas nas mesmas variantes que foram geradas pelo ensaio anterior com DNAs genômicos das cepas/clones do parasito. Interessantemente, o mesmo perfil foi gerado para os ensaios com DNA obtido de sangue contaminado artificialmente e DNA obtido de soro. A COLD-PCR HRM com

os iniciadores P1/P4 e P5/P3 apresentou perfis definidos, com duas variantes em cada, quando comparado aos iniciadores P1/P2 e P5/P2. Observamos no início do estudo que o iniciador P2 hibridiza com sequências de DNA humano (cromossomo 11), e por isso não gerou perfis com boa resolução nos ensaios de HRM para análise de amostras derivadas de sangue/soro humano.

A utilização da PCR HRM no diagnóstico molecular da infecção por *T. cruzi* representa um passo inovador e complementar, uma vez que possibilitaria a identificação da(s) cepa(s)/clone(s) do parasito presente(s) no sangue do paciente acometido, através da correlação entre os perfis de curvas gerados com amostras de pacientes e aqueles obtidos com amostras de um painel de cepas/clones de *T. cruzi*. Para isso, o presente trabalho utilizou cepas/clones, sequenciadas previamente, como amostras de referência na reação, para tentar associar os perfis gerados com amostras clínicas. Na validação da COLD-PCR HRM, foram utilizadas amostras (sangue em Guanidina-EDTA, GEB) de oito pacientes acometidos pela doença de Chagas que apresentaram cargas parasitárias entre 212,54 a 1.173,39 eq. par/ mL. Os gráficos de diferenças e as curvas de dissociação normalizadas, geradas pela amplificação com os iniciadores P1/P4 e P5/P3 a partir de amostras de pacientes, foram semelhantes aos gerados com amostras das cepas/clones submetidas ao mesmo experimento. Este resultado corroborou com a identificação dos mesmos sítios polimórficos observados nos alinhamentos das variantes de sequências de cada paciente e as respectivas variantes geradas com as cepas/clones de *T. cruzi*.

A identificação de variantes em DTU por HRM, como observados em estudos que empregam outros alvos para a tipagem de *T. cruzi*, não pôde ser observada no presente estudo com o alvo para a região 5' UTR de TS. Por outro lado, segundo Pablos & Osuna (2012), os marcadores moleculares utilizados para a tipagem de *T. cruzi* em DTUs não apresentam uma forte associação entre a linhagem gênica e os biotipos específicos do parasito.

Sabe-se que a resposta imunológica do hospedeiro possui um papel importante na determinação da evolução clínica do paciente, porém o parasito e, principalmente, sua complexidade genética influenciam, a resposta imune, uma vez que esta ocorre em resposta a estímulos antigênicos do parasito (MINOPRIO et al., 1989; CHUENKOVA & PEREIRA, 1995; TODESCHINI et al., 2002 a, b; FREIRE-DE-LIMA et al., 2012). Estudos mostram que as variações que ocorrem no contexto das famílias multigênicas poderiam determinar as características biológicas do *T. cruzi*,

assim como poderiam responder questões relacionadas a evolução das formas clínicas da doença de Chagas (PABLOS & OSUNA 2012).

Os ensaios de COLD-PCR HRM com os iniciadores P5/P3, que amplificam parte da uma porção da região codificante de trans-sialidases, agruparam as cepas/clones de TcVI, TcII, TcIV e TcV na variante 1 (azul), enquanto que as cepas/clones de TcI e TcIII foram agrupadas na variante 2 (verde). Os dados deste ensaio sugerem uma associação destes agrupamentos com o ciclo evolutivo do *T. cruzi*, porém, a cepa 4167 (TcIV) não formou grupo com TcI e TcIII. Por outro lado, pouco ainda se conhece sobre a diversidade genética e nichos ecológicos de TcIV, e algumas cepas desta DTU podem estar envolvidas com surtos orais da doença de Chagas (MARCILI et al., 2009b; BHATTACHARYYA et al., 2010; ZINGALES et al., 2012). Bhattacharyya e cols. (2010) verificaram o potencial uso das proteínas de superfície do *T. cruzi* em inferir uma possível associação com as DTUs do parasito, através do reconhecimento específico de seus epítomos por anticorpos presentes no soro de pacientes com sorologia reagente. Os autores observaram que variações peptídicas nestas proteínas separavam as DTUs em dois grupos: TcI/TcIII/TcIV e TcII/TcV/TcVI. Assim também foi observado em Burgos e cols. (2013), onde TcI apresentou uma relação próxima com TcIII e TcIV, através da correlação entre os genes que codificam proteínas de TS ativas e inativas, e sugerem uma relação próxima entre as DTUs: TcII, TcV e TcVI, uma vez que, estas apresentaram o mesmo grupo de genes que codificam proteínas inativas, com sequencias homólogas (conservadas) entre elas. Curiosamente, TcI está descrito em infecções humanas quanto em mamíferos silvestres, e TcIII pertence predominantemente à fauna silvestre, juntamente com TcIV, que está envolvido nos surtos de contaminação oral na Amazônia (YEO et al., 2005; MARCILI et al., 2009b; ZINGALES et al., 2012). As cepas de TcII, TcV e TcVI estão relacionadas preferencialmente com a infecção em humanos, estando associadas com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica e as síndromes de megacólon e esôfago (PRATA 2001; ZINGALES et al., 2012). Já o agrupamento obtido com os iniciadores P1/P4 (seção 1 do segmento da 5` UTR de TS) não demonstrou uma correlação definida entre as DTUs, uma vez que, esta seção da 5` UTR não apresentou em sua composição os fragmentos exclusivos de 20 nt para todas as DTUs, como observado na seção 2 (produtos gerados com P5/P3), na qual os fragmentos exclusivos de TcI, TcII, TcIII, TcIV e TcV foram localizados.

Os resultados utilizando amostras de sangue de pacientes acometidos pela doença de Chagas, com os iniciadores P5/P3, geraram as mesmas duas variantes observadas a partir de amostras de cultura. Sugerindo, que os DNAs de *T. cruzi* de cinco dos oito pacientes são semelhantes aos das cepas representantes de TcII, TcV ou TcVI, uma vez que apresentaram perfis de polimorfismos similares a variante 1 (azul). Enquanto os outros três pacientes geraram perfis relacionados as cepas de TcI ou TcIII (variante 2 – verde).

Os ensaios de COLD-PCR HRM com os iniciadores P5/P3, a partir de amostras de cultura e clínica, geraram agrupamentos entre as cepas/isolados a partir dos polimorfismos identificados entre as sequências de TS, os quais corroboram os dados da literatura sobre estudos de evolução populacional em *T. cruzi* (WESTENBERG et al., 2005 e 2006; FREITAS et al., 2006; ZINGALES et al., 2012).

A relação entre as DTUs também pôde ser inferida com a construção de árvores filogenéticas empregando os dados de NGS, possibilitando agrupar as cepas em seis DTUs. Na figura 27, as cepas representantes de TcII, TcV e TcVI se encontraram próximas entre elas com valores de altos de *bootstrap* (1000), e separadas de TcI e TcIV. Estes dados corroboram com o modelo de duas hibridizações do estudo da evolução dos grupos de *T. cruzi* proposto por Westenberg e cols. (2005), uma vez que TcV e TcVI são progênies heterozigóticas da hibridização de TcII com TcIII. Por outro lado, TcIII está próximo a TcIV e TcI pois, estas (TcIII e TcIV) são progênie homozigótica de TcI com TcII neste modelo de evolução e, apresentam maior semelhança genética com TcI (WESTENBERG et al., 2006; ZINGALES et al., 2012).

As cepas de *T. cruzi* (*Tcbat*) e *T. cruzi* *marinkellei* se encontraram isoladas das demais DTUs de *T. cruzi*, com valores de *bootstrap* entre 807 e 975. Nas árvores geradas com marcadores moleculares para os alvos citocromo b, 18S rRNA entre outros genes, *T. cruzi* *marinkellei* encontra-se distante de todas as DTUs, porém apresenta uma relação de filogenia com *T. cruzi* (GARCIA et al., 2012; PINTO et al., 2012; LIMA et al., 2015). Contudo, *T. cruzi* (*Tcbat*) está mais próximo a TcI em todas as árvores empregando diferentes marcadores (LIMA et al., 2015), o que corrobora com os dados do presente trabalho de tese.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A utilização de DNA obtido de soro de pacientes acometidos pela doença de Chagas crônica nos ensaios de PCR em Tempo Real, com iniciadores para o DNA nuclear satélite de *Trypanosoma cruzi*, possibilitou a detecção/quantificação do parasito em amostras com baixas parasitemias, revelando sensibilidade e especificidade similares aos ensaios realizados com amostras pareadas de sangue. Estes resultados sugerem o uso potencial do soro para o diagnóstico molecular da infecção por *T. cruzi* e sua aplicação em laboratórios de referência, responsáveis pela manutenção de sorotecas;
- ✓ A análise composicional das sequências da 5' UTR de trans-sialidases (TS) obtidas através do sequenciamento por Sanger, a partir de um painel de cepa/clones de *T. cruzi*, possibilitou a identificação de blocos conservados e sítios polimórficos, porém não permitiu gerar assinaturas genômicas associadas à caracterização dos parasitos nas respectivas DTUs;
- ✓ Os ensaios de COLD-PCR HRM com os iniciadores P5/P3 (seção 2 da 5' UTR de TS) não comportaram a caracterização dos parasitos em seis DTUs, porém foram eficientes em agrupar cepas/clones em duas variantes, sugerindo uma associação do agrupamento em variantes com os ciclos de transmissão das cepas/clones analisados e com a origem de evolução do *T. cruzi*;
- ✓ A metodologia de COLD-PCR HRM com os iniciadores P5/P3 (seção 2 da 5' UTR de TS), comparada aos demais conjuntos de iniciadores desenhados, foi a que demonstrou melhor desempenho para a classificação das cepas/clones em duas variantes, gerando resultados reprodutíveis nas análises realizadas com DNA genômico de parasitos cultivados, amostras de soro e sangue reconstituídas e amostras de pacientes acometidos com a doença de Chagas;
- ✓ O sequenciamento em larga escala, *New Generation Sequence* dos produtos amplificados com os iniciadores P1/P2 permitiu a caracterização das cepas/clones de *T. cruzi* em seis DTUs, que pôde ser visualizadas nas árvores geradas;

- ✓ O segmento do genoma de *T. cruzi* que contém a 5' UTR e parte da região codificante de trans-sialidases, demonstrou ser um potencial alvo molecular para ser explorado em ensaios de genotipagem do parasito diretamente de amostras clínicas e biológicas, acoplado ao sequenciamento *high throughput* dos produtos amplificados, como ferramenta complementar à pesquisa diagnóstica na doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- Agusti R, Couto AS, Campetella OE, Frasch AC, de Lederkremer RM. The trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* is anchored by two different lipids. *Glycobiology*. 1997; 7:731-735.
- Alberts B. et al. Manipulating Proteins, DNA, and RNA. In:____. *Molecular Biology of The Cell*. New York :Garland Science. 2002; 8:469-546.
- Andersson B. The *Trypanosoma cruzi* genome: conserved core genes and extremely variable surface molecule families. *Res Microbiol*. 2011; 162:619–625.
- Andrade SG. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop*. 1974; 3:65-121.
- Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Organ*. 1985; 63:721-726.
- Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94:549-562.
- Applied Biosystems, capturado de https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocuments/cms_094273.pdf em outubro 2015
- Araújo PR, Teixeira SM. Regulatory elements: involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106:257-66.
- Arruda MV, Reinach FC, Colli W, Zingales B. Sequence of 24S ribosomal RNA gene and characterization of a corresponding pseudogene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2012; 40:35-42.
- Arthofer W, Steiner F, Schlick-Steiner B. Rapid and cost-effective screening of newly identified microsatellite loci by high-resolution melting analysis. *Mol Genet Genomics*. 2011; 286:225-35.
- Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, Simpson L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparasion with serologic and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol*. 1993; 31(9):2421-2426.
- Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole

- blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol.* 1991; 48(2):211-21.
- Avila H, Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; 42:175-188.
 - Aymerich S, Goldenberg S. The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids. *Exp Parasitol.* 1989; 69:107-115.
 - Barea JA, Pardini MIMC, Ghushiken T. Extração de DNA de materiais de arquivos e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004; 26(4):274-281.
 - Barnabe C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: A multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology.* 2000; 120:513–526.
 - Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD. Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:7025-7028.
 - Basile L, Jansa JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, Seixas J, Van Gool T, Canavate C, Flores-Chavez M, Jackson Y, Chiodini PL, Albajar-Vinas P. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Euro Surveill.* 2011; 16(37):19968.
 - Bastrenta B, Bosseno MF, Barnabe ÂC, Tibayrenc M, Brenière SF. Restriction fragment length polymorphism of 195 bp repeated satellite DNA of *Trypanosoma cruzi* supports the existence of two phylogenetic groups. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94:323-328.
 - Benz C, Nilsson D, Andersson B, Clayton C, Guilbride DL. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005; 143(2):125–134.
 - Bhattacharyya T, Brooks J, Yeo M, Carrasco HJ, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA. Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. *Int J Parasitol.* 2010; 40:921–928.
 - Boczko J, Tar M, Melman A, Jelicks LA, Wittner M, Factor SM, Zhao D, Hafron J, Weiss LM, Tanowitz HB, Christ GJ. *Trypanosoma cruzi* infection induced changes

in the innervations, structure and function of the murine bladder. *J Urol.* 2005; 173:1784-1788.

