

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
Mestrado em Ciências da Saúde

DESENVOLVIMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX CAPAZ DE DETECTAR
E CLASSIFICAR CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* EM AMOSTRAS
CLÍNICAS E DE CAMPO

por

DANIEL BARBOSA LIARTE

Belo Horizonte – MG
Março de 2006.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

DESENVOLVIMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX CAPAZ DE DETECTAR
E CLASSIFICAR CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* EM AMOSTRAS
CLÍNICAS E DE CAMPO

por

DANIEL BARBOSA LIARTE

Belo Horizonte
Março de 2006.

Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde

DESENVOLVIMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX CAPAZ DE DETECTAR
E CLASSIFICAR CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* EM AMOSTRAS
CLÍNICAS E DE CAMPO

por

Daniel Barbosa Liarte

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências na
área de Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Alvaro José Romanha

Co-orientadora: Dra. Silvane M. Fonseca Murta

Ficha Catalográfica

Liarte, Daniel Barbosa

“Desenvolvimento de uma PCR multiplex capaz de detectar e classificar cepas de *Trypanosoma cruzi* em amostras clínicas e de campo.”

2006, 107p.

Tese: Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*; PCR multiplex; diagnóstico; classificação.

Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Esta Dissertação intitulada:

DESENVOLVIMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX CAPAZ DE DETECTAR
E CLASSIFICAR CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* EM AMOSTRAS
CLÍNICAS E DE CAMPO

apresentada por

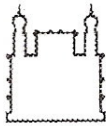
Daniel Barbosa Liarte

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Dra. Renata Guerra de Sá

Dissertação defendida e aprovada em 02 de Março de 2006.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ


Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

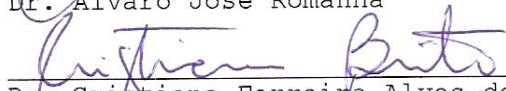
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da décima oitava defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do aluno Daniel Barbosa Liarte, sob a orientação do Dr. Alvaro José Romanha e co-orientado pela Dra. Silvane Maria Fonseca Murta.

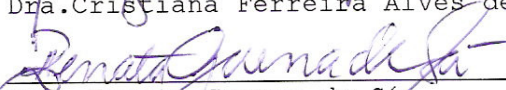
Aos dois dias do mês de março do ano de dois mil e seis, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da décima oitava dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. A dissertação do aluno Daniel Barbosa Liarte intitula-se "Desenvolvimento de uma PCR multiplex capaz de detectar e classificar cepas de *Trypanosoma cruzi* em amostras clínicas e de campo". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Alvaro José Romanha CPqRR/FIOCRUZ (orientador e presidente da banca), Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito - CPqRR/FIOCRUZ (membro titular), Dra. Renata Guerra de Sá - UFOP (membro titular) e Dr. Guilherme Corrêa Oliveira - CPqRR/FIOCRUZ (membro suplente). Após argüir o aluno e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, o aluno foi considerado Aprovado. Uma vez encerrado o exame, eu, Alvaro José Romanha, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, dois de março de dois mil e seis.



Dr. Alvaro José Romanha



Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito



Dra. Renata Guerra de Sá

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me acompanhar sempre. Por permitir alcançar mais este objetivo, guiando meus passos e pensamentos. Por ser presença marcada na minha vida.

Agradeço, em especial, ao que tenho de mais valioso nessa terra: a minha família. Agradeço aos meus pais Francisca Soares Barbosa e Antonio Dias Liarte e meus irmãos Jaira, Jarder, Jardilson, David e Danilo. Muito obrigado pelo apoio nos momentos difíceis, carinho, amor, compreensão e dedicação sempre.

Agradeço a minha eterna namorada, Alexandra, pelo amor, paciência e apoio durante toda esta etapa da minha vida. Sem ela não haveria esta dissertação e nem o melhor que há em mim.

Agradeço ao meu sogro Aucino Rodrigues Cajado e à minha sogra Isabel Maria de Siqueira Cajado, por confiarem em mim, por me receberem em sua querida família e principalmente pela filha maravilhosa que eles souberam educar e amar.

Aos meus sobrinhos e afilhados, pelos sorrisos que me restauraram as forças nos momentos de cansaço. A todos da minha família que de forma direta ou indireta colaboraram com mais essa conquista na minha vida.

Agradeço ao Dr. Alvaro José Romanha, por ter me orientado durante esse período, pela sua atenção, presença e dedicação. À minha co-orientadora Dra. Silvane Maria Fonseca Murta, pela assistência, encorajamento e apoio quando eu mais precisei. Agradeço a vocês pelo ensinamento profissional e pessoal.

Agradeço aos participantes da banca examinadora por terem aceitado o meu convite.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, eles são a família que tenho em Belo Horizonte.

A Maureen, minha primeira e grande amiga mineira, agradeço por tudo que fez por mim desde o primeiro dia em que cheguei a Belo Horizonte.

Às minhas amigas Fernanda Barbosa e Juciane, pela amizade e por tudo o que aprendi com as nossas conversas.

À Silvia, que trabalha na limpeza do laboratório, pelo agradável convívio, carinho e brincadeiras.

Agradeço ao Dr. Carlos Henrique Nery Costa, pela orientação e amizade nos primeiros passos da minha carreira, a iniciação científica. Aos professores Sandra

Dantas, Romildo Soares, Janete Paranhos e Iranise Torres, pelo estímulo, apoio e amizade durante a minha graduação e após.

Ao professor e amigo Francisco Soares, pelas ótimas aulas que despertaram em mim a paixão pelas ciências biológicas. À professora e amiga Maria de Jesus e a todos os meus amigos que acreditaram em mim e me deram força durante todos esses anos: Diane, Gisele, Heurison, Michelly, Júlio César, Joxleide, Mônica, Flávio, Gleissany, Marcos Monturil, Silvana e Silvana Maciel.

A todos os colegas do Centro de Pesquisas René Rachou.

À coordenadora do curso de pós-graduação Dra. Virgínia Shall e ao diretor do Centro de Pesquisas René Rachou, Alvaro José Romanha.

Ao CNPq, FAPEMIG e FIOCRUZ, pelo financiamento deste projeto.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a conquista de mais essa vitória na minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 - Considerações gerais sobre a doença de Chagas.....	1
1.2 - Tratamento da doença de Chagas.....	5
1.3 - Susceptibilidade e resistência a drogas.....	6
1.4 - Variabilidade intra-específica do <i>T.cruzi</i>	6
1.5 - Estrutura genômica do <i>T.cruzi</i>	10
1.6 - O kDNA do <i>T. cruzi</i>	14
1.7 - Classificação geral do DNA repetitivo.....	14
1.8 - Elementos repetitivos em <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.9 - Funções dos elementos repetitivos.....	19
1.10 - Uso de elementos repetitivos no diagnóstico molecular da doença de Chagas e na classificação de cepas.....	20
2.0 JUSTIFICATIVA	24
3.0 OBJETIVO GERAL	26
3.1 - Objetivos específicos.....	26
4.0 METODOLOGIA	27
4.1 - Amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i> e outros Kinetoplastídeos.....	27
4.2 - Seqüências de DNA alvo e iniciadores específicos para diagnóstico e classificação de cepas do <i>T. cruzi</i>	29
4.3 - Extração de DNA.....	30
a) Método de fenol-clorofórmio.....	30
b) Método de lise – Amostras em papel de filtro.....	30
I – Sangue de camundongo.....	30
II – Fezes de <i>T.infestans</i>	30

4.4 - Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	31
4.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	31
4.6 - Purificação do produto de PCR.....	33
4.7 - Purificação de DNA em gel de agarose 1%.....	33
4.8 - Preparação de bactérias competentes.....	33
4.9 - Clonagem do DNA satélite (195 pb) no vetor TOPO.....	34
4.10 - Extração de plasmídeos recombinantes.....	34
4.11 - Sequenciamento de DNA.....	35
4.12 - Análise e edição de seqüências.....	35
4.13 - Montagem de árvores filogenéticas.....	36
4.14 - Desenho de iniciadores específicos.....	36
5.0 RESULTADOS.....	37
5.1 - Análise e escolha das seqüências para estudo.....	37
5.2 - Análise do elemento repetitivo E13.....	42
5.2.1 - Análise dos iniciadores O 1 e 2 e desenho de novos iniciadores.....	42
5.2.2 - Análises dos iniciadores TcE13 1 a 5.....	44
5.3 - Estudo do DNA satélite do <i>T. cruzi</i>	46
5.3.1 - Análise das seqüências nucleotídicas do DNA satélite do <i>T. cruzi</i>	46
5.3.1.1 - Identificação de polimorfismos de seqüências.....	46
5.3.1.2 - Relações filogenéticas entre as seqüências.....	51
5.3.1.3 - Desenho de novos iniciadores.....	53
5.3.2 - Análises da PCR utilizando diferentes combinações de iniciadores.....	55
5.3.2.1 - Análise dos iniciadores Diaz 7 e 8.....	55
5.3.2.2 - Análise dos iniciadores TcSat 1 e 5.....	60
5.3.2.3 - Análises dos iniciadores TcSat 3 Diaz 7 e TcSat 1 e 3.....	61
5.3.2.4 - Análise dos iniciadores TcSat 2 e 4.....	62
5.3.2.5 - Análises dos iniciadores TcSat 1 Diaz 7 e 8.....	65
5.3.2.6 - Análises dos iniciadores TcSat 4, Diaz 7 e 8.....	66
5.3.3 - Análises com amostras típicas de pesquisa de campo.....	70
5.3.3.1 - Ensaios com sangue de camundongos experimentalmente infectado com <i>T. cruzi</i> e coletado em papel de filtro.....	70
5.3.3.2 - Ensaios com DNA de creme leucocitário humano infectado com <i>T. cruzi</i>	75
5.3.3.3 - Ensaios com fezes de triatomíneos coletadas em papel de filtro.....	77