- Bogliolo AR, Lauria-Pires L, Gibson WC. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop.* 1996; 61:31–40.
- Branche C, Ochaya S, Aslund L, Andersson B. Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; 147:30-38.
- Brandão A. The untranslated regions of genes from *Trypanosoma cruzi*: perspectives for functional characterization of strains and isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101:775–777.
- Brandão A. Trypanosomatid EST: a neglected information resource regarding flagellated protozoa?. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103:622–626.
- Brandão A, Fernandes O. *Trypanosoma cruzi*: Mutations in the 3' untranslated region of calmodulin gene are specific for lineages *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, and the Zymodeme III isolates. *Exp Parasitol.* 2006; 112:247-52.
- Brandão A, Jiang T. The composition of untranslated regions in *Trypanosoma cruzi* genes. *Parasitol Int.* 2009; 58:215–219.
- Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol.* 1999; 104:219–232.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 2001; 31:1218-1226.
- Brisse S, Henriksson J, Barnabé C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol.* 2003; 2:173-183.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; 111:95-105.
- Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Pereira JB, Coura JR, Morel CM, Wincker P. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of

kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol.* 1995; 81:462–471.

- Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993; 88(1):171-172.
- Britto C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macêdo V, Fernandes O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96:823-826.
- Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:122–135.
- Britto C, Cardoso MA, Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, Santoro A, Pirmez C, Morel CM, Wincker P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology.* 1995; 110:241-247.
- Broutin H, Tarrieu F, Tibayrenc M, Oury B, Barnabé C. Phylogenetic analysis of the glucose-6-phosphate isomerase gene in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 2006; 113:1–7.
- Burge C, Campbell AM, Karlin S. Over- and under-representation of short oligonucleotides in DNA sequences. *Proc of the Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89:1358–1362.
- Burgos JM, Risso MG, Brenière SF, Barnabé C, Campetella O, Leguizamón MS. Differential distribution of genes encoding the virulence factor trans-sialidase along *Trypanosoma cruzi* Discrete typing units. *PLoS ONE.* 2013; 8(3).
- Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, Cura C, Bruses B, Favalaro L, Leguizamon MS, Lucero RH, Laguens R, Levin MJ, Favalaro R, Schijman AG.. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 2010; 51:485–495.
- Burgos, JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, Piccinali R, Freitas JM, Levin MJ, Macchi L, Macedo AM, Freilij H, Schijman AG. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol.* 2007; 37:1319–1327.

- Campbell A, Mrázek J, Karlin S. Genome signature comparisons among prokaryote, plasmid, and mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad of Sci U S A*. 1999; 96:9184–9.
- Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR. The determinants of Chagas disease: Connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med*. 2004; 4:549-562.
- Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?. *Microbes Infect*. 2003; 5(13):1231–1240.
- Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?. *Microbes Infect*. 2003; 5(13):1231–1240.
- Campos PC, Bartholomeu DC, DaRocha WD, Cerqueira GC, Teixeira SM. Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2008; 38:1383–1389.
- Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortés A, Levin MJ, González A, Degraeve W, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez JL, Alonso C, Requena JM, Silveira LF. Molecular Karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol Biochem Parasitol*. 1995; 71:273-278.
- Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE, Schijman AG. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol*. 2008; 38(13):1533-1543.
- Cardon LR, Burge C, Clayton DA, Karlin S. Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:3799–803.
- Carrasco HJ, Frame IA, Valente SA, Miles MA. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 54(4):418–424.
- Castro C, Craig SP, Castañeda M. Genomic organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1981; 4:273-282.
- Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PLoS ONE*. 2014; 9(2):e88845.
- Chapman MD, Baggaley RC, Godfrey-Fausset PF, Malpas TJ, White G, Canese J, Miles MA. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *J Protozool*. 1984; 31(3):482–486.
- Chuenkova M, Pereira ME. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: enhancement of virulence in a murine model of Chagas' disease. *J Exp Med*. 1995; 181:1693–1703.

- Clark CG, Pung OJ. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; 66:175–179.
- Clayton, CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J*. 2002; 21(8):1881–1888.
- Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*. 2003; 300(5617): 286–290.
- Corral RS, Orn A, Freilij HL, Bergman T, Grinstein S. Purification and characterization of an 80-Kilodalton *Trypanosoma cruzi* urinary antigen. *J Clin Microbiol*. 1989; 27(1):141-151.
- Cosentino RO, Agüero F. A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(7):e1777.
- Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102:113–22.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*. 2004; 14(6):1188-1190.
- Cross GA, Takle GB. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. 1993; 47:385–411.
- Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal MV, Kjos S, Gurgel-Gonçalves R, Blanchet D, De Pablos LM, Tomasini N, da Silva A, Russomando G, Cuba CA, Aznar C, Abate T, Levin MJ, Osuna A, Gürtler RE, Diosque P, Solari A, Triana-Chávez O, Schijman AG. *Trypanosoma cruzi* I genotypes indifferent geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the spliced leader genes. *Int J Parasitol*. 2010; 40:1599–1607.
- Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, Jimenez-Coello M, Calabuig E, Gimenez MJ, Valencia Ayala E, Kjos SA, Santalla J, Mahaney SM, Cayo NM, Nagel C, Barcán L, Málaga Machaca ES, Acosta Viana KY, Brutus L, Ocampo SB, Aznar C, Cuba Cuba CA, Gürtler RE, Ramsey JM, Ribeiro I, VandeBerg JL, Yadon ZE, Osuna A, Schijman AG. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9:e0003765.
- D'Avila DA, Macedo AM, Valadares HM, Gontijo ED, de Castro AM, Machado CR, Chiari E, Galvão LM. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J Clin Microbiol*. 2010; 47:1718–1725.

- De Oliveira Ramos Pereira L, Brandão A. An analysis of trypanosomatids kDNA minicircle by absolute dinucleotide frequency. *Parasitol Int.* 2013; 62:397–403.
- De Winne K, Büscher P, Luquetti AO, Tavares SB, Oliveira RA, Solari A, Zulantay I, Apt W, Diosque P, Monje Rumi M, Gironès N, Fresno M, Lopez-Velez R, Perez-Molina JA, Monge-Maillo B, Garcia L, Deborggraeve S. The *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA OligoC-Tes T and *Trypanosoma cruzi* Kinetoplast DNA OligoC-Tes T for diagnosis of Chagas disease: A Multi-cohort comparative evaluation study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(1):e2633.
- Degraeve W, Fragoso SP, Britto C, van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MA, Mueller RU, Simpson L, Morel CM. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1988; 27:63-70.
- Desquesnes M, Dávila AM. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet Parasitol.* 2002; 109:213-231.
- Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98:1-12.
- Dias, JCP. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006; 28:83–4.
- Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, Bootsma HJ, Willems RJ, Urwin R, Maiden MC. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:14–23.
- Douglas KT, Bryce RA, Neres J. Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease. *Drug Discov Today.* 2008;13:110-7.
- Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3(4):e419.
- Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, Bello ZD, Velazquez E, Muñoz-Calderon A, Juiz NA, Basile J, Garcia L, Riarte A, Nasser JR, Ocampo SB, Yadon ZE, Torrico F, de Noya BA, Ribeiro I, Schijman AG. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(1):e2000.

- Duhagon MA, Dallagiovanna B, Garat B. Unusual features of poly[dT-dG].[dC-dA] stretches in CDS-flanking regions of *Trypanosoma cruzi* genome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 287:98-103.
- Duhagon MA, Smircich P, Forteza D, Naya H, Williams N, Garat B. Comparative genomic analysis of dinucleotide repeats in Trityps. *Gene.* 2011; 487:29–37.
- Elias MC, Vargas NS, Zingales B, Schenkman S. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 129:1–9.
- Elias MC, Vargas NS, Tomazi L, Pedroso A, Zingales B, Schenkman S, Briones MR. Comparative analysis of genomic sequences suggests that *Trypanosoma cruzi* CL Brener contains two sets of non intercalated repeats of satellite DNA that correspond to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II types. *Mol Biochem Parasitol.* 2005; 140:221-227.
- Dupin N, Buffet M, Marcelin AG, Lamotte C, Gorin I, Ait-Arkoub Z, Tréluyer JM, Bui P, Calvez V, Peytavin G. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV- infected patients with lipodystrophy. *AIDS.* 2002; 16(18):2419-2424.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.* 2005; 309:409–415.
- Enright MC, Spratt BG, Kalia A, Cross JH, Bessen DE. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone. *Infect Immun.* 2001; 69:2416–2427.
- Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol.* 2008; 85:50–58.

- Egima CM, Briones MR, Freitas Júnior LH, Schenkman RP, Uemura H, Schenkman S. Organization of trans-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1996; 77:115-125.
- Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. Acta Trop. 2009; 110:15–21.
- Farrar JS, Reed GH, Wittwer CT. High resolution melting curve analysis for molecular diagnostics. In: Patrinos GP, Ansorge W, editors. Molecular Diagnostics. 2009; 2nd Ed.: Elsevier, in press.
- Fernandes JV, Meissner RV, Medeiros Fernandes TAA, Da Rocha LRM, Cabral MC, Villa, LL. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. J Bras Patol Med Lab. 2004; 40(3):141-146.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exons and ribosomal RNA sequence. Am J Trop Med Hyg. 1998; 58(6):807-811.
- Ferreira AW, Ávila SLM. Doença de Chagas. In: ____ . Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 22. p. 241-249.
- Fisher C, Meng R, Bizouarn F, Scott R. High Resolution Melt Parameter Considerations for Optimal Data Resolution. Bio-Rad Bulletin. 2010; 6009.
- Fitzwater S, Calderon M, Lafuente C, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Verastegui M, Gilman RH, Bern C; Chagas Disease Working Group in Peru and Bolivia. Polymerase chain reaction for chronic *Trypanosoma cruzi* infection yields higher sensitivity in blood clot than buffy coat or whole blood specimens. Am J Trop Med Hyg. 2008; 79(5):768–70.
- Flusberg BA, Webster DR, Lee JH, Travers KJ, Olivares EC, Clark TA, Korlach J, Turner SW. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. Nat Methods. 2010; 7(6):461–465.
- Franzén O, Ochaya S, Sherwood E, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA, Andersson B. Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with T. cruzi VI CL Brener. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(3):e984.

- Frasch AC. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 2000; 16:282–286.
- Freire-de-Lima L, Oliveira IA, Neves JL, Penha LL, Alisson-Silva F, Dias WB, Todeschini AR. Sialic acid: a sweet swing between mammalian host and *Trypanosoma cruzi*. *Front Immunol*. 2012; 3:356.
- Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SD. FREITAS, J. M. et al. Ancestral genomes, sex, and population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*. 2006; 2:226-235.
- Freitas LM, dos Santos SL, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA, Rodrigues TS, Gazzinelli RT, Teixeira SM, Fujiwara RT, Bartholomeu DC. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS One*. 2011; 6(10):e25914.
- García L, Ortiz S, Osorio G, Torrico MC, Torrico F, Solari A. Phylogenetic analysis of Bolivian bat trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* based on Cytochrome b sequence and minicircle analyses. *PLoS One*. 2012;7(5):e36578.
- Gibson WC, Miles MA. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J*. 1986; 5:1299-1305.
- Gilber SR, Alban SM, Gobor L, Bescrovaine Jde O, Myiazaki MI, Thomaz-Soccol V. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013; 46:310–315.
- Gonzalez A, Prediger E, Huecas M, Nogueira N, Lizardi P. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81(11):3356–3360.
- Guhl F, Ramírez J. *Trypanosoma cruzi* diversity: towards the need of genetic subdivision?. *Acta Trop*. 2011; 119:1–4.
- Hall BF, Joiner KA. Developmentally-regulated virulence factors of *Trypanosoma cruzi* and their relationship to evasion of host defences. *J Eukaryot Microbiol*. 1993; 40:207–213.
- Hamilton PB, Lewis MD, Cruickshank C, Gaunt MW, Yeo M, Llewellyn MS, Valente SA, Maia da Silva F, Stevens JR, Miles MA, Teixeira MM. Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding. *Infect Genet Evol*. 2011; 11:44–51.

- Hernández R, Rios P, Valdés AM, Piñero D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; 41:207-212.
- Herrera C, Barges MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, Guhl F. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol.* 2007; 7:535–539.
- Herrera C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Montilla M, Adolfo Vallejo G, Barges MD. Genetic Variability and Phylogenetic relationships within *Trypanosoma cruzi* I isolated in Colombia based on Miniexon Gene Sequences. *J Parasitol Res.* 2009; ID 897364.
- Helm JR, Wilson ME, Donelson JE. Different trans RNA splicing events in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2008; 159:134-137.
- Higuchi ML. Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1997; 39:53-60.
- Higuchi ML, De Brito T, Martins Reis M, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol.* 1993; 2:101-106.
- Higuera SL, Guhl F, Ramírez JD. Identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) through the implementation of a high-resolution melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors.* 2013; 6:112.
- Hummel HS, Gillespie RD, Swindle J. Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing. *J Biol Chem.* 2000; 275(45):35522–35531.
- lenne S, Pedroso A, Carmona E Ferreira R, Briones MR, Zingales B. Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. *Infect Genet Evol.* 2010; 10:601–606.
- Ihle MA, Fassunke J, König K, Grünewald I, Schlaak M, Kreuzberg N, Tietze L, Schildhaus HU, Büttner R, Merkelbach-Bruse S. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer.* 2014; 14:13.
- Isken O, Maquat LE. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.* 2007; 21:1833–1856.