6.0 DISCUSSÃO	79
7.0 CONCLUSÕES	91
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
9.0 ANEXOS	102
9.1 - Anexo 1	102
9.2 - Anexo 2	104

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.....3
- Figura 2.** Alinhamento de 12 seqüências do fragmento do minicírculo do kDNA do *T. cruzi*, entre os iniciadores S 35 e S 36.....39
- Figura 3.** Alinhamento de 25 seqüências do DNA satélite (195 pb) do *T. cruzi* depositadas no banco de dados GenBank.....41
- Figura 4.** Perfil eletroforético do elemento E13 de 6 cepas do *T. cruzi*, utilizando os iniciadores O 1 e O 2.....42
- Figura 5.** Seqüência nucleotídica do elemento E13 do *T. cruzi* e a disposição dos iniciadores O 1 e 2 e TcE13 1 a 5 dentro da seqüência.....43
- Figura 6A.** Perfil eletroforético do elemento E13 de 6 cepas do *T. cruzi*, utilizando os iniciadores TcE13 1 e 2 e TcE13 2 e 3.....45
- Figura 6B.** Perfil eletroforético do elemento E13 da cepa Romano (ZB) do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcE13 1 e 2 e TcE13 2 e 3 e diluições ao décimo do DNA molde.....45
- Figura 6C.** Perfil eletroforético do elemento E13 de seis cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcE13 4 e 5.....45
- Figura 7.** Alinhamento das unidades repetitivas de 195 pb do DNA satélite do *T. cruzi*. As seqüências estão divididas de acordo com o zimodema das cepas de origem.....48
- Figura 8.** Alinhamento das unidades repetitivas de 195 pb do DNA satélite do *T. cruzi*. As seqüências estão divididas de acordo com a susceptibilidade das cepas ao BZ.....49
- Figura 9.** Árvore filogenética Neighbor-joining das 80 seqüências representativas do DNA satélite de 12 cepas do *T. cruzi*.....52

-
- Figura 10.** Seqüência nucleotídica de duas unidades repetitivas do DNA satélite do *T. cruzi* (390 pb) e a disposição dos iniciadores Diaz 7 e 8 e TcSat 1 a 5.....54
- Figura 11.** Alinhamento dos sítios complementares aos iniciadores Diaz 7 e 8 em 105 seqüências do DNA satélite (195 pb) do *T. cruzi* depositadas em bancos de dados.....56
- Figura 12.** Perfil de amplificação do DNA satélite de 30 cepas do *T. cruzi*, utilizando os iniciadores Diaz 7 e 8.....58
- Figura 13.** Perfil de amplificação do DNA satélite de cepas do *T. cruzi* dos zimodemas 1, 2 e B, utilizando os iniciadores Diaz 7 e Diaz 8. A figura também mostra a PCR utilizando DNA de *T. rangeli*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*.....59
- Figura 14.** Perfil eletroforético do DNA satélite de 6 cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcSat 1 e TcSat 5.....60
- Figura 15.** Perfil eletroforético do DNA satélite de 6 cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcSat 3 e Diaz 7.....61
- Figura 16.** Perfil eletroforético do DNA satélite de 6 cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcSat 2 e TcSat 4.....63
- Figura 17.** Perfil eletroforético do DNA satélite de 6 cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcSat 1, Diaz 7 e 8.....65
- Figura 18.** Perfil eletroforético do DNA satélite de 6 cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcSat 4, Diaz 7 e Diaz 8.....66
- Figura 19.** Perfil eletroforético do DNA satélite de 30 cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcSat 4, Diaz 7 e 8.....68
- Figura 20.** Perfil eletroforético do DNA satélite de 2 cepas do *T. cruzi*, com os iniciadores TcSat 4 e Diaz 7 e 8. Diluições ao décimo das cepas Colombiana (*T. cruzi* I), e Ernane (*T. cruzi* II) estão apresentadas na figura.....69

-
- Figura 21.** Perfil eletroforético do DNA satélite de sangue de camundongo infectado com a cepa Y do *T. cruzi*, extraído de papel de filtro com e sem proteinase K.....72
- Figura 22.** Perfil eletroforético da PCR multiplex utilizando excesso de DNA de camundongo ao qual foram adicionadas quantidades conhecidas de DNA do *T. cruzi*. A figura também mostra amostras de sangue de camundongos experimentalmente infectados com as cepas: Colombiana (*T. cruzi* I) e Y (*T. cruzi* II).....73
- Figura 23.** Perfil eletroforético da PCR multiplex utilizando excesso de DNA humano ao qual foram adicionadas quantidades conhecidas de DNA do *T. cruzi*. A figura também mostra amostras de DNA de creme leucocitário de 4 pacientes na fase aguda da doença de Chagas.....76
- Figura 24.** Perfil eletroforético da PCR multiplex de 5 amostras de DNA extraídas de fezes de *T. infestans* coletados no município de Mato Queimado – RS.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Marcadores moleculares usados para caracterização de <i>Trypanosoma cruzi</i> , segundo os grupos principais <i>T. cruzi</i> I e <i>T. cruzi</i> II.....	9
Tabela 2: Cepas e clones do <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizadas neste trabalho e sua classificação segundo o fenótipo de susceptibilidade a drogas e diferentes marcadores moleculares.....	28
Tabela 3: Iniciadores específicos para PCR do DNA satélite (195 pb) e elemento E13 do <i>T. cruzi</i>	29
Tabela 4: Programas utilizados na PCR do DNA satélite e do elemento E13 do <i>T. cruzi</i>	32
Tabela 5: Seqüências repetitivas do DNA do <i>T. cruzi</i> , selecionadas para este estudo.	37
Tabela 6: Distribuição por cepa das seqüências do DNA satélite (195 pb) do <i>T. cruzi</i> , utilizadas em nosso estudo.....	46
Tabela 7: Posição, tipo e freqüência dos polimorfismos do fragmento de 195 pb do DNA satélite do <i>T. cruzi</i> , exclusivos em cepas pertencentes ao zimodema 1.....	50
Tabela 8: Análise do perfil de amplificação de 30 cepas do <i>T. cruzi</i> utilizando os iniciadores TcSat 2 e 4.....	64
Tabela 9: Análise do perfil de amplificação de 24 amostras de DNA extraído de sangue de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> . Os iniciadores utilizados foram TcSat 4 e Diaz 7 e 8.....	74
Tabela 10: Análise do perfil de amplificação de 15 amostras de DNA extraído de fezes de <i>T. infestans</i> utilizando os iniciadores TcSat 4 e Diaz 7 e 8.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

APS – Persulfato de amônio
BZ – Benzonidazol
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
IPTG – Isopropil β D-tiogalactopiranosídeo
kDNA – DNA do cinetoplasto
LB – Meio Luria-Bertani
LINE – Elemento nuclear comprido intercalado
LIT – Triptose de infusão de fígado
LTR – Repetição terminal comprida
MEX – Mini-exon
MLEE – Eletroforese de enzimas multilocus
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
NFX – Nifurtimox
OD – Densidade ótica
OMS – Organização mundial de saúde
ORF – Moldura aberta de leitura
pb – Pares de base
PBS – Salina tamponada com fosfato
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PFGE – Eletroforese em gel de campo alternado
RAPD – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
rDNA – Porção terminal 3' do gene do RNA ribossomal 24S α
RFLP – Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
RLE – Elemento semelhante ao Retroposon
RNA – Ácido ribonucleico
SDS – Duodecil sulfato de sódio
SINE – Elemento nuclear curto intercalado
SIRE – Elemento repetitivo curto intercalado
SL – Sequencia líder ou mini-exon
SRE – Elemento repetitivo espaçador

TBE – Tampão tris-borato EDTA

TE – Tampão tris EDTA

TEMED – N,N,N',N' –tetrametil-etilenodiamina

UTR – Região não traduzida

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

Z1 – Zimodema 1

Z2 – Zimodema 2

ZB – Zimodema B

RESUMO

Nesse trabalho, descrevemos a busca por marcadores moleculares que permitam simultaneamente o diagnóstico da doença de Chagas e a classificação das cepas segundo o fenótipo de susceptibilidade a drogas, zimodema e/ou grupos I e II do *T. cruzi*. Inicialmente, selecionamos seqüências repetitivas do DNA do *T. cruzi* e iniciadores descritos para o diagnóstico da doença de Chagas. Analisamos as seqüências do elemento repetitivo E13, kDNA e o DNA satélite (195 pb). Os resultados com o elemento repetitivo E13 e seqüências do kDNA, mostraram uma grande variabilidade dessas seqüências, inviabilizando a busca de marcadores. Analisamos 160 seqüências do DNA satélite de 195 pb de 12 cepas do *T. cruzi* previamente caracterizadas segundo o fenótipo de susceptibilidade a drogas e zimodema. Estudos de filogenia mostraram a existência de dois grupos distintos, associados com os grupos I e II do *T. cruzi*. Observamos a presença de 8 polimorfismos exclusivos das cepas do grupo I do *T. cruzi*. Desenhamos iniciadores específicos para estes polimorfismos. Um sistema de PCR multiplex constituído pelos iniciadores TcSat 4 e Diaz 7 e 8 permitiram a classificação das cepas de *T. cruzi* nos grupos I e II. A sensibilidade foi de 10 fg, o que corresponde a 1/30 do DNA de um parasito. Amostras de DNA de outros tripanosomatídeos não produziram produto amplificado. Comparamos o perfil de amplificação do DNA satélite de 30 cepas de *T. cruzi* e 24 amostras de sangue de camundongos experimentalmente infectados com as cepas Colombiana (grupo I) e Y (grupo II) em papel de filtro. Em todas as amostras positivas foi possível a identificação dos grupos I e II. Para validarmos a técnica com amostras de campo, utilizamos 7 amostras de DNA do creme leucocitário de pacientes na fase aguda da doença de Chagas e 15 amostras de fezes de *Triatoma infestans* em papel de filtro. As amostras de pacientes foram grupo II e as amostras de *T. infestans* grupo I. Esses resultados estão de acordo com os dados descritos na literatura que mostram uma associação entre cepas do grupo I do *T. cruzi* e o ciclo silvestre do parasito e entre cepas do grupo II e o ciclo doméstico. O PCR multiplex que desenvolvemos permite a classificação das cepas nos dois grupos principais de *T. cruzi* sem, entretanto correlacioná-las à resistência a drogas. Apresentamos uma metodologia sensível, específica e rápida que poderá ser utilizada em amostras clínicas e de campo como ferramenta de diagnóstico molecular e classificação das cepas de *T. cruzi*.