- Jansen RP. mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:247-256.
- Junqueira AC, Degraive W, Brandão A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends Parasitol.* 2005; 21(6):270-272.
- Karlin S, Burge C. Dinucleotide relative abundance extremes: a genomic signature. *Trends Genet.* 1995; 11:283–90.
- Karlin S, Mrázek J. Compositional differences within and between eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:10227–32.
- Klingbeil MM, Englund PT. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(13):4333-4334.
- Kolev NG, Franklin JB, Carmi S, Shi H, Michaeli S, Tschudi C. The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. *PLoS Pathog.* 2010; 6:e1001090.
- Kooter JM, Borst P. Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes. *Nucleic Acids Res.* 1984; 12(24):9457–9472.
- Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2006; 6:295.
- Lander ES, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409:860–921.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, Mcwilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007; 23:2947–8.
- Lauthier JJ, Tomasini N, Barnabé C, Rumi MM, D'Amato AM, Ragone PG, Yeo M, Lewis MD, Llewellyn MS, Basombrío MA, Miles MA, Tibayrenc M, Diosque P. Candidate targets for Multilocus Sequence Typing of *Trypanosoma cruzi*: Validation using parasite stocks from the Chaco Region and a set of reference strains. *Infect Genet Evol.* 2012; 12:350–358.
- LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.* 1993; 7:996–1007.
- Leon W, Fouts DL, Manning J. Sequence arrangement of 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res.* 1978; 5:491-504.

- Lewis MD, Llewellyn MS, Gaunt MW, Yeo M, Carrasco HJ, Miles MA. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *Int J Parasitol.* 2009; 39:1305–17.
- Lewis JD, Izaurralde E. The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur J Biochem.* 1997; 247:461–469.
- Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Acosta N, Gaunt MW, Miles MA. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(10):e1363.
- Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos GM. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat. Med.* 2008; 14:579–84.
- Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell.* 2003; 2:830-840.
- Liarte DB, Murta SM, Steindel M, Romanha AJ. *Trypanosoma cruzi*: multiplex PCR to detect and classify strains according to groups I and II. *Exp Parasitol.* 2009; 123:283–91.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 2015, 151:166-77.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:251364.
- Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, Torrico F, Diosque P, Valente V, Valente SA, Gaunt MW. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5):e1000410.
- Lunardelli A, Borges FP, Mello KF, Zeferino ASA. Soroprevalência da doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. *Rev Bras Anal Clin.* 2007; 39:139–41.
- Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In:____. Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. (Org). *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas.* 2. ed. Guanabara Koogan. 2000; 17:344-378.

- Macedo AM, Pimenta JR, Aguiar RS, Melo AI, Chiari E, Zingales B, Pena SD, Oliveira RP. Usefulness of Microsatellite Typing in Population Genetic Studies of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96:407-413.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99:1-12.
- Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98:7396-7401.
- Machado CA, Ayala FJ. Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 2002; 121:33-47.
- Mancini I, Santucci C, Sestini R, Simi L, Pratesi N, Cianchi F, Valanzano R, Pinzani P, Orlando C. The use of COLD-PCR and high-resolution melting analysis improves the limit of detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer. J Mol Diagn. 2010; 12:705-11.
- Marcet PL, Duffy T, Cardinal MV, Burgos JM, Lauricella MA, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE, Schijman AG. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. Parasitology. 2006; 132:57-65.
- Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira AC, Souza AI, da Rosa JA, Campaner M, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA, Teixeira MM. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. Infect Genet Evol. 2009; 9:1265-1274.
- Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, Naiff RD, Campaner M, Coura JR, Camargo EP, Miles MA, Teixeira MM. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. Int J Parasitol. 2009; 39:615-623.
- Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, Heiges M, Craven SH, Rosenberg CS, Collins MH, Sette A, Postan M, Tarleton RL. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant transsialidase epitopes. PLoS Pathog. 2006; 2(8):e77.

- Martínez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K, Myler PJ. Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell*. 2004; 3(2): 506-517.
- Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*. 2003; 11:1291-1299.
- Martins C, Baptista CS, lenne S, Cerqueira GC, Bartholomeu DC, Zingales B. Genomic organization and transcription analysis of the 195-bp satellite DNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2008; 160:60–64.
- Matthews KR, Tschudi C, Ullu E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev*. 1994; 8:491–501.
- McDaniel JP, Dvorak JA. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 57:213-222.
- McKinney JT, Nay LM, De Koeyer D, Reed GH, Wall M, Palais RA, Jarret RL, Wittwer CT. Mutation scanning and genotyping in plants by high resolution DNA melting. In: Meksem K, Kahl G, editors. *The handbook of plant mutagenesis and mutant screening*. 2009. Malden: Wiley-Blackwell-VCH, in press.
- Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H. Prospective genomic characterization of the german enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One*. 2011; 6(7):e22751.
- Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesqui Odontol Bras*. 2001; 15(4):314-319.
- Messenger LA, Yeo M, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA. Molecular genotyping of *Trypanosoma cruzi* for lineage assignment and population genetics. *Methods Mol Biol*. 2015; 1201:297–337.
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*. 2002; 3(3):REVIEWS0004.
- Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978; 272:819-821.

- Miles MA, Cedillos RA, Póvoa MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease?. *Lancet*. 1981; 1(8234):1338–1340.
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*. 2009; 136:1509–1528.
- Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol. Rev.* 1989; 112:183–207.
- Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MF, Lima-Ferreira C, Guhl F, Sosa-Estani S, Marin-Neto JA, Morillo CA, Britto C. 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 Trop.* 2013; 125:23–31.
- Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77(11):6810-6814.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(7):1477-1482.
- MS. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde-Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38:3.
- MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Resultado da Avaliação dos “kits” para diagnóstico de doença de Chagas. Brasília; 2006. (Nota Técnica N° 03/06, CGLAB/CGDT/DEVEP/SVS/MS). (Available from: http://www.biosys.com.br/data/jpf_article/12/file/avaliacaodoskitsdedoencadechagas.pdf).
- Murthy VK, Dibbern KM, Campbell DA. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Mol Cell Probes.* 1992; 6:237-243.
- Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature.* 2010; 463:457–463.

- Nilsson D, Gunasekera K, Mani J, Osteras M, Farinelli L, Baerlocher L, Roditi I, Ochsenreiter T. Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. PLoS Pathog. 2010; 6:e1001037.
- Nunes LR, De Carvalho MR, Buck GA. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. Mol Biochem Parasitol. 1997; 86:211-24.
- Ocaña-Mayorga S, Llewellyn MS, Costales JA, Miles MA, Grijalva MJ. Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Southern Ecuador. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(12):e915.
- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SDJ. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95:3776-3780.
- Oliveira RP, Melo AI, Macedo AM, Chiari E, Pena SD. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94:65-70.
- Pablos LM, Osuna A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. Infect Immun. 2012; 80:2258–64.
- Paganini I, Mancini I, Baroncelli M, Arena G, Gensini F, Papi L, Sestini R. Application of COLD-PCR for improved detection of NF2 mosaic mutations. J Mol Diagn. 2014; 16:393–9.
- Parsons M, Nelson RG, Watkins KP, Agabian N. Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. Cell. 1984; 38(1):309–316.
- Pastro L, Smircich P, Pérez-Díaz L, Duhagon M, Garat B. Implication of CA repeated tracts on post-transcriptional regulation in *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol. 2013; 134:511–518.
- Peña VH, Fernández GJ, Gómez-Palacio AM, Mejía-Jaramillo AM, Cantillo O, Triana-Chávez O. High-resolution melting (HRM) of the cytochrome B gene: a powerful approach to identify blood-meal sources in Chagas disease Vectors. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(2):e1530.
- Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S. Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. Gene. 2001; 276:73-81.
- Picka MC, Meira DA, de Carvalho TB, Peresi E, Marcondes-Machado J. Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for Chagas disease. Braz J Infect Dis. 2007; 11:226–233.

- Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol.* 2012; 12:1328–1332.
- Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, Gómez i Prat J, Portús M, Sauleda S. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 2007; 103:195–200.
- Pollevick GD, Affranchino JL, Frasch AC, Sánchez DO. The complete sequence of a shed acute-phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1991; 47:247–250.
- Porcile PE, Santos MR, Souza RT, Verbisck NV, Brandão A, Urmenyi T, Silva R, Rondinelli E, Lorenzi H, Levin MJ, Degraeve W, Franco da Silveira J. A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. *Gene.* 2003; 308:53-65.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet infect Dis.* 2001; 1(2):92-100.
- Preußner C, Jaé N, Bindereif A. mRNA splicing in trypanosomes. *Int J Med Microbiol.* 2012; 302:221–4.
- Price EP, Smith H, Huygens F, Giffard PM. High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73:3431-3436.
- Pritchard CC, Akagi L, Reddy PL, Joseph L, Tait JF. COLD-PCR enhanced melting curve analysis improves diagnostic accuracy for KRAS mutations in colorectal carcinoma. *BMC Clin Pathol.* 2010; 10:6.
- Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6:e1689.
- Ramírez JD, Guhl F, Messenger LA, Lewis MD, Montilla M, Cucunuba Z, Miles MA, Llewellyn MS. Contemporary cryptic sexuality in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Ecol.* 2012; 21:4216–4226.
- Ramírez JC, Cura CI, Moreira OC, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, Ramírez JD, Alberti A, Pavia P, Flores-Chávez MD, Muñoz-Calderón A, Pérez-Morales D, Santalla J, Guedes PMM, Peneau J, Marcet P, Padilla C, Cruz-Robles D, Valencia E, Crisante GE, Greif G, Zulantay I, Costales JA, Alvarez-Martínez M, Martínez

NE, Villarroel R, Villarroel S, Sánchez Z, Bisio M, Parrado R, Galvão LMC, Da Câmara ACJ, Espinoza B, De Noya BA, Puerta C, Riarte A, Diosque P, Sosa-Estani S, Guhl F, Ribeiro I, Aznar C, Britto C, Yadón ZE, Schijman AG. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn.* 2015; 17:605-15.

- Ramírez JD, Tapia-Calle G, Guhl F. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in Colombia revealed by a High-throughput Nuclear Multilocus Sequence Typing (nMLST) approach. *BMC Genet.* 2013; 14:96.
- Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4:e899.
- Ramírez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, Restrepo S. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:3945–3951.
- Rassi AJr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010; 375:1388-402.
- Ratier L, Urrutia M, Paris G, Zarebski L, Frasch AC, Goldbaum FA. Relevance of the diversity among members of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family analyzed with camelids single-domain antibodies. *PLoS One.* 2008; 3:e3524.
- Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics.* 2007; 8: 597–608.
- Requena JM, Lopez MC, Alonso C. Genomic repetitive DNA Elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 1996; 12:279-282.
- Requena JM, Jimenez-Ruiz A, Soto M, Lopez MC, Alonso C. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol Biochem Parasitol.* 1992; 51:271-280.
- Rettig J, Wang Y, Schneider A, Ochsenreiter T. Dual targeting of isoleucyl-tRNA synthetase in *Trypanosoma brucei* is mediated through alternative transsplicing. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40:1299–1306.
- Risso MG, Garbarino GB, Mocetti E, Campetella O, Gonzalez Cappa SM, Buscaglia CA, Leguizamon MS. Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J Infect Dis.* 2004; 189:2250–2259.
- Rohde H, Qin J, Cui Y, Li D, Loman NJ, Hentschke M, Chen W, Pu F, Peng Y, Li J, Xi F, Li S, Li Y, Zhang Z, Yang X, Zhao M, Wang P, Guan Y, Cen Z, Zhao

X,Christner M, Kobbe R, Loos S, Oh J, Yang L, Danchin A, Gao GF, Song Y, Li Y, Yang H, Wang J, Xu J, Pallen MJ, Wang J, Aepfelbacher M, Yang R. Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. *N Engl J Med.* 2011; 365(8):718–724.