ABSTRACT

In the present work, we describe our search for molecular markers that allow the diagnosis of Chagas' disease and strain classification simultaneously according to the drug susceptibility, zymodeme and/or groups I and II of *T. cruzi*. We selected DNA repetitive sequences from *T. cruzi* and primers described previously for diagnosis of Chagas' disease. We analyzed the sequences of the repetitive element E13, kDNA and satellite DNA (195 bp). The sequences of the repetitive element E13 and the kDNA were highly variable, making unfeasible the search for molecular markers. Polymorphism of the 160 satellite DNAs (195 bp) from 12 *T. cruzi* strains from different zymodemes and BZ susceptibility were determined. Phylogenetic studies showed the existence of two groups of sequences, associated with the groups I and II of *T. cruzi*. The existence of 8 polymorphisms exclusive to *T. cruzi* I strains, lead us to design specific primers for these polymorphisms. A system of PCR multiplex using primers TcSat 4, Diaz 7 and 8, allowed the strain classification of *T. cruzi* in the groups I and II. The sensibility was of 10 fg, that corresponds at 1/30 of the DNA of one parasite. This PCR multiplex was *T. cruzi* specific, did not amplifying DNA from other tripanosomatids. We compared the amplification of satellite DNA of 30 *T. cruzi* strains and 24 blood samples from mice experimentally infected with the Colombian (group I) and Y (group II) strains in filter paper. The samples were classified in groups I and II. In order to validate the technique with field samples, we used 7 samples of Buffy coat DNA from patients in the acute phase of Chagas' disease, and 15 samples from naturally infected *Triatoma infestans* feces collected in filter paper. The patients' samples were group II and the samples of *T. infestans* group I. Our results are consistent with the data described in the literature that show an association between strains of *T. cruzi* I and the Sylvatic cycle of the parasite and between strains of *T. cruzi* II and the domestic cycle. The PCR multiplex that we developed allows the *T. cruzi* DNA detection and the strain classification without correlating them to drug resistance. We presented a sensitive, specific and a fast methodology that can be used in clinical and field samples, as a tool for molecular diagnosis and strain classification of *T. cruzi* simultaneously.

INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre a doença de Chagas

A doença de Chagas é uma doença enzootica causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi* (família: Trypanosomatidae, ordem: Kinetoplastida). A doença se estende do sul dos Estados Unidos até o sul da América do Sul (WHO, 2004). A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que nos anos 80, antes do estabelecimento dos bem sucedidos programas de controle, haviam entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi* nas Américas (www.who.int/health-topics/chagas.html). A incidência na época foi estimada em torno de 300.000 novos casos por ano, alcançando em torno de 20% da população em países como a Bolívia. Esses dados foram modificados nas últimas décadas, especialmente devido aos programas de controle em larga-escala com inseticidas piretróides. Os programas de controle foram eficientes, uma vez que mostraram que os triatomíneos são altamente sensíveis aos inseticidas piretróides e tem baixa variabilidade genética e conseqüente baixa habilidade de resistir aos inseticidas (Schofield & Dias, 1999).

A doença de Chagas começou a se expandir da região andina no fim do século 19 e alcançou uma maior ascensão na primeira metade do século 20. Ela atinge pessoas que vivem em áreas rurais isoladas, com precárias condições sociais. Por isso, informações epidemiológicas suficientes sobre a magnitude ou sobre sua existência nem sempre estão disponíveis. A prevalência, morbidade e distribuição geográfica da doença foram determinadas apenas quando a importância diagnóstica de reações sorológicas e eletrocardiográficas foram reconhecidas, e em muitos países cerca de um século foi necessário para isto ocorrer. Com as migrações, muitas pessoas infectadas saíram das zonas rurais para cidades (Mallimaci *et al.*, 2001) e para outros países. Estima-se que algumas centenas de milhares de indivíduos chagásicos vivem atualmente nos Estados Unidos, Europa e Ásia.

Decisões políticas levaram à criação de programas governamentais, primeiro no sul do continente (Iniciativa do Cone Sul – 1991/92), e depois em países das Américas Andina e Central (Iniciativas da América Central e do Pacto Andino – 1997/98) (Moncayo, 1999). Paralelamente ocorreu o melhoramento na qualidade das transfusões de sangue, também devido ao aumento de indivíduos infectados com HIV. Como resultado, em cerca de 1,8 milhões de militares recrutados na Argentina, por

exemplo, a prevalência de sorologia positiva diminuiu de 5,8% em 1981 para 1,9% em 1993 (Segura *et al.*, 2000).

No Brasil, uma investigação sorológica nacional mostrou que havia 4,2% de pessoas infectadas na zona rural e a mortalidade era de 5,1 por 100.000 habitantes (Segura *et al.*, 2000). Durante a última década, a prevalência de sorologia positiva em crianças em idade escolar (7 a 14 anos) diminuiu para 0,14% (Silveira & Vinhaes, 1999). Em 2000, 10 dos 12 estados endêmicos do Brasil foram certificados como livres da transmissão da doença de Chagas vetorial e transfusional (WHO, 2000). O Ministério da Saúde tenta combater os focos da doença de Chagas nos estados do Rio Grande do Sul e na Bahia (Conselho Regional de farmácia do Tocantins, 2004).

A doença de Chagas apresenta algumas características associadas com a origem geográfica da cepa do *T. cruzi*, como: maior frequência de megaesôfago e megacólon no Brasil central (Cabral *et al.*, 1999) e rara ocorrência ao norte do rio Amazonas; diferenças na resposta ao tratamento etiológico, com altos níveis de cura na Argentina, Chile e no estado do Rio Grande do Sul; menor índice de transmissão congênita no Brasil comparado com Bolívia, Chile e algumas partes da Argentina.

Cerca de 100 espécies de mamíferos silvestres atuam como reservatórios da doença de Chagas. Ela é transmitida por insetos pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae. Estes insetos infectam animais selvagens durante o repasto sanguíneo, mantendo dessa forma o ciclo silvestre da doença (Kirchhoff *et al.*, 2004). Na luz do intestino médio do inseto vetor, o *T. cruzi* transforma-se em formas epimastigotas, multiplica-se e diferencia-se em tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante para o homem. A transmissão do *T. cruzi* ao homem ocorre através da deposição de fezes e urina do triatomíneo infectado sobre a pele danificada e pelas mucosas do hospedeiro no momento do repasto sanguíneo. Os tripomastigotas metacíclicos invadem diversos tipos de células do hospedeiro, transformam-se em amastigotas, se multiplicam e após um período aproximado de quatro dias, se diferenciam em tripomastigotas, que rompem as células infectadas e são liberados no meio extracelular. Esses tripomastigotas podem invadir células adjacentes ou cair na circulação sanguínea, onde serão ingeridos pelo inseto vetor durante a alimentação, mantendo o ciclo doméstico da doença, ou irão iniciar novos ciclos multiplicativos em outros tecidos (Tanowitz *et al.*, 1992) (Figura 1).

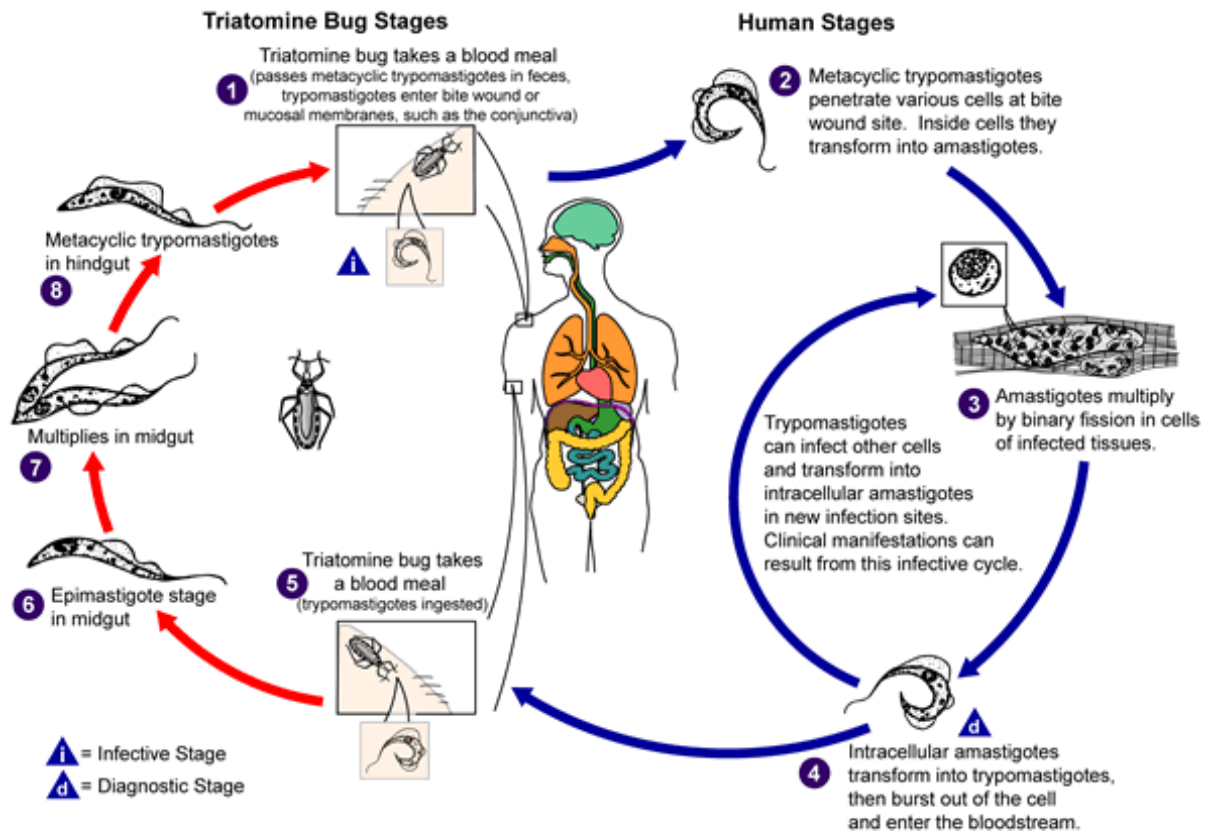


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: WHO, 2000.

Além da transmissão vetorial, outro mecanismo responsável por aproximadamente 10% dos casos, é a transfusão sanguínea. O risco de adquirir a infecção após receber uma transfusão de sangue de um doador infectado é de aproximadamente 20% (Schmunis *et al.*, 1999). Este é o principal mecanismo de transmissão em zonas urbanas. O terceiro mais importante mecanismo de transmissão é a congênita, com aproximadamente 5.000 a 18.000 casos por ano. Este tipo de

transmissão também pode ocorrer fora das áreas endêmicas. Outros mecanismos esporádicos de transmissão incluem acidentes de laboratório e transplantes de órgãos (Prata, 1994). Também foram descritos surtos de doença de Chagas devido à transmissão oral através de alimentos contaminados como carne, cana de açúcar ou suco de açaí (*Euterpe oleracea*) (Anais do XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2005).

A doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. A porta de entrada da infecção pode ser aparente ou inaparente. Quando aparente, pode ser ocular (sinal de Romaña) ou cutânea (Chagoma de inoculação). Durante a fase aguda da doença, o parasito está se disseminando e pode ser detectado por exame direto do sangue. Entretanto, na grande maioria dos pacientes essa fase passa despercebida por causa do não reconhecimento ou pela pobreza ou ausência de manifestações clínicas (Rassi *et al.*, 2000). Em torno de 5 a 10% dos pacientes sintomáticos morrem durante esta fase.

Os sinais e sintomas da fase aguda da doença de Chagas normalmente desaparecem após 4 a 8 semanas. Na maioria dos indivíduos a resposta imune é capaz de controlar a infecção, resultando numa redução drástica da parasitemia (Prata, 1994). A fase crônica da doença de Chagas pode ser clinicamente evidente após anos ou décadas da infecção inicial. Sintomas se desenvolvem em apenas 20 a 30% das pessoas clinicamente infectadas. As demais pessoas podem permanecer assintomáticas pelo resto da vida, caracterizando a forma indeterminada da doença. As manifestações mais comuns são o comprometimento do sistema cardíaco (forma cardíaca), digestivo (forma digestiva) ou de ambos (forma cardio-digestiva) (Brener, 1987). A natureza das modificações miocárdicas na fase crônica tem sido considerada por alguns como um fenômeno autoimune (Michailowsky *et al.*, 2003). Entretanto, a persistência do parasito em tecidos também tem sido demonstrada (Vago *et al.*, 2000).

Reativações da doença de Chagas foram descritas em pacientes com leucemia e com transplante de rins e coração. Imunossupressões podem reativar a doença de Chagas, ocasionando proliferação do parasito, lesões necróticas ou tumorais no cérebro (75%), e intensificação de miocardites (44%). Isto tem freqüentemente ocorrido em casos de coinfeção com HIV e em transplantes de órgãos. O diagnóstico laboratorial é realizado de acordo com a fase da doença, podendo o parasito ser detectado no sangue durante a fase aguda; nos demais estágios a parasitemia é muito baixa e o diagnóstico é estabelecido por detecção de anticorpos específicos usando várias técnicas (Prata, 1994).

1.2 Tratamento da doença de Chagas

Na doença de Chagas, raramente ocorre cura espontânea e o tratamento específico é controverso. O tratamento da doença de Chagas está limitado ao derivado 2-nitroimidazólico benzonidazol e ao derivado 5-nitrofurano nifurtimox. Ambos os compostos fazem parte de uma mesma família, a dos nitroheterocíclicos, no entanto possuem diferentes grupos químicos e apresentam diferentes mecanismos de ação contra o *T. cruzi*.

O nifurtimox é reduzido pela enzima tripanotiona redutase (Henderson *et al.*, 1988; Docampo *et al.*, 1981). O radical gerado pode reagir com o oxigênio molecular para gerar o ânion superóxido (O_2^-) e este produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela ação da enzima superóxido dismutase. Pode ocorrer a interação do H_2O_2 com o O_2^- produzindo o radical hidroxila (OH^-). Este radical é um dos mais perigosos radicais de baixa massa molecular, produzido por radiações ionizantes. Todos esses passos podem causar danos ao DNA (Olive, 1978) e lipídeos e formar peróxido orgânico (Tappel, 1973; Docampo *et al.*, 1981). Como o *T. cruzi* é deficiente nos mecanismos de detoxificação, ele se torna mais susceptível à ação tóxica destes compostos (Docampo & Stoppani, 1979; Docampo *et al.*, 1981; Morello, 1988).

O mecanismo de ação do benzonidazol ainda não está claro. Sabe-se que ele inibe o crescimento do *T. cruzi* sem estimular a produção de O_2^- e H_2O_2 . Assim, o efeito tripanosomicida do benzonidazol não depende de radicais de oxigênio como o nifurtimox (Moreno *et al.*, 1982; Maya *et al.*, 2003).

Ambas as drogas quando administradas na fase aguda da doença têm apresentado cura em 50-70% dos pacientes; entretanto, elas curam somente cerca de 8% dos pacientes na fase crônica (Prata, 1994). Elas também causam vários efeitos colaterais dose-dependente, podendo o tratamento ser interrompido. Os efeitos mais comuns são: hipersensibilidade, alterações do creme leucocitário e polineuropatia periférica. Existe um consenso em torno do uso dessas drogas nas seguintes circunstâncias: na profilaxia de contaminações acidentais, durante a fase aguda da doença e em reativações da infecção em indivíduos imunossuprimidos. No entanto, existem divergências em torno do tratamento específico durante a fase crônica, devido a dúvidas acerca dos índices de cura (menos de 10% para alguns autores).

1.3 Susceptibilidade e resistência a drogas

Diferenças na susceptibilidade de cepas do *T. cruzi* a drogas (HaberKorn, 1972; Andrade, 1985; Filardi & Brener, 1987) pode explicar, em parte, diferenças na eficácia das drogas no tratamento de hospedeiros vertebrados infectados com *T. cruzi*. A existência de cepas naturalmente resistentes ao benzonidazol e ao nifurtimox foi descrita anteriormente (Filardi & Brener, 1987). Além disso, diversos autores demonstraram que diferenças geográficas podem interferir na eficácia de regimes terapêuticos (Rassi, 1992). A grande variabilidade genética das populações de parasitos, a existência de cepas naturalmente resistentes, e a farmacocinética da droga explicam, em parte, diferenças na eficácia do tratamento.

Em um estudo realizado por Murta *et al.*, (1998), 45 cepas do *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes ao benzonidazol e nifurtimox foram analisadas em relação a 6 diferentes marcadores moleculares. Nesse estudo, o perfil heterozigoto (Zimodema B), agrupou exclusivamente cepas sensíveis e ocorreu predominantemente em áreas geográficas onde o tratamento da doença de Chagas tem sido relatado como mais eficaz, demonstrando que este zimodema está associado ao fenótipo de sensibilidade do *T. cruzi* a drogas (Murta *et al.*, 1998). O perfil isoenzimático Z1 e Z2 foram encontrados em populações do *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes a drogas. Também os estudos usando rDNA e MEX como marcadores mostraram que, as cepas do *T. cruzi* foram divididas nos grupos 1 e 2, independentemente do seu fenótipo de resistência a drogas, indicando que não existe correlação entre esses marcadores e susceptibilidade do parasito a drogas (Murta *et al.*, 1998).

A identificação de marcadores moleculares para susceptibilidade ou resistência do *T. cruzi* a drogas pode ser útil no prognóstico de cura da doença de Chagas. É possível que com o uso de técnicas de biologia molecular, a detecção da presença do parasito no sangue de pacientes chagásicos poderá ser realizada simultaneamente com a caracterização da susceptibilidade ou resistência da cepa do *T. cruzi* a drogas.

1.4 Variabilidade intra-específica do *T. cruzi*

A grande variabilidade de sintomas na doença de Chagas pode ser correlacionada com cepas específicas ou com marcadores genéticos do hospedeiro, embora seja provável que ambos influenciem o curso da infecção (Sturm *et al.*, 2003). Estudos experimentais mostram uma grande diversidade intra-específica no *T. cruzi*

evidenciada por diferenças na morfologia de formas sanguíneas (Brener, 1965), virulência e patogenicidade (Tekiel *et al.*, 1997), susceptibilidade a agentes quimioterápicos (Brener *et al.*, 1976; Filardi & Brener, 1987; Murta *et al.*, 1998), constituição antigênica e propriedades bioquímicas (Bongertz & Dvorak, 1983; Zingales *et al.*, 1984), propriedades imunológicas (Braga *et al.*, 1993) e infectividade em células hospedeiras (Doyle *et al.*, 1984).