- Rosenberg CS, Martin DL, Tarleton RL. CD8+ T cell specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance. *J Immunol.* 2010; 185:560-568.
- Rouleau E, Lefol C, Bourdon V, Coulet F, Noguchi T, Soubrier F, Bièche I, Olschwang S, Sobol H, Lidereau R. Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome. *Hum Mutat.* 2009; 30:867–75.
- Rozas N, De Doncker S, Coronado X, Barnabé C, Tibyarenc M, Solari A, Dujardin JC. Evolutionary history of *Trypanosoma cruzi* according to antigen genes. *Parasitology.* 2008; 135:1157–1164.
- Rozas M, De Doncker S, Adai V, Coronado X, Barnabé C, Tibyarenc M, Solari A, Dujardin JC. Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment-length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. *J Infect Dis.* 2007; 195:1381–1388.
- Rubin-de-Celis SS, Uemura H, Yoshida N, Schenkman S. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell. Microbiol.* 2006; 8:1888–1898.
- Russomando G, Figueredo A, Almirón M, Sakamoto M, Morita K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(11):2864-8.
- Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, Candia N, Calcena MF, Figueredo A. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polimerase chain reaction. *Am J of Trop Med Hyg.* 1998; 59(3):487-491.
- Sales-Campos H, Kappel HB, Andrade CP, Lima TP, Mattos ME Jr, de Castilho A, Correia D, Giraldo LE, Lages-Silva E. A DTU-dependent blood parasitism and a DTU-independent tissue parasitism during mixed infection of *Trypanosoma cruzi* in immunosuppressed mice. *Parasitol Res.* 2014; 113(1):375–85.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(12):5463–5467.
- Saravia NG, Holguín AF, Cibulskis RE, D'Alessandro A. Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the eastern plains, piedmont, and highlands of Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 1987; 36:59–69.
- Schenkman S, Chaves LB, Pontes de Carvalho LC, Eichinger D. A proteolytic fragment of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase lacking the carboxyl-terminal domain is active, monomeric, and generates antibodies that inhibit enzymatic activity. *J Biol Chem*. 1994; 269:7970-7975.
- Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52:441-449.
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hjar G, Zulantay I, Lucero RH, Velazquez E, Tellez T, Sanchez Leon Z, Galvão L, Nolder D, Monje Rumi M, Levi JE, Ramirez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, De Castro AM, Gonzalez CI, Acosta Viana K, Yachelini P, Torrico F, Robello C, Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti A, Ladzins J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(1):e931.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102:75–85.
- Schürch N, Hehl A, Vassella E, Braun R, Roditi I. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Mol Cell Biol*. 1994; 14:3668–3675.
- Siegel TN, Tan KS, Cross GA. Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(21):9586–9594.
- Siegel TN, Hekstra DR, Wang X, Dewell S, Cross GA. Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38:4946–4957.
- Silveira-Lacerda EP, Silva AG, Junior SF, Souza MA, Kesper N, Botelho-Filho A, Umezawa ES. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang*. 2004; 87:204–207.

- Simpson L, Neckelmann N, de la Cruz VF, Simpson AM, Feagin JE, Jasmer DP, Stuart K. Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *J Biol Chem.* 1987; 262(13):6182-6196.
- Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 1987; 41:363-382.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; 83:141-52.
- Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 62:45-52.
- Souza W, Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol.* 2010; 2010:1–18.
- Spence J. Pathway prediction by bioinformatic analysis of the untranslated regions of the CFTR mRNA. *Genomics.* 2009; 98(1):39-47.
- Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 2003; 33:269–279.
- Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol.* 1989; 33:205-214.
- Sturm NR, Campbell DA. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2010; 115:35–43.
- Subileau M, Barnabé C, Douzery EJ, Diosque P, Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: new insights on ecophylogeny and hybridization by multigene sequencing of three nuclear and one maxicircle genes. *Exp Parasitol.* 2009; 122: 328-337.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30:2725-2729.
- Taylor S, Scott R, Kurtz R, Fisher C, Patel V, Bizouarn F. A practical guide to high resolution melt analysis genotyping. *Bio-Rad Bulletin.* 2010; 6004.
- Teixeira SM, da Rocha WD. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res.* 2003; 2:148-158.

- Telleria J, Biron DG, Brizard JP, Demettre E, Seveno M, Barnabé C, Ayala FJ, Tibayrenc M. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107:20411–20416.
- Thanchomnang T, Intapan PM, Tantrawatpan C, Lulitanond V, Chungpivat S, Taweethavonsawat P, Kaewkong W, Sanpool O, Janwan P, Choochote W, Maleewong W. Rapid detection and identification of *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Dirofilaria immitis* in mosquito vectors and blood samples by high resolution melting real-time PCR. J Parasitol. 2013; 51:645–50.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural population of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83:115-119.
- Tibayrenc M; Ayala FJ. Isozyme variability of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution. 1988; 42:277-292.
- Tibayrenc M, Ayala FJ. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. Parasitol Today. 1991; 7:228-232.
- Tibayrenc M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Adv Parasitol. 1995; 36:47-115.
- Tibayrenc M. Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93:577–80.
- Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. Trends Parasitol. 2002; 18:405-10.
- Tibayrenc M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. Kinetoplastid Biol Dis. 2003; 2(1):12.
- Tindall EA, Petersen DC, Woodbridge P, Schipany K, Hayes VM. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. Hum Mutat. 2009; 30:876–83.
- Todeschini AR, Girard MF, Wieruszkeski JM, Nunes MP, DosReis GA, Mendonça-Previato L, Previato JO. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* binds host T-lymphocytes in a lectin manner. J Biol Chem. 2002; 277:45962–45968.
- Todeschini AR, Nunes MP, Pires RS, Lopes MF, Previato JO, Mendonça-Previato L, DosReis GA. Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling. J Immunol. 2002; 168:5192– 5198.

- Tonelli RR, Giordano RJ, Barbu EM, Torrecilhas AC, Kobayashi GS, Langley RR, Arap W, Pasqualini R, Colli W, Alves MJ. Role of the gp85/trans-sialidases in *Trypanosoma cruzi* tissue tropism: preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature in vivo. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4:e864.
- Trujillo AI, Peñagaricano F, Grignola MP, Nicolini P. Using high resolution melting analysis to identify variation of NPY, LEP and IGF-1 genes in Angus cattle. Livest Sci. 2012; 146:193-198.
- Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Claser C, Machado AV, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Rodrigues MM. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. J Immunol. 2008; 180(3):1737–1748.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N Jr, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol. 1996; 34:2143–7.
- Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends Parasitol. 2003; 19:495–501.
- Van der Velden AW, Thomas AA. The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. Int J Biochem Cell Biol. 1999; 31:87-106.
- Vanhamme L, Pays E. Control of gene expression in trypanosomes. Microbiol Rev. 1995; 59:223-40.
- Venter JC, et al. The sequence of the human genome. Science. 2001; 291:1304–1351.
- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop Med Hyg. 2003; 68(5):574-582.
- Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clin Chem. 2009; 55:641–58.
- Vorkas PA, Christopoulos K, Kroupis C, Lianidou ES. Mutation scanning of exon 20 of the BRCA1 gene by high-resolution melting curve analysis. Clin Biochem. 2010; 43:178-185.
- Vossen RH, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. Hum Mutat. 2009; 30:860–6.

- Wagner W, So M. Genomic Variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of multicopy genes. *Infect Immun*. 1990; 58(10):3217-3224.
- Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*. 2005; 171:527-543.
- Westenberger SJ, Sturm NR, Campbell DA. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define Five groups and indicate the geographic origins of na ancestor of the heterozygous hybrids. *Int J Parasitol* 2006; 36:337-346.
- Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, Brenière SF. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol Lett*. 1994; 124(3):419-423.
- Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 51:771-777.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*. 2003; 49:853–860.
- Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat*. 2009; 30:857–859.
- Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35:e41.
- Wu SB, Franks TK, Hunt P, Wirthensohn MG, Gibson JP, Sedgley M. Discrimination of SNP genotypes associated with complex haplotypes by high resolution melting analysis in almond: implications for improved marker efficiencies. *Mol Breed*. 2009; 25:351-357.
- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int. J. Parasitol*. 2005; 35:225–233.
- Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Acosta N, Bhattacharyya T, Diosque P, Carrasco HJ, Miles MA. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(6):e1049.

- Zafra G, Mantilla JC, Valadares HM, Macedo AM, González CI. Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian chagasic patients. *Parasitol Res.* 2008; 103:731-734.
- Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis.* 1999; 180:480-486.
- Zhang W, Cui H, Wong LJ. Application of next generation sequencing to molecular diagnosis of inherited diseases. *Top Curr Chem.* 2014; 336:19-45.
- Ziccardi M, Brandão A. Transcription of long hypothetical orfs in *Trypanosoma cruzi*: the epimastigote stage uses trans-splicing sites that generate short 5' UTRs. *Exp Parasitol.* 2011; 129:203-6.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012; 12:240–253.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(7):1051-1054.
- Zuo Z, Chen SS, Chandra PK, Galbincea JM, Soape M, Doan S, Barkoh BA, Koeppen H, Medeiros LJ, Luthra R. Application of COLD-PCR for improved detection of KRAS mutations in clinical samples. *Mod. Pathol.* 2009; 22:1023–31.

ANEXO A



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: Avaliação da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Trypanosoma cruzi* em soro e em sangue de pacientes com Doença de Chagas crônica

Pesquisador responsável: Yara de Miranda Gomes

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 20/11/2007

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 96/07


Registro no CAAE: 0096.0.095.000-07

PARECER N° 007/2008

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 18 de fevereiro de 2011. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 18 de fevereiro de 2008.


Aldemy Fernandes Freyre
Professor
Vice-Coordenador
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 18/02/2009.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitodeetica@cpqam.fiocruz.br



ANEXO B

Parasitas (código)	Pesquisador ou Coleção sigla	Bioma	Estado / País	Hospedeiro	DTU
D8 (25)	ColTryp	Mata Atlântica	Rio de Janeiro / Brasil	Didelphis marsupialis (Gambá)	Tc I
DM28c (CTIOC-010)	COLPROT				Tc I
Colombiana (CTIOC-004)	COLPROT				Tc I
G (CTIOC-216)	COLPROT				Tc I
Tulahuen (CTIOC-295)	COLPROT				Tc II
Y (CTIOC-106)	COLPROT				Tc II
PR1281	Jean Max	Cerrado ou Mata Atlântica	Minas Gerais ou Paraná, Brasil	Homo sapiens (chronic phase)	Tc II
3663	LABIMDOE				Tc III
222	Jean Max	Cerrado	Minas Gerais, Brasil	Homo sapiens (chronic phase)	Tc III
4167	LABIMDOE				Tc IV
AM14	Jean Max	Floresta Amazônica	Amazonas, Brasil	Homo sapiens (acute phase)	Tc IV
CAN III	Jean Max	Floresta Amazônica	Pará, Brasil	Homo sapiens (acute phase)	Tc IV
LL014	LABIMDOE				Tc V
SO3 cl5	Jean Max	Deserto de Sal, base das cordilheiras dos Andes	Potosi, Bolívia	Triatoma infestans	Tc V
Bug 2149	LABIMDOE				Tc V
CL (CTIOC-005)	COLPROT				Tc VI
CL (clone)	Jean Max	Pampa	Rio Grande do Sul, Brasil	Triatoma infestans	Tc VI
Peruana (CTIOC-252)	COLPROT				Tc VI
CP300 (CTIOC-300)	COLPROT				Tc VI
<i>T. cruzi bat</i> (CTIOC-299)	COLPROT				Tc VII*
<i>T. cruzi marinkellei</i> (CTIOC-312)	COLPROT				-

Parasitas (código)	Pesquisador ou Coleção sigla	Bioma	Estado / País	Hospedeiro	DTU
<i>Trypanosoma rangeli</i> (CTIOC-038)	COLPROT				-
<i>Leishmania braziliensis</i> (MHOM/BR/1975/M2903)	CLIOC				-
<i>Leishmania shawi</i> (MCEB/BR/1984/M8408)	CLIOC				-
<i>Leishmania lainsoni</i> (MHOM/BR/1981/M6426)	CLIOC				-
<i>Leishmania major</i> (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN)	CLIOC	-	Israel	Homo sapiens	-
<i>Toxoplasma gondii</i>	Constança Britto				-
<i>Phytomona</i> sp (<i>Euphorbia pinea</i>)	COLPROT				-
<i>Chritidia oncopelti</i>	COLPROT				-
<i>Chritidia fasciculata</i>	COLPROT				-

ANEXO C



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 007/2007

Protocolo 0070.0.009.000-07

1. Identificação:

Título do Projeto: "Implantação de PCR para diagnóstico de doenças de Chagas como rotina clínica do IPEC".

Pesquisador Responsável: Pedro Emmanuel Alvarenga Americano do Brasil.

Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 18/12/2007.

2. Sumário:

Este projeto visa a avaliar, validar e implantar na rotina clínica do IPEC um teste de PCR *in-house* para o diagnóstico de doença de Chagas. Este será dividido em 3 fases: (a) a padronização dos procedimentos laboratoriais; (b) a estimativa de confiabilidade; (c) estimativa de medidas de validade do teste. Para a primeira fase serão consultadas na literatura as técnicas disponíveis e adaptá-las para o protocolo do projeto. Para a segunda fase serão selecionados uma amostra de 30 doentes e 30 não doentes e realizar os PCR de forma mascarada em duplicata para estimativa da estatística Kappa. Para a terceira fase serão selecionados seqüencialmente 294 voluntários suspeitos de doença de Chagas que estão em investigação diagnóstico para esta doença. Então o teste de PCR e o teste referência serão realizados de forma mascarada e para estimar parâmetros de validade (sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança).

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com linguagem acessível ao sujeito da pesquisa. O financiamento deste projeto já foi previsto no PA de 2008 do IPEC.

4. Diligências:

Não.

5. Parecer: APROVADO.

Data: 21 de janeiro de 2008.

Assinatura do Coordenador:

Dr.ª Léa Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ

APÊNDICE A

RESEARCH

Open Access

Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients

Myllena F Melo^{1,4†}, Otacilio C Moreira^{1,4*†}, Priscila Tenório², Virginia Lorena^{2,4}, Izaura Lorena-Rezende², Wilson Oliveira Júnior³, Yara Gomes^{2,4} and Constança Britto^{1,4}

Abstract

Background: Inconclusive results of serological diagnosis in Chagas disease have an important impact on blood banks worldwide, reflecting in the high number of discarded bags or in an increased transmission by blood transfusion. Molecular techniques such as qPCR have been used for diagnosis and to monitor *Trypanosoma cruzi* load in peripheral blood samples. A promising perspective refers to the possibility of parasite DNA detection in serum, taking advantage in using the same samples collected for serological screening.