Do ponto de vista patológico, é importante determinar a variabilidade genética de cepas isoladas de pacientes com doença de Chagas. Os avanços moleculares alcançados pela ciência têm tornado possível o estudo da variabilidade do *T. cruzi*. Esses polimorfismos têm se tornado ferramentas poderosas na avaliação da epidemiologia molecular, na pesquisa básica (evolução e genética de populações) e também na pesquisa aplicada (virulência, resistência a drogas e propriedades imunológicas) (Tibayrenc, 1995).

Cepas ou isolados são obtidos de vetores triatomíneos ou hospedeiros mamíferos incluindo humanos. Pacientes em áreas endêmicas podem estar infectados por múltiplos contatos com diferentes triatomíneos e esses podem alimentar-se em diferentes indivíduos infectados. Essa promiscuidade propicia a formação de populações multiclonais em hospedeiros e vetores, levando ao isolamento de cepas multiclonais correspondentes quando crescidas em cultura. Estudos moleculares têm confirmado que algumas cepas do *T. cruzi* são multiclonais, mas a prevalência geral de multiclonalidade não é conhecida. Análises de microsátélites (Oliveira *et al.*, 1998) demonstraram a multiclonalidade freqüente em cepas do *T. cruzi*.

A análise de isoenzimas (por Multilocus Enzyme Electrophoresis – MLEE) tem sido usada por diversos autores para identificar populações de parasitos. A caracterização de populações naturais do *T. cruzi*, inicialmente realizada com um pequeno número de marcadores de isoenzimas, sugeriu uma classificação em três grupos distintos que foram chamados zimodemas Z1, Z2 e Z3 (Miles *et al.*, 1978, 1980). Estudos realizados por Romanha e cols (1979) e Romanha (1982) verificaram a presença de 4 zimodemas distintos, denominados ZA, ZB, ZC e ZD. A comparação dos zimodemas descritos por Romanha com aqueles descritos por Miles, mostrou grande similaridade entre os zimodemas ZA e Z2; enquanto que os demais zimodemas foram distintos entre si. Desta forma, admite-se que no Brasil o *T. cruzi* esteja distribuído em pelo menos 6 grupos isoenzimáticos principais: Z1, Z2 ou ZA, Z3, ZB, ZC e ZD.

Posteriormente, esses estudos foram estendidos para incluir 15 loci gênicos codificantes para enzimas de 121 isolados do *T. cruzi*, compreendendo ambos os ciclos

doméstico e silvestre e com uma grande distribuição geográfica (dos EUA ao sudeste do Brasil e Chile). Estas análises aumentaram para 43 o número de cepas naturais definidas por isoenzimas, ou “clonets” (Tibayrenc *et al.*, 1986).

Com os avanços da biologia molecular, novas técnicas foram desenvolvidas como o polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) de kDNA (Morel *et al.*, 1980; Tibayrenc & Ayala, 1987), a avaliação do cariótipo molecular (Henriksson *et al.*, 1995), DNA “fingerprinting” (Macedo *et al.*, 1992), “Random Amplified Polimorphic DNA” (RAPD) (Tibayrenc *et al.*, 1993; Steindel *et al.*, 1993) e microssatélites (Oliveira, 1998). Essas técnicas mostraram a alta heterogeneidade genética do parasito.

Souto *et al.*, (1996) demonstraram que ampliações de seqüências distintas na porção terminal 3’ do gene do RNA ribossomal 24S α (rDNA) e seqüência do mini-exon indicam um polimorfismo em ambos os genes repetidos em tandem: 125 ou 110pb para rDNA e 300 a 350pb para o mini-exon. Os autores observaram uma associação dos produtos de 125pb rDNA com o de 300pb do mini-exon (definido como grupo 1). Os produtos de 110pb do rDNA com o de 350pb do mini-exon (definido como grupo 2) e a presença de ambos os produtos de amplificação do rDNA com o mini-exon do grupo 1 (grupo 1/2). Esses estudos mostram uma clara divisão do *T. cruzi* em duas grandes linhagens apresentando uma alta divergência filogenética.

Diversos isolados classificados por MLEE como Z1 e Z2 foram comparados com os grupos 1 e 2 do *T. cruzi* e mostraram que os isolados classificados como Zimodema 1 estão na linhagem 2, e os isolados do Zimodema 2 estão agrupados na linhagem 1 (Souto, 1996). Outras análises sugerem que as cepas do *T. cruzi* podem ser divididas em dois grupos principais. O fracionamento em bandas cromossômicas por PFGE e hibridização com diversas sondas indicaram uma certa correlação entre padrões de cariótipo e os zimodemas clássicos Z1 e Z2 (Henriksson, 1995). Análises de isoenzimas e RAPD em cepas do *T. cruzi* (Tibayrenc, 1995) sugerem que *T. cruzi* pode ser subdividido em duas linhagens filogenéticas principais, cada uma contendo considerável heterogeneidade. A análise filogenética do *T. cruzi*, baseada em microssatélites revela uma grande distância genética entre cepas, entretanto o padrão de dispersão das cepas na rede Wagner está de acordo com os dois grupos do *T. cruzi* descritos por Souto *et al.* (1996) (Oliveira, 1998).

A ausência de uma nomenclatura comum dificulta uma correlação com as complexas manifestações clínicas e epidemiológicas da doença. Assim, em abril de 1999, durante o Simpósio Internacional Comemorativo dos 90 anos da Descoberta da Doença de Chagas, no Rio de Janeiro, foi adotada a subdivisão da espécie *T. cruzi* em

duas linhagens principais, tendo sido oficializada uma nomenclatura inicial *T. cruzi I* e *T. cruzi II*. *T. cruzi I* é extremamente disperso dentro do ciclo silvestre e pode representar a forma original do *T. cruzi*. Ele não é freqüentemente encontrado em países do cone sul (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), mas é também a única forma encontrada em infecções humanas ao norte da região amazônica. *T. cruzi II* é encontrado associado com pacientes e com *Triatoma infestans*. Ambos, *T. cruzi I* e *T. cruzi II* estão associados com lesões cardíacas em infecções humanas, mas foi visto que apenas *T. cruzi II* está associado também com lesões do trato digestivo (Anonymous, 1999).

Alguns dos marcadores moleculares utilizados para classificação do *T. cruzi* e sua correlação com os grupos principais *T. cruzi I* e *T. cruzi II* estão apresentados na Tabela 1. Alguns grupos foram considerados como prováveis híbridos e, havendo a possibilidade de uma classificação errônea nos grupos I e II, foi estabelecido que poderiam ser denominados apenas *T. cruzi* sem outra especificação, até que outros estudos pudessem clarear as relações filogenéticas do grupo (Anonymous, 1999).

Tabela 1

Marcadores moleculares usados para caracterização de *Trypanosoma cruzi*, segundo os grupos principais *T. cruzi I* e *T. cruzi II*. Fonte: Macedo *et al.*, 2004.

Biological and molecular markers used for characterization of <i>Trypanosoma cruzi</i> sub-division ^a			
<i>T. cruzi I</i>	<i>T. cruzi II</i>	Hybrid	Reference
Type III	Type II	Type I	Andrade (1974)
Strain-group 1	Strains-group 2		Miles et al. (1977)
Type 1	Type 2		Miles et al. (1978)
Zymodeme 1	Zymodeme A	Zymodeme B	Romanha et al. (1979)
Group 1	Zymodeme 2	Zymodeme 3	Barret et al. (1980)
Type 2 (PNA)	Group 2		Ebert (1982)
Braz ZI	Type 1 (WGA)		Schottelius (1982)
Group A	Braz Z2	Bol Z2	Tibayrenc & Miles (1983)
Chilean Z1	Group B		Zillman & Ebert (1983)
Isoenzyme strain (IS) 1	Chilean Z2a	Chilean Z2b	Miles et al. (1984)
Zymodeme 17	IS 2e	IS 2	Tibayrenc et al. (1984)
DNA group 1	Zymodeme 30	Zymodeme 39	Tibayrenc & Ayala (1988)
Ribodeme II	DNA group 2		Muhlpfordt & Berger (1990)
Group I	Ribodeme I		Clark & Pung (1994)
Lineage II	Group II	Genotype 39	Tibayrenc (1995)
Biodeme III	Lineage I	Group 1/2	Souto et al. (1996)
Group II	Biodeme II	Biodeme I	Andrade & Magalhães (1997)
1st Major Clade	Group I		Nunes et al. (1997)
Clade A	2nd Major Clade	Lower Clade	Tibayrenc (1998)
Clade A	Clade C	Clade B	Machado & Ayala (2001)
	Clade C	Clade B	Augusto-Pinto et al. (2003)

a: modified from Momen (1999)

1.5 Estrutura genômica do *T. cruzi*

O tamanho do genoma do *T. cruzi* foi estimado por diferentes métodos (análise da cinética de renaturação, microfluorometria, citometria de fluxo, análises químicas, cariótipo molecular). Em estudos de renaturação, a complexidade do genoma do *T. cruzi* foi estimada em $1,8 - 2,5 \times 10^8$ pares de bases (Castro *et al.*, 1981; Lanar *et al.*, 1981). O conteúdo total de DNA (nuclear e cinetoplasto) varia de 0,12 a 0,33pg por célula (Lanar *et al.*, 1981; Kooy *et al.*, 1989; Thompson & Dvorak, 1989; McDaniel & Dvorak, 1993).

Uma característica marcante do *T. cruzi* é que o conteúdo total de DNA varia em diferentes cepas ou entre clones derivados de uma mesma cepa (Castro *et al.*, 1981; Lanar *et al.*, 1981; Kooy *et al.*, 1989; Thompson & Dvorak, 1989; McDaniel & Dvorak, 1993; Dvorak *et al.*, 1982). Esta variabilidade pode ter implicações na organização genômica do parasito, como por exemplo, no número de repetições de determinados genes (Henriksson *et al.*, 1996). O tamanho do genoma do *T. cruzi* é relativamente superior ao de outros protozoários parasitos, como por exemplo, *Leishmania* (45-65 x 10^6 pb) e *T. brucei* (25 x 10^6 pb). Porém, a complexidade do genoma do *T. cruzi* é significativamente inferior à do genoma humano, cujo tamanho é da ordem de 3.000 x 10^6 pb (Silveira, 2000).

O material genético do *T. cruzi* está organizado em pequenos cromossomos que se condensam fracamente durante a divisão celular. Desse modo, uma análise por métodos convencionais de citogenética não é possível (Solari, 1980). O desenvolvimento da técnica de eletroforese em gel de campo alternado (PFGE) tem viabilizado a separação de cromossomos intactos de eucariotos inferiores, como o *T. cruzi* (Gibson & Miles, 1986; Henriksson *et al.*, 1990, 1995 e 1996). Conforme observado por PFGE, o genoma nuclear do parasito apresenta alta plasticidade. Os tamanhos e número de bandas cromossômicas variam entre cepas e clones do parasito (McDaniel & Dvorak, 1993; Dvorak *et al.*, 1982).

O cariótipo molecular do clone CL Brener, referência para o projeto genoma, apresenta um perfil cromossômico muito complexo, com 20 bandas cromossômicas abrangendo de 0,45 Mpb a 3,5 Mpb: 12 bandas de 3,5 a 1,0M pb e 8 bandas cromossômicas intermediárias de 0,45 a 1,0 Mpb. A distribuição de fluorescência do brometo de etídio não é a mesma para todas as bandas cromossômicas, indicando a existência de uma mesma banda com dois ou mais cromossomos homólogos ou a

existência de cromossomos heterólogos com o mesmo tamanho (aneuploidia) (Cano *et al.*, 1995; Santos, 1997).

Análises no cariótipo sugerem que o *T. cruzi* é diplóide e que seu genoma está distribuído em pares homólogos de cromossomas, que geralmente diferem em tamanho. A hibridização de bandas cromossômicas com sondas específicas de DNA revelou uma grande diversidade no cariótipo entre cepas do *T. cruzi*. Henriksson *et al.*, (1996) sugerem que a amplificação de seqüências repetitivas de membros de famílias gênicas contribui para uma maior variação de tamanho dos cromossomos. Elementos repetitivos estão envolvidos na geração de polimorfismos no tamanho cromossômico em outros protozoários parasitos. Dois desses elementos altamente repetitivos são o DNA satélite de 195pb e a repetição E13, que correspondem a aproximadamente 9% e 7% do genoma, respectivamente. Uma possibilidade interessante é que amplificações de seqüências repetitivas contribuam significativamente no aumento do tamanho dos cromossomos em cepas pertencendo ao zimodema 2 clássico (Henriksson, 1996).

Os dados do estudo de polimorfismo de tamanho dos cromossomas têm sido usados para obter informações evolucionárias dos grupos do *T. cruzi*. Uma certa correlação foi encontrada entre pares de hibridização e a divisão das cepas nas duas linhagens principais (Henriksson *et al.*, 1996; Pedroso *et al.*, 2003). Análises da variação do tamanho dos cromossomas têm sido utilizadas para medir a distância entre duas espécies de *Leishmania* (Dujardin *et al.*, 1995). Esta pesquisa foi baseada na hipótese de que o genoma dos tripanosomatídeos é diplóide e que o polimorfismo no tamanho dos cromossomas é um reflexo de rearranjos dos genes. Os autores assumem que quanto maior a diferença no tamanho entre os cromossomas homólogos de diferentes cepas, mais divergente serão estas cepas (Dujardin *et al.*, 1995).

Recentemente foi concluído sequenciamento genômico da cepa CL-Brener do *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005). Os autores mostraram que mais de 50% do genoma do parasito é constituído de seqüências repetidas, que incluem transposons e genes múltiplas cópias. Grande parte dos genes do *T. cruzi* que codificam proteínas estão presentes em múltiplas cópias na célula. Genes que codificam proteínas “housekeeping” e estruturais, RNA polimerases, histonas, cisteino-proteases, proteínas ribossomais, actina, Hsp70, tubulinas, calmodulinas, ubiquitinas, antígenos de superfície e enzimas da via glicolítica, estão organizados como alelos repetidos em tandem no genoma do parasito (Michels, 1990; Ullu & Nilsen, 1995, El-Sayed *et al.*, 2005). Existe alguma correlação entre o número de cópias de um gene e a quantidade de seu produto na

célula. Proteínas e RNA's altamente abundantes são codificados por genes com múltiplas cópias (Michels, 1990).

Estima-se que o genoma diplóide do *T. cruzi* contenha 22.570 proteínas, das quais 12.570 representariam pares alélicos (El-Sayed *et al.*, 2005). A maioria dos genes codificadores de proteínas ou RNA caracterizados neste parasito estão presentes em duas ou mais cópias. Estas cópias podem estar localizadas em uma única região do cromossoma (um único *locus* contendo 2 ou mais cópias do gene) ou em diferentes cromossomas (2 ou mais *loci* contendo cada um deles duas ou mais cópias do gene) (Silveira, 2000). A tendência do *T. cruzi* em duplicar os seus genes e agrupá-los em tandem pode estar relacionada com vários fatores. O genoma do *T. cruzi* parece ser bastante flexível, ocorrendo constantes modificações devido à amplificação e translocação de seqüências gênicas. A presença de múltiplas cópias de genes pode ser uma maneira encontrada pelo parasito de compensar eventuais perdas essenciais durante essas mudanças do genoma. Essa organização em tandem também pode estar relacionada com a transcrição policistrônica existente em tripanossomas, o que facilitaria a síntese e manutenção dos níveis de mRNAs na célula (Silveira, 2000).

Não têm sido observadas as presenças de introns nos genes dos tripanosomatídeos, ou de elementos comuns nos promotores eucariotos, como caixas TATA (Perry & Agabian, 1991; Ajioka & Swindle, 1993; Nakaar *et al.*, 1994). Existe uma tendência em se agrupar genes não relacionados em certas partes do genoma de tripanossomos, formando unidades de transcrição policistrônicas. Os tripanosomatídeos transcrevem longos pré-mRNAs policistrônicos que devem ser processados em mRNAs individuais antes de serem traduzidos (processo conhecido como trans-splicing). Durante este processo, uma seqüência nucleotídica líder, conhecida como "splice leader" (SL) ou mini-exon, é transferida para a extremidade 5' de cada mRNA individual (Nilsen, 1992).

A seqüência "splice leader" é derivada de um RNA codificado por genes localizados em um ou dois cromossomas, dependendo da cepa do *T. cruzi* (Wagner & So, 1990; Cano *et al.*, 1995). A SL está teoricamente presente em todos os mRNAs do *T. cruzi* (Walder *et al.*, 1986) e sua função exata ainda não é conhecida. Existem evidências de que a SL confere estabilidade ao mRNA, impedindo a sua degradação, auxiliando também a interação do mRNA com os ribossomas. Transcritos sem a SL perdem a estabilidade e não são traduzidos (Ullu *et al.*, 1996; Silveira, 2000).

Os mRNAs dos tripanosomatídeos apresentam na extremidade 3' uma cauda composta de cerca de 30 resíduos de adenina (cauda poli A). Porém, ao contrário dos eucariotas superiores, os mRNAs dos tripanosomatídeos não apresentam uma seqüência consenso para a adição dos resíduos de adenina (Vanhame & Pays, 1995; Silveira, 2000).

Vários mRNAs do *T. cruzi* possuem uma extensa região 3' não traduzida (Franco *et al.*, 1993; Araya *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1995). Essa região está situada entre o códon de terminação e o início da cauda poli A, chamada 3' UTR (untranslated region). Experiências com parasitos transfectados com o gene amastina mostraram a presença na região 3' UTR de seqüências específicas capazes de regular a expressão gênica de maneira estágio-específica (Teixeira *et al.*, 1995; Nozaki & Cross, 1995; Silveira, 2000). Essas seqüências podem interagir com fatores capazes de estimular ou inibir a expressão gênica, influenciando na estabilidade do mRNA (Silveira, 2000).

A regulação da expressão gênica no *T. cruzi* ocorre principalmente a níveis pós-transcricionais. Essa regulação ocorre no nível do processamento de transcritos primários (trans-splicing e poliadenilação), da estabilidade do mRNA ou dos produtos da tradução (Vanhame & Pays, 1995; Teixeira, 1998; Ávila *et al.*, 2001). Sabe-se que os mRNAs do *T. cruzi* podem ser estocados no citoplasma numa forma de reprimir a transcrição (Goldenberg *et al.*, 1985), sugerindo que a mobilização do mRNA pelos polissomas pode ser um mecanismo de regulação pós-transcricional da expressão de alguns genes em tripanosomatídeos (Ávila *et al.*, 2001).

Diversos estudos baseados em análises de polimorfismos de isoenzimas (Bogliolo *et al.*, 1996), análises de RFLP e PFGE (Henriksson *et al.*, 1996; Bastrenta *et al.*, 1999) e microssatélites (Oliveira *et al.*, 1998 e 1999), apresentam evidências convincentes de que o *T. cruzi* é diplóide. No entanto, também têm sido apresentados dados sugerindo a ocorrência natural de aneuploidias em *T. cruzi* (McDaniel & Dvorak, 1993; Henriksson *et al.*, 1996). Desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg e forte desequilíbrio de anelamento sugerem que a reprodução sexual é rara ou ausente e que a estrutura populacional envolve linhagens clonais independentes, com eventos ocasionais de hibridização (Ayala, 1993; Tibayrenc, 1995; Oliveira *et al.*, 1998; Bastrenta *et al.*, 1999). Estudos com microssatélites mostraram que diversas cepas, especialmente aquelas isoladas de fontes não humanas, apresentaram mais de dois alelos em muitos *loci*, demonstrando que eles são multiclonais (Oliveira, 1998).