Methods: In order to evaluate the effectiveness of a qPCR strategy for detecting and quantifying *T. cruzi* DNA in serum, we selected 40 chronic Chagas disease patients presenting different clinical manifestations: Cardiac (23), Digestive (4), Mixed form [cardiodigestive] (7), and asymptomatic (6). Twenty seronegative individuals from non-endemic areas were included as controls. Samples were extracted using QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) and qPCR was performed in a multiplex format with TaqMan probes for the nuclear satellite DNA of *T. cruzi* and for the human RNase P gene. In addition, DNA migration to serum during blood coagulation was assessed using a commercial exogenous control (Exo IPC, Applied Biosystems) in a separate qPCR reaction.

Results: The comparative duplex qPCR analysis revealed that, even with an increase in Ct values, it was possible to detect all DNA targets in serum. In addition, the same linearity range for *T. cruzi* quantification (from 10^5 to 0.5 par. eq./mL) between serum, blood or culture samples (*T. cruzi* epimastigotes – CI Brener strain) was found. When patient samples were evaluated, no significant differences in parasite load between the distinct clinical manifestations were found for both blood and serum samples. Moreover, median values of parasite burden were 1.125 and 1.230 par. eq./mL for serum and blood, respectively. Using serology as gold standard, we found 95% sensitivity for *T. cruzi* detection in serum and 97.5% for blood, and 100% specificity for both samples.

Conclusions: Taken together, our data indicate the potential of using serum samples for molecular diagnosis and parasite load quantification by qPCR, suggesting its use in reference laboratories for the diagnosis of Chagas disease patients.

Keywords: Molecular diagnosis, Real Time PCR, Chagas disease, Serum samples

* Correspondence: otacilio@ioc.fiocruz.br

†Equal contributors

¹Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, IOC /Fiocruz, Av. Brasil, 4365. Pavilhão Leônidas Deane, sala 209. Mangueiras, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Programa Integrado de Doença de Chagas/Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and represents the third-highest parasitic disease burden after malaria and schistosomiasis [1,2]. It remains a relevant and endemic public health issue in 21 endemic countries of America, with an estimated 8 million people already infected and about 50,000 new cases per year [3,4]. In addition, cases of Chagas disease due to blood transfusion and organ transplantation have been increasingly detected in the United States, Canada, many European countries and Oceania, as consequence of intense migration of Latin America infected individuals to non-endemic countries [5,6]. In this context, there is an urgent need for improving the surveillance on neglected tropical diseases for reducing the elevated number of undiagnosed Chagas disease cases in these countries [7,8].

The current diagnostic methods for Chagas disease are not satisfactory [3], being performed through the detection of parasites (or parts of its content) in blood or the presence of parasite-specific antibodies in patient's serum [9]. The results obtained by serological tests are often inconclusive and available kits are expensive and present rather low reproducibility, due to the use of non-defined reagents. In general, serological doubtful results can bring a significant impact in blood bank screening leading to an increment of discarded blood bags. In Brazil, it is estimated 55,000 seropositive donors [10,11] and the risk of transfusion transmission via contaminated blood is about 12% - 25% [12]. In the last decade, concerning the blood banks of Pernambuco state, the proportion of inconclusive serology by two or more tests (indirect haemagglutination, indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays) was higher than the concordance of positive results obtained by these tests [13]. In this sense, more reliable diagnostic methods for Chagas disease as well as biomarkers for assessment treatment response are urgently needed [9,14]. Quantitative PCR (qPCR) based assays could fill these gaps providing higher sensitivity and specificity than conventional methods to detect and quantify *T. cruzi* DNA in Chagas disease patients [15-18].

Herein, we evaluated the effectiveness of a duplex qPCR strategy based on TaqMan probes for detection and quantification of *T. cruzi* load in serum samples from chronic Chagas disease patients. Comparing the results obtained with peripheral blood samples, the data indicated the potential of using serum samples for molecular diagnosis and parasite load quantification, thus suggesting the use of qPCR in reference laboratories for the diagnosis of Chagas disease patients.

Methods

Ethics, consent and permissions

Forty seropositive Chagas disease chronic patients (aged 18 to 73 with a median of 62 years; 22 females and 18

males) assisted at the Ambulatório de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) – Universidade de Pernambuco (UPE), Brazil participated in the study. The serodiagnosis to confirm the infection was performed by both, conventional and recombinant enzyme-linked immunosorbent assays—CHAGAS TEST ELISA III (ABBOT/BiosChile - Bioschile Ingenieria Genética S.A., Santiago, Chile) and Imuno-Elisa CHAGAS (WAMA Diagnóstica, São Carlos, São Paulo, Brasil), following the recommendation of the Ministry of Health of Brazil (Technical Note 03/06-CGLAB/CGDT/DEVEP/SVS/MS) [9,19]. Patients were classified accordingly to their clinical manifestations as follows: cardiac (twenty three); digestive (four); cardiogestive (seven); asymptomatic (six) [9]. Additionally, 20 individuals without *T. cruzi* infection (negative serology) living in non-endemic Chagas disease areas were included as control group. The individuals recruited for this study did not receive any blood transfusion or organ transplantation prior to blood harvesting. The study was approved by the ethical committee of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães from Fiocruz (CAEE: 0096.0.095.000-07), following the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Chagas disease patients and healthy individuals participated as volunteers and agreed to the “Terms of Free and Informed Consent”; written informed consents were obtained.

DNA extraction from human blood and serum

For each individual, ten milliliters of venous blood were collected. Five milliliters were immediately transferred to a BD Vacutainer® Plus Plastic Serum tube and remained resting for 30 min at room temperature, in order to generate the clot from blood cells and the serum phase. The five mL remaining blood were transferred to a BD Vacutainer® Plus Plastic EDTA K3 tube. DNA extraction was performed from 200 µL of serum and blood samples, as described by Moreira et al. [20] using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA). The DNA eluate was stored at - 20°C until use in qPCR analysis.

Quantitative duplex Real-Time PCR (qPCR)

The qPCR reactions were carried out with 5 µL DNA; 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix AmpErase® from Applied Biosystems; 300nM *cruzi1* (5'ASTCGGCTGATCGTTTTCGA3') and *cruzi2* (5'AATTCCTCCAAGCAGCGGATA3') primers and 100nM *cruzi3* probe (5'FAM-CACACTGGACACCAA-NFQ-MGB3') specific for the satellite region of the nuclear DNA of *T. cruzi*; 0,5X TaqMan RNaseP Control Reagents kit (VIC/TAMRA) from Applied Biosystems, in a final volume of 20 µL [15]. Cycling conditions were a first step at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles at 94°C for 15 sec and 58°C for 1 min. The amplifications were carried out in an ABI Prism 7500 Fast device

(Applied Biosystems, USA). Standard calibration curves for blood and serum were constructed by serial dilution of DNA extracted from blood samples spiked with *T. cruzi* epimastigotes (CL-Brener), ranging from 10^5 to 0.5 parasite equivalents per milliliter of blood (par. eq./mL). For serum samples, whole blood was spiked with *T. cruzi* prior to serum preparation and DNA extraction.

Evaluation of DNA migration to serum after blood coagulation

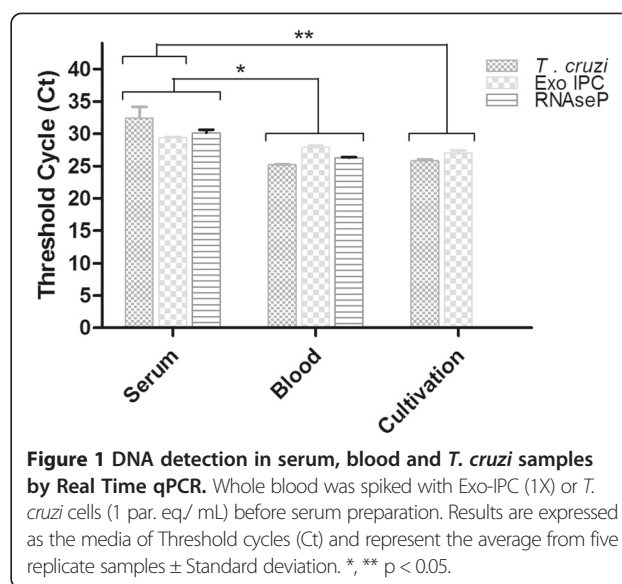
In order to verify DNA migration to serum after blood coagulation, the TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents (Exo-IPC DNA) from Applied Biosystems were used. This kit contains a synthetic DNA, without homology with any DNA sequence available on public databanks, together with a set of specific primers and TaqMan probe (VIC/TAMRA). Five milliliters of whole blood samples were spiked with Exo-IPC DNA or *T. cruzi* CL-Brener epimastigotes to reach a final concentration of [1X] or 10 parasites/mL respectively, prior to blood coagulation and serum isolation. DNA extraction and qPCR assays were conducted as described above.

Statistical analysis

Experiments were performed in five replicates. Data were expressed as arithmetic means or average \pm standard deviation. Student's *t*-test or Mann-Whitney Rank Sum test were used to analyze the statistical significance of the observed differences. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. All the analyses were performed with Sigmaplot for Windows Version 12.0 (Systat Software, Inc.).

Results

In this study the potential of serum samples to be used for the detection and quantification of *T. cruzi* load by real time qPCR was evaluated. At first, to evaluate the DNA migration to serum after blood coagulation, serum, blood and *T. cruzi* cultivated samples were compared by analyzing the resultant Ct values in multiplex qPCR assays, where the human RNase P was used as an internal amplification control [15,20], and Exo-IPC was used as an exogenous positive control (Figure 1). For this experiment *T. cruzi* epimastigotes (CL Brener) were used to contaminate a seronegative blood sample in order to reach final concentration of 10 parasites/mL in whole blood, before serum preparation. Following blood coagulation and serum obtaining, it was observed that *T. cruzi*, Exo-IPC and RNase P targets were detected in DNA extracted from serum samples (Ct means were 32.48, 29.38 and 30.15, respectively), showing the migration of parasite, exogenous and human DNAs to serum during blood coagulation. Nevertheless, these Ct values



were higher in serum than in blood or cultivated *T. cruzi* samples (*p* < 0.05; Ct means for blood samples: 25.22 [*T. cruzi*]; 27.90 [Exo-IPC] and 26.31 [RNaseP] and Ct means for *T. cruzi* cultivated samples: 25.79 [*T. cruzi*] and 27.02 [Exo-IPC]. Even with an increase in Ct values, these results indicated the possibility of parasite detection in serum samples by qPCR.

Aiming to compare the reportable range of *T. cruzi* DNA amplification between blood and serum samples, three independent standard curves were constructed ranging from 10^5 to 0.5 par. eq./mL with DNAs extracted from spiked blood; serum derived from artificially contaminated blood; and *T. cruzi* DNA from cultured CL Brener epimastigotes (Figure 2). Through linear regression analysis, an increased linearity was observed ($R^2 = 0.99$) and adequate slopes (-3.51 , -3.68 and -3.46 for serum, blood and *T. cruzi* cultivated samples, respectively) for parasite quantification. The standard curve from serum samples showed higher Ct values than the ones yielded for blood and cultivated *T. cruzi* samples, thus revealing lower parasite DNA concentration in serum. Nevertheless, linearity and curve slopes were equal or higher respectively, than those observed for blood standard curve, indicating the potential of serum samples to be used in the quantification of *T. cruzi* DNA by Real Time qPCR.

In order to compare the sensitivity and specificity of the duplex Real Time qPCR between serum and blood, assays were carried out with a panel of clinical samples from 40 chronic Chagas disease patients and 20 seronegative control patients. Twenty two individuals from the Chagas disease group were female (mean age 57.77 years) and 18 individuals were male (mean age 51.61 years). To calculate the sensitivity and specificity

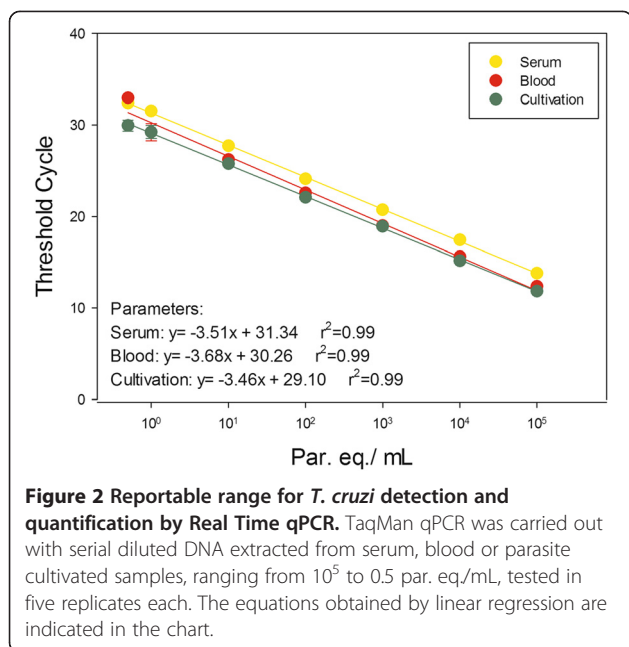


Figure 2 Reportable range for *T. cruzi* detection and quantification by Real Time qPCR. TaqMan qPCR was carried out with serial diluted DNA extracted from serum, blood or parasite cultivated samples, ranging from 10^5 to 0.5 par. eq./mL, tested in five replicates each. The equations obtained by linear regression are indicated in the chart.