1.6 O kDNA do *T. cruzi*

Nos tripanossomatídeos, a mitocôndria apresenta características peculiares, albergando uma rede complexa de moléculas circulares de DNA denominada de cinetoplasto ou kDNA (Silveira, 2000). O kDNA consiste de uma rede de moléculas de DNA circular que constitui cerca de 20 – 25 % do DNA total do parasito. O tamanho e a forma do kDNA é variável em diferentes estágios do desenvolvimento (Brener *et al*, 1992).

O kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares que diferem em tamanho e função: os minicírculos e maxicírculos. Os minicírculos possuem cerca de 1.400 pb e estão presentes em 10.000 a 20.000 cópias por célula. Eles possuem quatro regiões de 120 a 160 pb, conservadas entre si e entre diferentes isolados e cepas do *T. cruzi*. Essas regiões contêm as origens de replicação do DNA. As regiões variáveis por sua vez têm cerca de 280 a 320 pb (Silveira, 2000).

Os maxicírculos possuem cerca de 40.000 pb de tamanho, e o número de cópias por célula varia de 20 a 50. Os genes das proteínas mitocondriais (citocromo oxidases, citocromo b, ATPases, NADH desidrogenase) e dos rRNAs mitocondriais estão localizados no maxicírculo. Portanto, pode-se considerar o maxicírculo como sendo análogo ao DNA mitocondrial dos demais eucariontes (Silveira, 2000).

1.7 Classificação geral do DNA repetitivo

Seqüências repetitivas de DNA constituem uma substancial proporção do genoma de organismos superiores. Nestes organismos, essas seqüências foram denominadas “egoístas”, pois estão mantidas apenas pela sua habilidade de se replicar dentro do genoma. No entanto, uma explicação alternativa para sua manutenção é que eucariotas tendem a preservar uma vasta abundância de material genético redundante que permita interações de genes e suas unidades regulatórias (Requena, 1996).

As seqüências repetitivas podem ser divididas em dois grandes grupos: repetições agrupadas em tandem e repetições dispersas. É provável que estas diferentes organizações genômicas derivem dos processos de amplificação que geraram cada uma delas. Enquanto repetições em tandem podem originar outras por recombinação ou por mecanismos de replicação diferencial, a existência da maioria das seqüências de DNA repetidas dispersas pode ser explicada por mecanismos de retroposição e transposição (Requena, 1996; Wickstead *et al.*, 2003).

As seqüências de DNA repetidas em tandem, ou DNA satélite, foram subdivididas em três classes. Microsatélites estão organizados em repetições de 2-5 pb, com arranjos de tamanho médio de 100 pb. Minisatélites são constituídos por arranjos com repetições em torno de 15 pb e tamanhos hipervariáveis entre 0,5-3,0kb. A terceira classe, as seqüências satélites (ou macrossatélites), compreendem unidades de repetição de 5-200pb, tipicamente organizados como grupos de megabases localizados em regiões heterocromáticas dos cromossomos (Requena, 1996).

Repetições dispersas representam geralmente cópias inativas de elementos transponíveis atualmente ou historicamente ativos. Eles também apresentam três tipos principais. Elementos transponíveis por meio de DNA (DNA transposons) e duas classes de retroelementos. Os retroelementos LTR (long terminal repeat), que sofrem transcrição reversa a partir de intermediários de RNA, duplicam-se e são transpostos como DNA de fita dupla. Por outro lado, os retroelementos non-LTR consistem de pequenos (SINE) ou longos (LINE) elementos dispersos que são transpostos por transcrição reversa de um mRNA diretamente no sítio de integração. Os retroelementos LTR são freqüentemente referidos como retrotransposons e os non-LTR como retroposons (Wickstead *et al.*, 2003). Foi sugerido que a maquinaria enzimática de elementos LINE são responsáveis pela integração de elementos SINE e de pseudogenes processados (Requena, 1996).

1.8 Elementos repetitivos em *Trypanosoma cruzi*

DNA satélite

A primeira seqüência repetitiva nuclear descrita no genoma do parasito foi uma seqüência de DNA satélite, isolada como uma fração de DNA rapidamente sedimentada após centrifugação em gradiente de sacarose do DNA celular digerido com *BspI* (Requena, 1996). O tamanho da unidade de repetição, é de 195 pb. O número de repetições foi estimado por "dot-blot" é de aproximadamente 120.000 repetições por genoma, baseado no conteúdo de DNA de 0,33pg por célula do parasito (Gonzalez, 1984).

Embora tenha sido postulado que esse elemento esteja localizado em minicromossomos, experimentos usando PFGE têm demonstrado que tais minicromossomos não existem em *T. cruzi*, e as seqüências de DNA satélites estão distribuídas em muitos, mas não todos, os cromossomos do parasito (Requena, 1996).

Elemento E13

Além do DNA satélite repetido em tandem, o genoma de *T. cruzi* contém diversas famílias de seqüências de DNA repetitivas dispersas apresentando características de seqüências SINE. A primeira destas seqüências, isolada com base nas propriedades da cinética de reassociação de seqüências de DNA repetitivas foi o elemento E13 (Requena, 1996). O tamanho da seqüência é de 1025 pb com o número de cópias estimado por dot-blot de 1 e 2 x 10⁴ cópias por genoma (para a cepa Maracay), o que corresponde a aproximadamente 6,7% do DNA total do parasito (assumindo que este seja de 2,5 x 10⁸ pb) (Requena *et al.*, 1992).

A família de elementos E13 é altamente polimórfica. Alguns membros dessa família podem estar dispersos como cópias isoladas enquanto outros estão organizados em arranjos em tandem. Comparações de seqüências do elemento E13 têm apresentado certa homologia com seqüências do genoma de *T. cruzi*. Por exemplo, foi observada homologia entre o elemento E13 e o pseudogene 24Sα rDNA, com uma identidade de 77% das seqüências na região entre as posições 1406 e 1527 do pseudogene. Uma região do elemento E13 tem 73% de identidade com uma região localizada “upstream” do sitio acceptor de splice entre as posições 162 e 246 do fragmento de DNA contendo o gene do antígeno epimastigota específico gp72. Trabalhos de dois grupos independentes descreveram a existência de seqüências de DNA repetitivas homólogas ao elemento E13, dentro de regiões intergênicas de certos agrupamentos de genes. Os polimorfismos existem provavelmente devido à alta taxa de mudanças evolutivas nas seqüências ao nível de nucleotídeos. Isto foi observado na maioria das unidades de repetição da família E13, que não têm os mesmos sítios de restrição e cujos oligonucleotídeos revelam diferentes padrões de hibridização com DNA total. Além disso, os dados mostram claras diferenças entre os elementos E13 da cepa Maracay e Y (Requena, 1992 e 1996).

SIRE

Requena (1996) descreveu uma seqüência relacionada ao E13 na região intergênica de genes de H2α repetidas em tandem. Interessantemente, a seqüência relacionada ao E13 está presente em apenas um de dois arranjos em tandem desses genes. Vazquez e colaboradores encontraram um elemento de repetição longa de 428pb na região intergênica de certos, mas não todos, genes de P2β de *T. cruzi*. O elemento, nomeado SIRE (Short Interspersed Repetitive Element) tem 2.000 cópias por genoma e apresenta 95% de identidade com os primeiros 122pb da seqüência do E13

e é altamente conservado, em tamanho e seqüência nucleotídica, com o elemento repetitivo encontrado nos genes H2 α (Requena, 1996).

C6

Araya *et al.* (1997) apresentou a caracterização molecular de uma seqüência de DNA medianamente repetitiva, nomeada C6, isolada do genoma de *Trypanosoma cruzi*. C6 é um elemento repetitivo composto por três sub-regiões, definidas com base na similaridade com outras seqüências genômicas. A sub-região 1, do nucleotídeo 183 ao nucleotídeo 281, possui 65% de identidade com o elemento repetitivo E22. A região central (sub-região 2) de 962 pb, não apresenta homologia com outra seqüência de DNA do parasito. A sub-região 3, do nucleotídeo 1243 ao nucleotídeo 1433 apresenta alta identidade com seqüências repetitivas associadas a diversos genes de *T. cruzi*: 24S α rDNA, histona H2 α , a proteína ribossomal P2 β e a proteína transportadora de hexose. A maior parte dessas homologias é devido à presença na sub-região 3 de uma forma truncada do móvel SIRE.

O número de cópias do elemento C6 é de aproximadamente 1000 por genoma haplóide, considerando um conteúdo genômico haplóide de $1,8 \times 10^8$ pb. Ao se hibridizar sondas de C6 com DNA genômico digerido com várias enzimas de restrição, um perfil complexo de hibridizações foi obtido sugerindo um alto nível de dispersão e polimorfismos de restrição da seqüência C6.

Pequenos motivos repetitivos são comumente encontrados dentro de elementos repetitivos extensos e podem estar implicados na recombinação e/ou em mecanismos de conversão gênica. Entretanto, o mais interessante foi a presença de uma forma truncada de SIRE na terminação de elementos C6, E12 e E13. É possível que SIRE e seqüências com a terminação de C6 podem ter uma origem comum. Uma hipótese plausível é que C6 pode ter surgido pela inserção de sua porção central em um elemento SIRE. Nós podemos especular que a unidade repetitiva C6 resulta de recombinação (ou conversão gênica) envolvendo SIRE, seguido por amplificação gênica. Durante esse processo, SIRE perde parte de sua porção 5'. Retroposons em geral têm uma tendência de inserir cada outro gerando composições que são capazes por si próprias de se propagarem como simples transposons (Araya *et al.*, 1997).