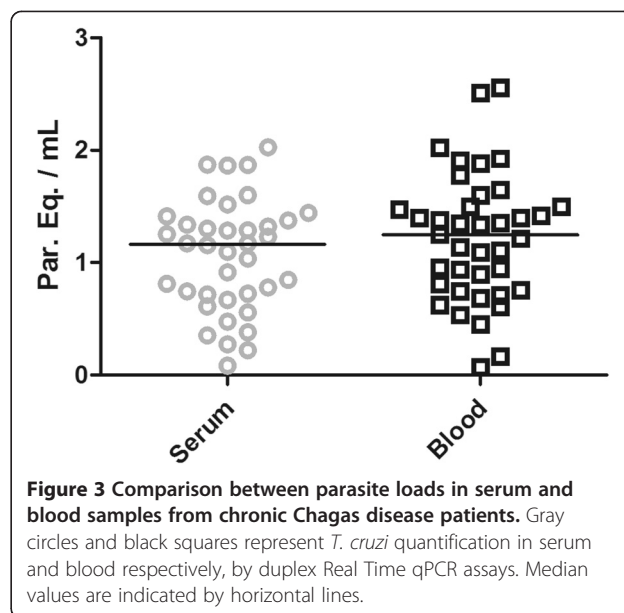


Figure 3 Comparison between parasite loads in serum and blood samples from chronic Chagas disease patients. Gray circles and black squares represent *T. cruzi* quantification in serum and blood respectively, by duplex Real Time qPCR assays. Median values are indicated by horizontal lines.

values, serology was considered as gold standard. For each individual, two serological tests using distinct antigens preparation were performed (conventional and recombinant ELISA), and the results were concordant between them. The qPCR showed sensitivities of 97.5 and 95% for *T. cruzi* DNA detection in blood and serum samples, respectively, and 100% specificity for both samples (Table 1).

To estimate parasite load through the multiplex Real Time PCR for absolute quantification, the correspondent standard curves were used for blood and serum samples, as described in Material and Methods section. For blood samples, parasite load varied from 0.067 to 2.553 with a median of 1.23 par. eq./mL. In comparison, for serum samples, the quantification varied from 0.085 to 2.03 with a median of 1.12 par. eq./mL (Figure 3). No significant difference was observed between the median values for these samples. As a matter of fact, the estimated parasite loads for these chronic patients were very low and near the inferior limit of the qPCR dynamic range, which can interfere in the precision of *T. cruzi* quantification.

Table 1 Sensitivity and specificity of the real time qPCR in blood and serum samples

	Blood samples		Serum samples	
	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
qPCR +	39 (97.5%)	0 (0%)	38 (95%)	0 (0%)
qPCR -	1 (2.5%)	20 (100%)	2 (5%)	20 (100%)
Total	40	20	40	20

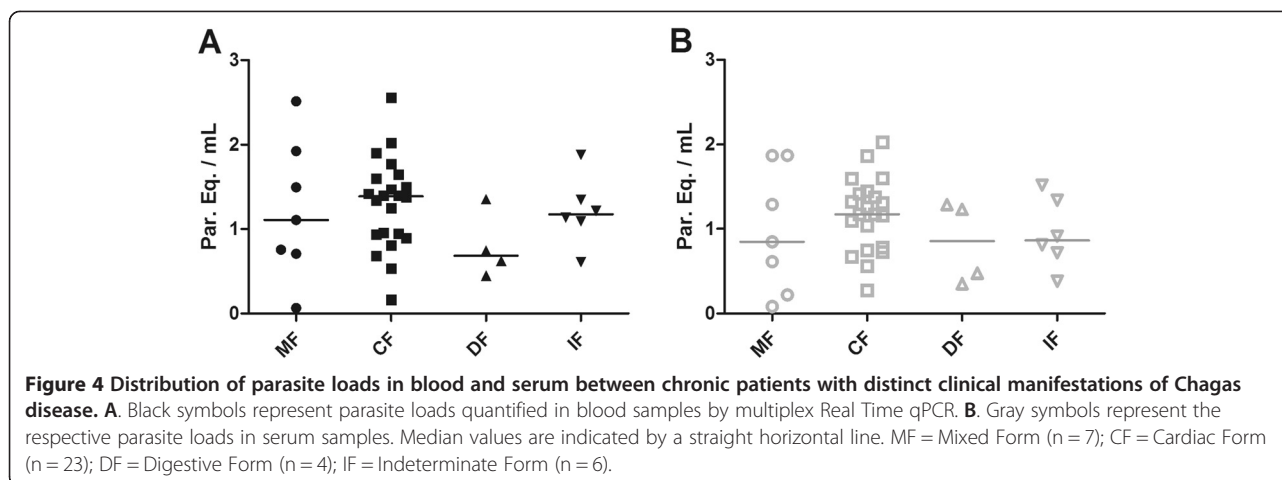
To calculate Sensitivity and Specificity values, serology was considered as gold standard.

Patients were divided into 4 groups, according to the clinical manifestation of Chagas disease: Cardiac Form (CF = 23), Digestive Form (DF = 4), Indeterminate Form (IF = 6) and Mixed Form (MF = 7). When patients were analyzed according to their clinical manifestations, no significant difference was observed in the parasite load medians between the distinct forms of the disease, even in blood (MF = 1.11, CF = 1.39, DF = 0.68, IF = 1.18 par. eq./mL) or serum (MF = 0.85, CF = 1.17, DF = 0.85, IF = 0.86 par. eq./mL) (Figure 4). Nevertheless, some patients presenting mixed (cardiodigestive) and cardiac forms showed a slight increase in parasitemia in both types of samples. However, as observed in Figure 3, all parasite loads were very low and can compromise the quantification precision.

Although the number of patients evaluated in this study is quite small, our data raised a discussion regarding the application of Real Time qPCR in serum samples for the diagnosis and quantification of *T. cruzi*, in order to follow-up Chagas disease patients, especially in situations where serum is the only available sample.

Discussion

Currently, WHO recommends the use of 2 simultaneous serological tests for the diagnosis of chronic Chagas disease, as indirect haemagglutination, indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays, based on detection of parasite-specific antibodies [9]. However, there is an elevated number of inconclusive results in blood banks worldwide, resulting in blood bag losses and increasing the risk of transmission by blood transfusion [5,6,8]. The Brazilian guideline for chronic Chagas disease diagnosis determines the use of PCR to confirm inconclusive serological tests, resulting in a new



blood sample collection [9]. In this context, we aimed to investigate the feasibility of Chagas disease molecular diagnosis and parasite load quantification using the same serum sample yielded for serological tests, based on previous studies that confirmed the use of serum samples for *T. cruzi* DNA detection by PCR [21]. Nevertheless, from our knowledge, this is the first report for using a multiplex Real Time qPCR assay able to detect and quantify *T. cruzi* from serum samples.

In this study, it is evident that the migration of *T. cruzi* DNA to serum occurs after blood coagulation. When we spiked whole blood with an exogenous DNA or living *T. cruzi* epimastigotes prior to serum isolation, both DNAs could be detected by multiplex Real Time PCR assay, in conjunction with human DNA from nucleated blood cells. As expected, the higher Ct values observed in serum, in comparison with blood and parasite cultivated samples, indicated that only part of parasite and human DNA migrates to serum after blood coagulation. Nevertheless, the sensitivity for *T. cruzi* detection in chronic Chagas disease patients was only slightly lower in serum (95.0%) than blood (97.5%), and the same specificity (100%) was observed for both samples (Table 1), which makes it possible to use serum samples to detect *T. cruzi* DNA by Real Time qPCR. Using serological methods as gold standard, clinical sensitivity for conventional and Real Time PCR assays presents great variability among distinct studies [17,22-26]. In addition, using *cruzi1/cruzi2* primers and *cruzi 3* TaqMan probe, Duffy et al. [17] reported sensitivity values ranging from 60.3 – 100% for *T. cruzi* detection in blood samples from patients from different geographical areas (Venezuela, Cochabamba, Argentina and North Argentina), infected by distinct transmission routes (oral infection, chronic Chagas disease and newborns from chronic Chagas disease mothers), and presenting different parasite load medians (2.75 – 691.8 parasite equivalents/ mL). On the other hand, Fitzwater et al. [26] reached 60.1%, 46.5%

and 40% sensitivity from clot, buffy coat and whole blood samples, respectively, in a conventional PCR assay using 121/122 primers. Indeed, multiple factors seem to influence these results, as the primers used (kDNA vs Sat-DNA), DNA extraction method, PCR reagents, *T. cruzi* genotype (DTUs) and parasite load. Following our methodology, even considering low parasite loads, we reached high and similar sensitivity values for blood and serum.

Nowadays, efforts are being done to standardize Real Time qPCR for *T. cruzi* quantification in blood samples. Following the recommendations from the international workshop promoted by PAHO/WHO in 2011, Duffy et al. [17] reported the analytical performance of a Multiplex Real-Time qPCR for the quantification of *T. cruzi* satellite DNA in blood samples. They observed a reportable range between 1 and 6 log₁₀ par. eq./10 mL for a TcI isolate (Silvio X10) and 0.25 to 6 log₁₀ par. eq./10 mL for a TcVI isolate (CL Brener). In addition, for the CL Brener isolate, it was observed a Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) of 0.6979 and 1.531 par. eq./mL, respectively. Herein, using the same set of primers for *T. cruzi* nuclear satellite DNA multiplexed with human RNase P gene instead of using the Internal Amplification Control (IAC), we observed a reportable range from 10⁵ to 0.5 par. eq./mL (Figure 2) for DNAs extracted from serum, blood or *T. cruzi* cultivated samples (CL Brener). Likewise, our results were feasible for parasite load quantification in Chagas disease patients with moderated parasitemia.

In this study, the low parasite load achieved in blood or serum samples reproduced the findings observed in recent studies regarding the use of qPCR for chronic Chagas disease patients [16,17,20]. The parasite load median in blood (1.23 par. eq./mL) was not statistically different from the one achieved from serum samples (1.12 par. eq./mL) (Figure 3), which corroborates the use of DNA extracted from serum for qPCR assays.

Nevertheless, comparing with the LOQ previously determined [17], several patients herein analyzed, presented parasite load below the LOQ, which means these samples were detectable but not quantifiable. When patients presenting distinct clinical manifestations were compared (Figure 4), we also could not observe significant differences between the parasite load medians from the groups evaluated, although many patients presenting the cardiac form (CF) seems to have higher parasite load in blood and serum samples. Unfortunately, in this study, there was a limitation concerning the number of analyzed patients, particularly for those with the digestive form of the disease. In the future, a robust investigation joining a representative group of patients with all Chagas disease clinical manifestations will be necessary to properly investigate parasite load as a biomarker for progression and severity of Chagas disease. The advances achieved here suggest the use of serum samples, currently maintained in serum banks, for retrospective studies regarding the disease development and to the follow-up of patients under treatment. Meanwhile, a new study with considerable higher numbers of Chagas disease patients, especially those asymptomatic individuals who can act as potential blood donors, must be performed to validate this molecular diagnostic assay in blood banks worldwide.

Conclusions

Taken together our data suggest the potential of serum samples to be used for molecular diagnosis and parasite load quantification by quantitative Real Time PCR assays.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: MFM, WOJ, OCM. Performed the experiments: MFM, PT, VL, ILR. Analyzed the data: MM, OCM. Wrote the paper: MFM, OCM, YG, CB. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors thank the Program for Technological Development in Inputs for Health (PDTIS-Fiocruz) for the facilities on the Real Time PCR, the Protozoan Collection from Fiocruz (Colprot) for providing the *T. cruzi* isolate used in this study and the Doctors Cristina Tavares and Marisa Melo from PROCAPE/UPE for selecting the patients included in this study. This work was supported by grants from PROEP/IOC-Fiocruz/CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), Serviço de Referência em Doença de Chagas/CPqAM-Fiocruz and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ E-26/110.594/2012 and CNE E-26/102.775/2012). C. Britto and Y. Gomes are research fellows of CNPq.

Author details

¹Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, IOC /Fiocruz, Av. Brasil, 4365. Pavilhão Leônidas Deane, sala 209. Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. ²Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM /Fiocruz, Recife, PE, Brazil. ³Ambulatório de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE), Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, PE, Brazil. ⁴Programa Integrado de Doença de Chagas/Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Received: 18 December 2014 Accepted: 25 February 2015

Published online: 12 March 2015

References

- Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis*. 2009;49:e52–4.
- Jackson Y, Ge' taz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardin A, et al. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e592.
- WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2012;975:1–100.
- Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasit Vectors*. 2014;7:317.
- Garraud O, Andreu G, Elghouzi MH, Laperche S, Lefèvre JJ. Measures to prevent transfusion-associated protozoal infections in non-endemic countries. *Travel Med Infect Dis*. 2007;5:110–2.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:75–85.
- Navarro M, Norman FF, Pérez-Molina JA, López-Vélez R. Benznidazole shortage makes Chagas disease a neglected tropical disease in developed countries: data from Spain. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87:489–90.
- Basile L, Jansà JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Seixas J. Working group on Chagas Disease. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Euro Surveill*. 2011;16(37):pii=19968. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19968>.
- da Saúde M. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde - Consenso Brasileiro em doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38 Suppl 3:7–29.
- Amato NV. Conduta frente ao doador chagásico. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1993;26:86–7.
- Dias JCP. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006;28:83–4.
- Lunardelli A, Borges FP, Mello KF, Zeferino ASA. Soroprevalência da doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. *Rev Bras Anal Clin*. 2007;39:139–41.
- Melo AS, Lorena V, Moraes A, Pinto M, Leão S, Soares A, et al. Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue no estado de Pernambuco, Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31:69–73.
- Pinazo MJ, Thomas MC, Bua J, Perrone A, Schijman AG, Viotti RJ, et al. Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12:479–96.
- Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007;103:195–200.
- Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3:e419.
- Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, 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 Negl Trop Dis*. 2013;7:e2000.
- Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1689.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Resultado da Avaliação dos "kits" para diagnóstico de doença de Chagas. Brasília; 2006. (Nota Técnica N° 03/06, CGLAB/CGDT/DEVP/SVS/MS). (Available from: http://www.biosys.com.br/data/jpf_article/12/file/avaliacaodoskitsdedoençadechagas.pdf).
- Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MFAD, Lima-Ferreira C, Guhl F, 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 Trop*. 2013;125:23–31.
- Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59:487–91.

22. Ávila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polymerase chain reaction amplification of Kinetoplast Minicircle DNA: Comparison with serologic and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2421–6.
23. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e931.
24. Gilber SR, Alban SM, Gobor L, Bescrovaine J de J, Myiazaki MI, Thomaz-Soccol V. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46:310–5.
25. Ramírez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, et al. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *J Clin Microbiol.* 2009;47(12):3945–51.
26. Fitzwater S, Calderon M, Lafuente C, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Verastegui M, et al. Polymerase chain reaction for chronic *Trypanosoma cruzi* infection yields higher sensitivity in blood clot than buffy coat or whole blood specimens. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(5):768–70.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



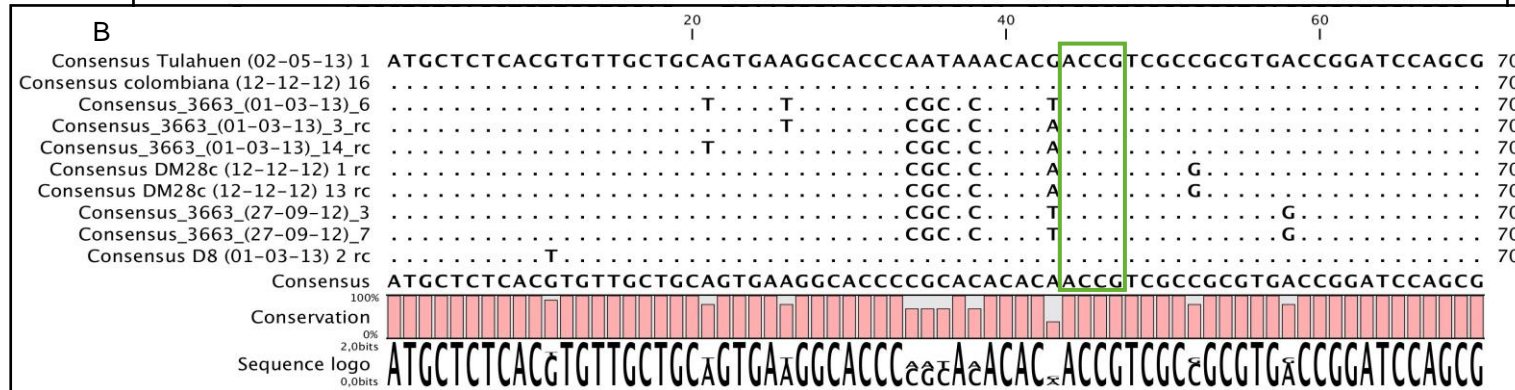
APÊNDICE B

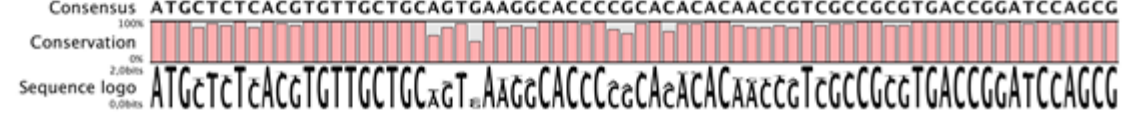
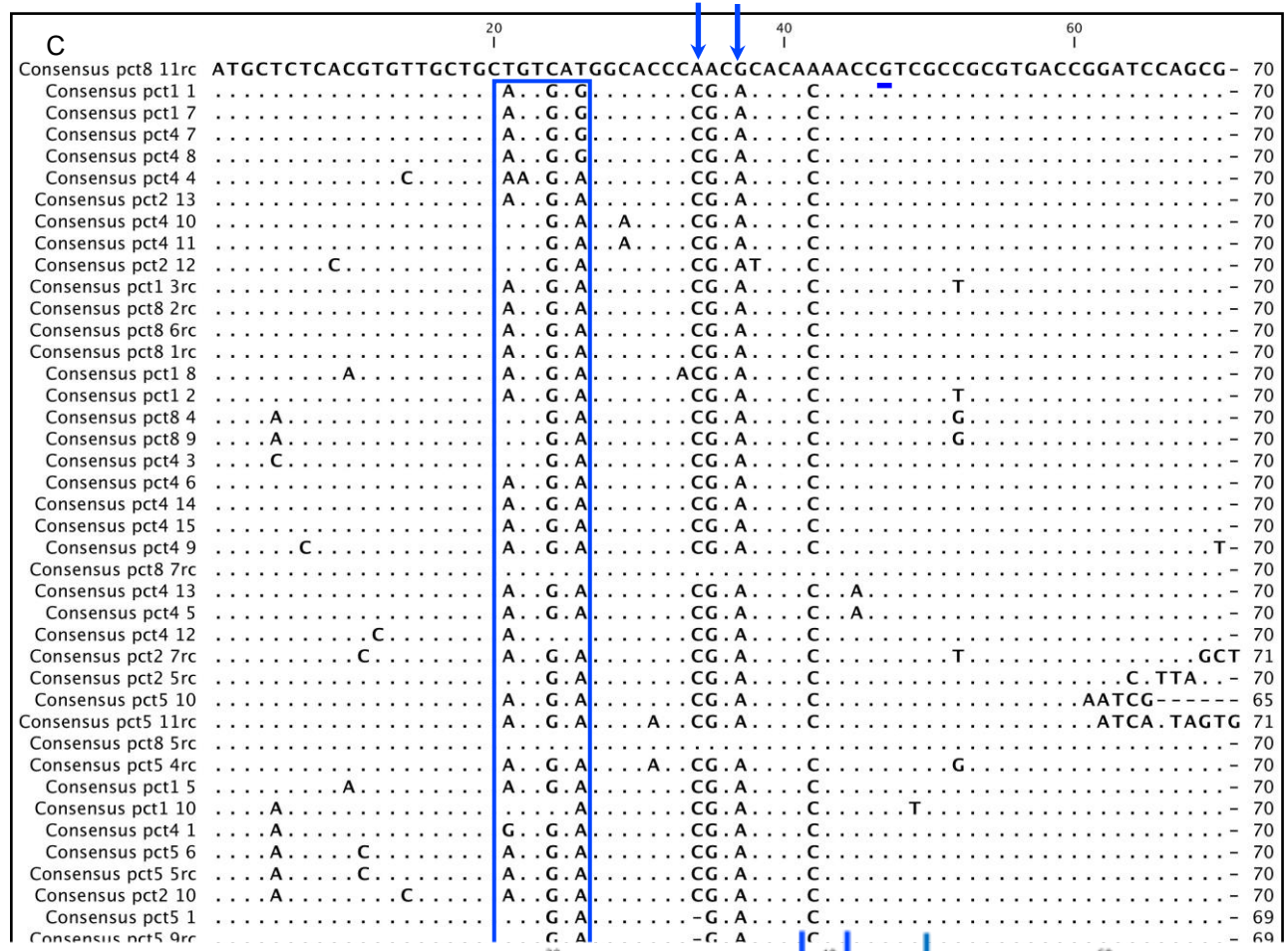
	ID e descrição	Cromossomo	Localização
1	Tc00.1047053510025.50 trans-sialidase, Group V,	TcChr41-S	1126764 - 1129346 (-)
2	Tc00.1047053510047.80 trans-sialidase, Group V, putative	TcChr7-P	376740 - 379418 (-)
3	Tc00.1047053509419.131 trans-sialidase, Group V, putative	Tcruzi_8094	31144 - 31869 (+)
4	Tc00.1047053508873.60 trans-sialidase, Group V, putative	TcChr41-P	877992 - 880730 (-)
5	Tc00.1047053510021.180 trans-sialidase, Group V, putative	TcChr41-S	1158613 - 1161129 (+)
6	Tc00.1047053504115.10 trans-sialidase, Group VIII, putative	TcChr25-P	717008 - 720169 (+)
7	Tc00.1047053506537.200 trans-sialidase, Group VIII, putative	TcChr23-P	629461 - 632799 (+)
8	Tc00.1047053508103.30 trans-sialidase, Group V, putative	TcChr20-S	594229 - 596823 (-)
9	Tc00.1047053508853.20 trans-sialidase, Group V, putative	TcChr18-P	196225 - 198843 (+)
10	Tc00.1047053511643.110 trans-sialidase, Group V, putative	TcChr21-P	202903 - 205713 (-)
11	Tc00.1047053508873.330 trans-sialidase, Group V, putative	TcChr41-P	932427 - 935144 (-)
12	Tc00.1047053510061.30 trans-sialidase, Group V, putative	TcChr41-S	318503 - 321121 (+)
13	TcCLB.508607.50 trans-sialidase, Group II, putative	TcChr35-S	1157084 - 1159648 (+)
14	Tc00.1047053506537.200 trans-sialidase, Group VIII, putative	TcChr23-P	629461 - 632799 (+)
15	Tc00.1047053506173.70 trans-sialidase, Group V, putative	Tcruzi_6839	13502 - 16153 (+)
16	Tc00.1047053506471.120 trans-sialidase, Group II, putative	TcChr33-P	1037046 - 1039862 (+)
17	Tc00.1047053506459.230 trans-sialidase, Group V, putative	TcChr41-P	600077 - 602587 (+)
18	TcCLB.508521.100 trans-sialidase, Group VIII, putative	TcChr35-P	48939 - 52289 (-)
19	Tc00.1047053504081.80 trans-sialidase, Group VIII, putative	TcChr41-P	1743231 - 1745786 (+)
20	Tc00.1047053505699.10 trans-sialidase, putative	Tcruzi_6683	732 - 3770 (-)

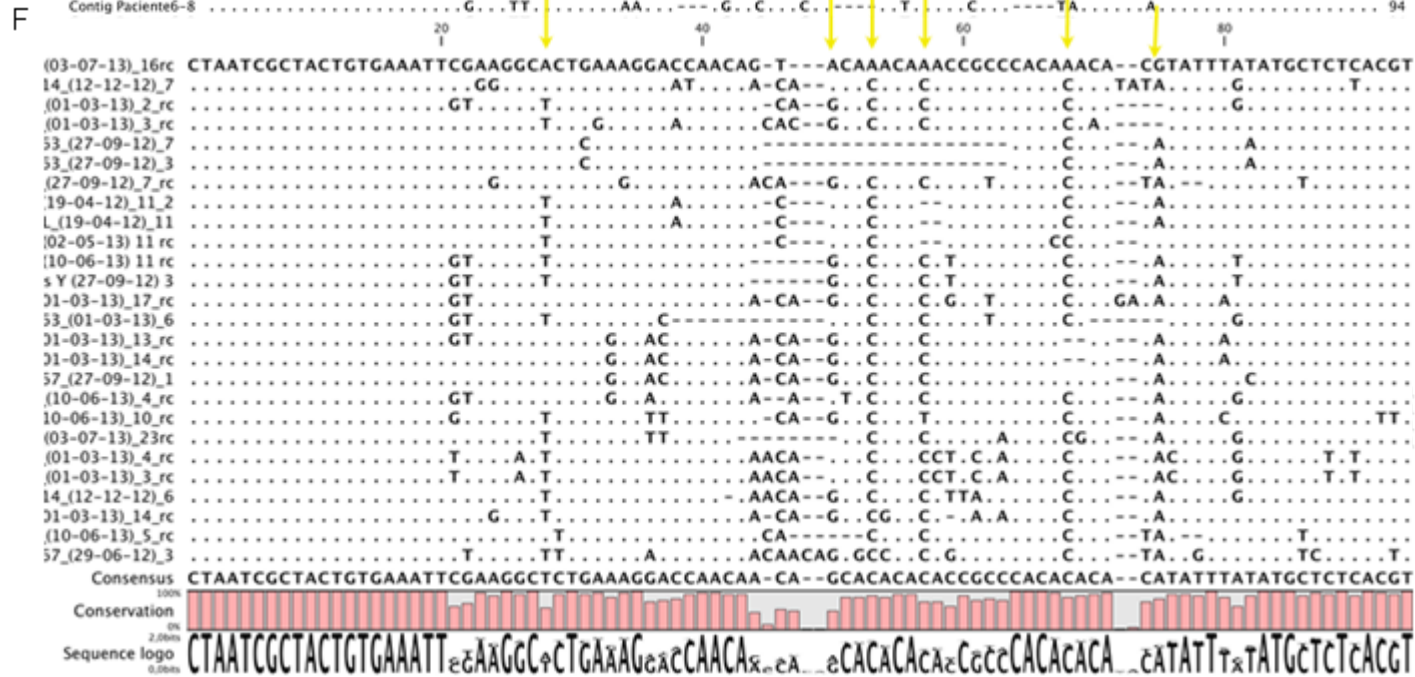
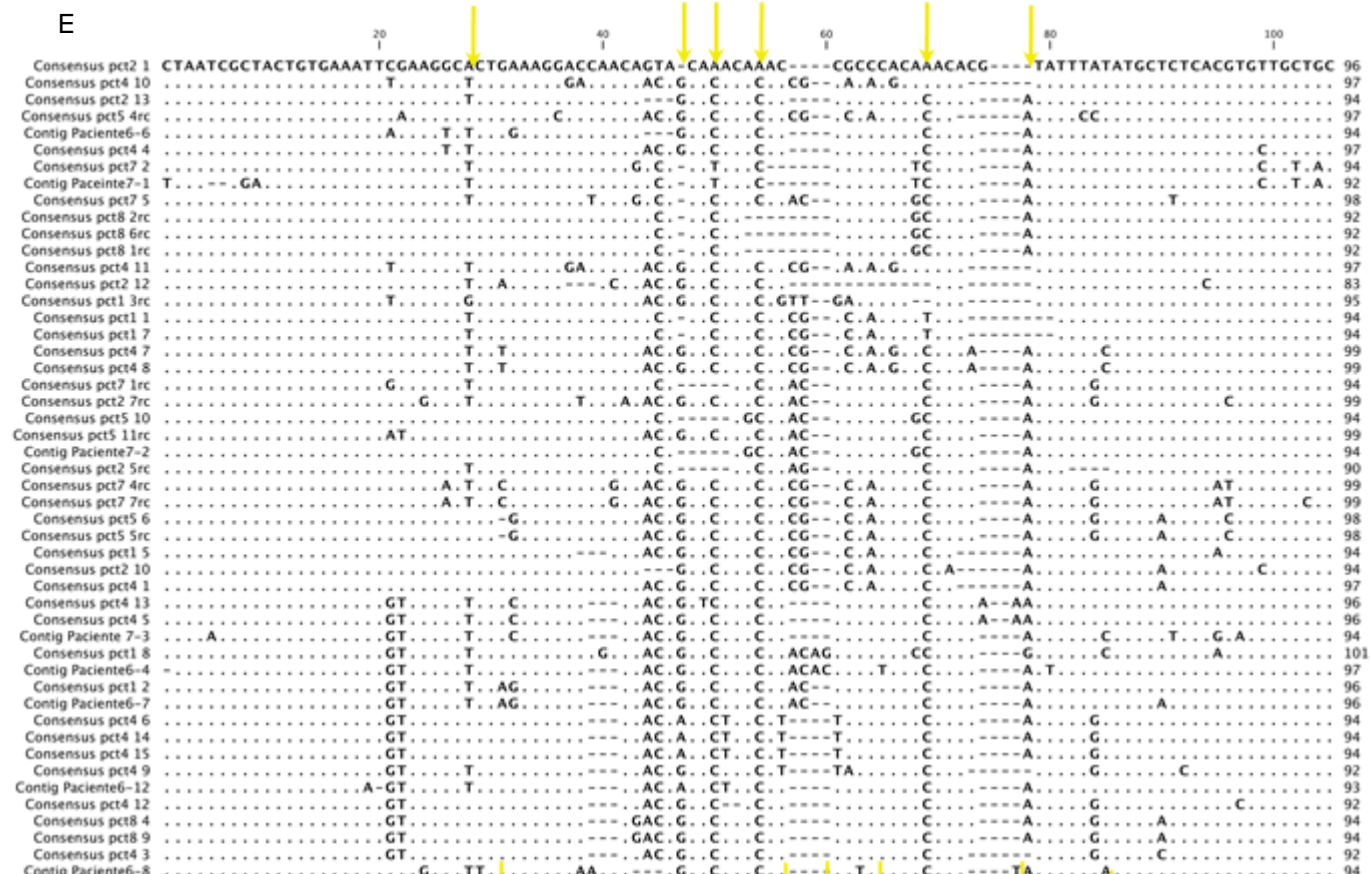
	ID e descrição	Cromossomo	Localização
21	Tc00.1047053511839.40 trans-sialidase, Group VIII, putative	TcChr20-P	516413 - 519004 (+)
22	Tc00.1047053511843.70 trans-sialidase, Group VIII, putative	TcChr20-P	553878 - 556640 (+)
23	Tc00.1047053506955.240 trans-sialidase, Group VIII, putative	TcChr38-P	278046 - 280853 (+)
24	TcCLB.511885.20 trans-sialidase, Group II, putative	TcChr32-P	64094 - 66424 (-)
25	Tc00.1047053511233.140 trans-sialidase, Group II, putative	TcChr18-P	185287 - 187941 (+)
26	Tc00.1047053508221.650 trans-sialidase, Group V, putative	TcChr41-P	1848668 - 1851640 (+)
27	Tc00.1047053506309.60 trans-sialidase, Group V, putative	Tcruzi_5356	14579 - 17047 (-)
28	Tc00.1047053508221.590 trans-sialidase, Group V, putative	TcChr41-P	1862957 - 1865809 (+)
29	TcCLB.509581.10 trans-sialidase, Group VII, putative	TcChr14-S	578019 - 581462 (+)
30	Tc00.1047053511401.30 trans-sialidase, Group V, putative	TcChr25-S	396772 - 399549 (+)
31	Tc00.1047053511875.20 trans-sialidase, Group VII, putative	TcChr15-S	130942 - 133671 (+)

APÊNDICE C

A	20	40	60	
Consensus pct3 3	ATGGTCTCACGTTGCTGCAG	---TGAAGGCACCCCGCACACA	CAGTTATCGCCGCGTGACCCGGATCCAGCG	70
Consensus pct3 16G...	ACCG	70
Consensus pct3 9	...C...	...T...A...T...	ACCG...T...	70
Consensus pct3 2	...C...	...G...	ACCG	70
Consensus pct7 5	...C.T...	...T...	ACCG	70
Consensus pct3 4	...C...	...A...	ACCG	70
Consensus pct3 17	...C...	...G...	ACCG	70
Consensus pct3 6	70
Consensus pct3 11	70
Contig Paciente6-4	...C...	...C.CTTTC-T...	CCG	70
Contig Paciente 7-3	...C.T...G.A...	...T...A...	A.CG	68
Contig Paciente6-7	...CA...	...T...T...	ACCG	70
Contig Paciente6-12	...C...	...T.CAC	ACCG	73
Consensus pct7 4rc	...C...AT...	...	ACCG...G...	70
Consensus pct7 7rc	...C...AT...C...	...	ACCG...G...	70
Consensus pct7 1rc	...C...	...	ACCG...A...	70
Contig Paciente6-6	...C...	...	ACCG	70
Contig Paciente7-2	...C...	...	ACCG...CTTA	70
Consensus pct3 10	...C.T...	...T...	ACCG	70
Consensus pct3 15	...C...	...T...A...T...	ACCG...T...	70
Consensus pct3 12	...CC...	...T...C.T...	ACCG	70
Contig Paciente6-8	...C...	...T...G...	ACCG	70
Contig Paciente6-9	...C...	...T...G...	ACCG	70
Consensus pct3 7	...C...	...T...	ACCG	70
Consensus pct3 13	...C...C.T.A...	...A...	ACCG	70
Consensus pct3 14	...C...C.T.A...	...A...	ACCG	70
Consensus pct3 5	...C...C.T.A...	...A...G...	ACCG	70
Consensus pct7 2	...C...C.T.A...	...A...	ACCG...A	70
Contig Paciente7-1	...C...C.T.A...	...A...	ACCG...T...	70
Consensus pct3 1	...C...T...	...AAT.A...	ACCG	70
Consensus pct3 8	...C...T...	...AAT.A...	ACCG	70
Consensus pct7 6	...C...T...AT...	...AA.A...	ACCG	70
Consensus pct7 8	...C...T...AT...	...AA.A...	ACCG	70
Contig Paciente6-2	...C...T...C...	...AA...	ACCG.T.T	70
Contig Paciente6-11	...C...T...C...	...AA...	ACCG.T.T	70
Consensus pct7 3	...C...T...TT...C.T.T...	...T.AAT.A...	ACCG	70
Contig Paciente6-1	...C...T...TT...C.T.T...	...T.AAT.A...A	ACCG	71
Contig Paciente6-10	...C...T...TT...C.T.T...	...T.AAT.A...	ACCG	70







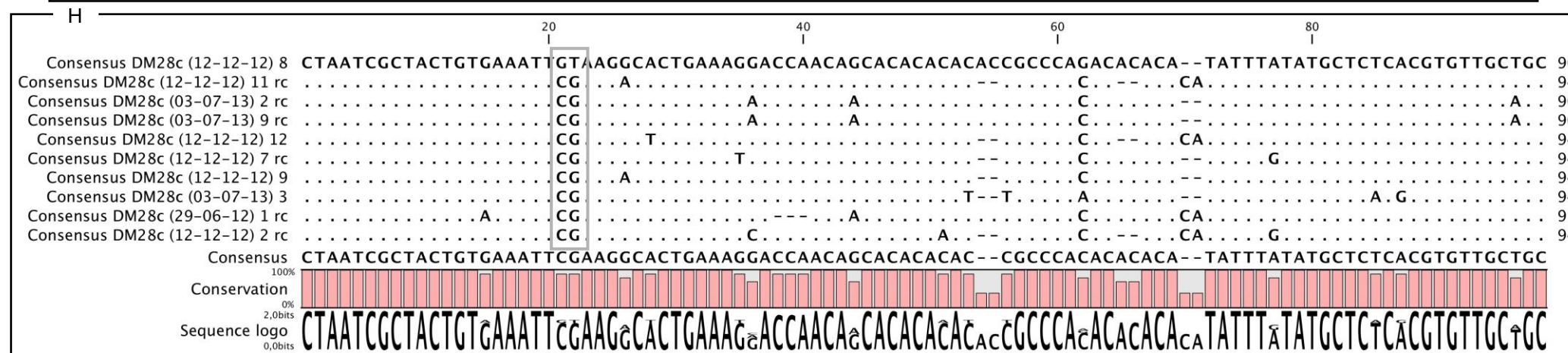
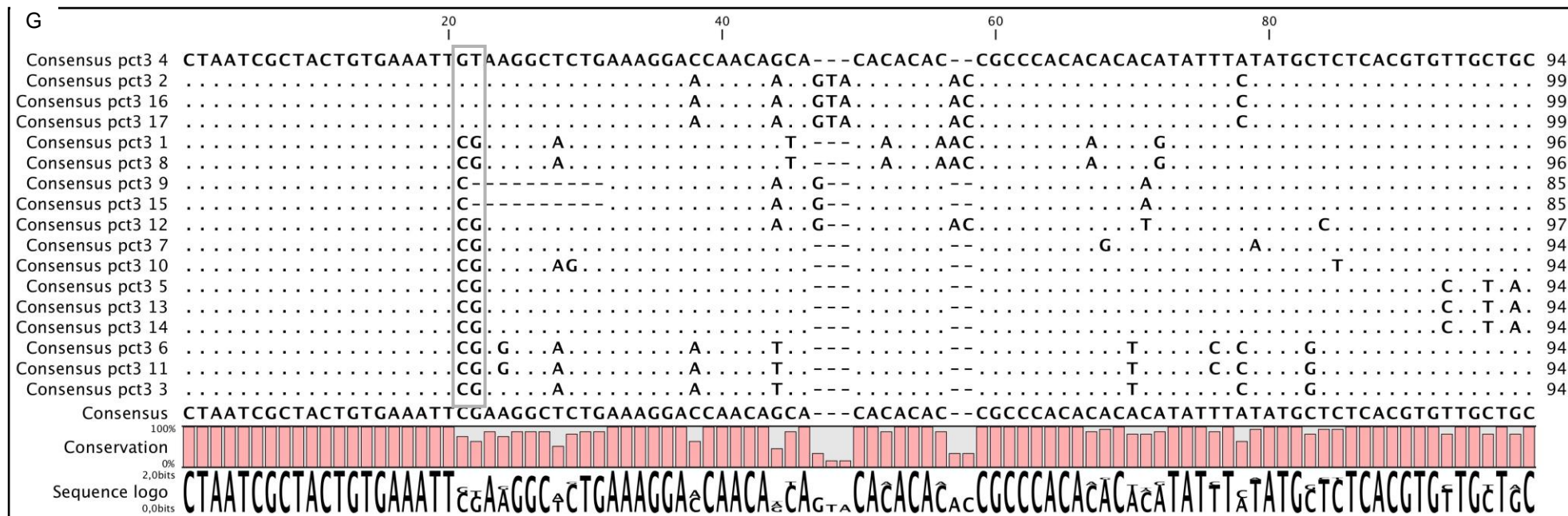


Figura ANEXO E. Identificação dos polimorfismos observados entre as seqüências dos pacientes e cepas/clones após o agrupamento pela PCR HRM para cada seção. A e C - seção 2 (P5/P3) das seqüências dos pacientes; B e D - seção 2 (P5/P3) das seqüências das cepas/clones; E e G seção 1 (P1/P4) das seqüências dos pacientes; F e H - seção 2 (P5/P3) das seqüências das cepas/clones. As cores dos retângulos e setas representam os sítios polimórficos e estão associados com as cores de cada variante gerada pelo PCR HRM