E12 e E22

Duas outras seqüências genômicas altamente repetitivas dispersas (nomeadas E12 e E22) foram descritas no genoma de *T. cruzi*. O número de cópias dos elementos

E12 e E22 é 5.600 e 7.200, respectivamente, por genoma. A análise da seqüência do E12 mostra que ela é formada por três sub-regiões com homologia com outras seqüências genômicas. O elemento E22 foi isolado e seqüenciado e apresenta homologia com genes de *T. cruzi* previamente descritos. Os diferentes perfis de hibridização das bandas cromossômicas de *T. cruzi*, separadas por PFGE, hibridizadas com os elementos E13, E12 ou E22 indicam que a distribuição cromossômica de cada um desses elementos varia significativamente. Também foi apresentado que esses elementos repetitivos dispersos são altamente polimórficos entre as cepas do parasito (Requena, 1996).

RLE

Outro elemento, nomeado RLE (retroposon-like element), foi encontrado na região intergênica separando dois genes ligados em tandem codificantes para a glicosomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi*. A seqüência RLE tem 317pb, e tem propriedades de elementos SINE. Formas truncadas desse elemento repetitivo são também encontradas flanqueando regiões da repetição do gene. Análises de southern blot usando RLE como sonda revelaram uma grande distribuição das seqüências relacionadas a RLE no genoma. Os autores observaram a existência de uma limitada homologia de seqüência entre os elementos RLE e E13 em uma região comum rica em T (Requena, 1996).

SRE

Três outros tipos de seqüências repetitivas, designadas elementos repetitivos espaçadores (SRE) foram identificadas no espaço intergênico ribossomal de *T. cruzi*. Os elementos SRE são formados por repetições relativamente pequenas (43-145pb) mostrando mudanças em nucleotídeos, variabilidades incluindo inserções e deleções (Requena, 1996).

CZAR

No genoma de *T. cruzi*, um retrotransposon non-LTR sítio específico de 6,0 kpb, nomeado CZAR, foi descrito. Como outros retrotransposons non-LTR sítio específicos de tripanosomatídeos, os retrotransposons CZAR estão localizados nos genes do miniexon (Requena, 1996).

L1Tc

Martin *et al.* (1995) caracterizou um cDNA (denominado L1Tc ou B11) de *T. cruzi* (cepa Tulahuén) correspondente a um novo non-LTR (long Terminal Repeat). O transcrito tem na região 3' um fragmento de uma seqüência de DNA altamente repetitiva (E12A). Possui 3 prováveis ORF's, das quais a ORF3 é codificante para uma proteína "gag-like" mostrando motivos de cisteínas não usuais presentes em todos os elementos non-LTR tripanosomatídeos. Seqüências com homologia para transcriptases reversas são encontradas em L1Tc. O número de cópias do L1Tc é 2.000, cada unidade tem 5kb e ele é encontrado disperso em diversos cromossomos no genoma de *T. cruzi*.

1.9 Funções dos elementos repetitivos

Embora a função precisa das seqüências repetitivas em genomas eucarióticos permaneça obscura, a descrição que as seqüências de DNA repetitivas dispersas está também presente nos genomas de procariotos sugere um papel universal para esta classe de seqüências. Funções postuladas para as seqüências repetitivas procarióticas têm incluído papel na regulação gênica, tradução diferencial de unidades genéticas como em "operons" policistrônicos e em retroregulação por estabilização de mRNAs ativos.

As seqüências repetitivas podem estar envolvidas na regulação da expressão gênica. De fato, o elemento RLE localizado em tandem com o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e o elemento SIRE localizado em tandem com o gene P2 β estão se constituindo no sítio acceptor 3' para trans-splicing. Entretanto, uma vez que loci de P2 β que não possuem o elemento SIRE também estão transcricionalmente ativos, sugeriu-se que as diferentes distribuições de SIRE nos genes de P2 β ribossomal podem influenciar o nível de expressão gênica ou a estabilidade dos transcritos.

Por outro lado, alguns elementos repetitivos dispersos têm atividade de promotor transcricional e sua expressão é regulada durante o desenvolvimento. Uma vez que seqüências RIME-like estão presentes no retrotransposon non-LTR L1Tc, com homologia ao elemento RIME de *T. brucei*, elas podem funcionar como um promotor interno. Se for este o caso, o *T. cruzi* "esconde" promotores que podem ser localizados dentro de elementos transponíveis altamente abundantes no parasito. É interessante observar, porém que o elemento repetitivo E12A presente na terminação 3' do retrotransposon L1Tc funciona como um sítio de adição de poli(A). A função do

elemento E12A pode não ser restrita a sinalização para adição de poli(A) do retrotransposon L1Tc, uma vez que o elemento tem sido encontrado associado a outros locais do genoma. Os autores propõem que eles podem influenciar na estabilidade de RNAs, como tem sido registrado para elementos LINE presentes na região 3'UTR do mRNA da caseína E de cabra (revisado por Requena, 1996).

1.10 Uso de elementos repetitivos no diagnóstico molecular da doença de Chagas e na classificação de cepas

O significado biológico ou funcional da maioria das seqüências de DNA repetitivas permanece obscura e especulativa. Em tripanosomatídeos, as seqüências de DNA repetitivo tem sido alvo para pesquisas, uma vez que essas seqüências podem desempenhar um importante papel na estrutura genômica e na expressão gênica, e também podem ser usadas para detecção com alta sensibilidade de parasitos e classificação das cepas. Certos elementos de DNA repetitivos podem ser empregados como ferramentas versáteis para diagnóstico de patógenos. A maioria das seqüências altamente repetitivas isoladas do genoma de *T. cruzi* são espécies-específicas e as sondas derivadas dessas seqüências podem ser usadas como excelentes ferramentas para propósitos de diagnóstico. Também, a rápida mudança evolutiva no padrão de dispersão das seqüências repetitivas tornam estas seqüências úteis para estudos de classificação de cepas (Martin, 1995; Requena, 1996).

Estudos realizados por Gonzalez *et al.* (1984) indicam o elemento repetitivo de 195 pb como candidato ideal para diagnóstico da doença de Chagas. Hibridizações de sondas do elemento de 195 pb com seis diferentes cepas de *T. cruzi* (Y, CL, Peru, Brasil e Tulahuén) foram positivas. Por outro lado, hibridizações com outros protozoários foram negativas, exceto com *Leptomonas collosoma*. Ensaios de “dot-blot” utilizando esse fragmento de 195 pb como sonda foi capaz de detectar 20 pg de DNA do parasito extraído de sangue de camundongo infectado. Segundo os autores, sondas do elemento de 195 pb podem ser superiores às utilizadas para diagnóstico a partir de DNA do cinetoplasto, pois apresenta menor variação dentro da espécie (Gonzalez, 1984).

Diversos estudos têm usado a tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar seqüências de DNA de *T. cruzi* em sangue de pacientes chagásicos crônicos. Moser *et al.* (1989) usou a seqüência repetitiva de DNA de *T. cruzi* (195 pb) nas reações de PCR para detectar o parasito. Os autores sugerem que o

elemento de 195 pb é universalmente presente em *T. cruzi*. Os autores conseguiram detectar o produto amplificado utilizando amostras de sangue contendo apenas oito parasitos em 100 µl de sangue. Também foi detectado o DNA do parasito no conteúdo abdominal e em amostras de urina de insetos vetores. Nos testes de sensibilidade, não foi observado a amplificação de DNA de *Leishmania spp* e de *T. brucei*. Os autores mostram que a PCR do DNA satélite pode ser usada em estudos de larga escala de prevalência de *T. cruzi* em insetos vetores e hospedeiros mamíferos.

Além do DNA satélite, tem sido proposto o uso do elemento E13 do *T. cruzi* para diagnóstico da doença de Chagas. Requena *et al.* (1992) ao caracterizar o elemento E13, mostraram que ele está presente em diferentes cepas do *T. cruzi* (Maracay, Tulahuén e Guateque). Também foi demonstrado que o elemento E13 está ausente em outros tripanosomatídeos (*Leishmania donovani infantum*, *Leishmania mexicana mexicana* e *Trypanosoma rangeli*) e no genoma humano (Requena, 1992). Segundo os autores, usando a PCR é possível detectar por coloração com brometo de etídio, o elemento E13 com menos de 1/30 do DNA de um único parasito (0,01pg) (Requena *et al.*, 1992).

Vidigal (1996) comparou diferentes protocolos na PCR utilizando iniciadores do elemento repetitivo de 195 pb (DNA satélite) e do elemento E13. O autor mostrou que através da PCR foi possível detectar DNA de *T. cruzi* a partir de quantidades tão pequenas quanto 0,1 fg (195 pb) e 10 fg (E13). A especificidade das técnicas também foi confirmada pela ausência de amplificações usando amostras de *T. rangeli* e *Leishmania spp*.

Outro elemento repetitivo proposto para ensaios de diagnóstico é o elemento C6. Usando dois iniciadores conservados derivados da seqüência repetitiva, na PCR, foi detectada uma banda específica de 344 pb para todas as cepas de *T. cruzi* testadas (G, Y, DM30, CL e Tulahuén). O elemento C6 está ausente em outros tripanosomatídeos (*T. theileri*, *T. mega*, *T. equiperdum* e *T. rangeli*), e pode ser usado para propostas de diagnóstico (Araya, 1997).

Com o objetivo de analisar a persistência e a localização do DNA de *T. cruzi* em tecido cardíaco de pacientes chagásicos, Olivares-Villagómez *et al.* (1998) utilizaram a PCR para amplificar três diferentes seqüências de DNA de *Trypanosoma cruzi*. Uma seqüência de 122pb do minicírculo do cinetoplasto, uma seqüência de 188pb da seqüência repetitiva satélite de 195 pb, e uma seqüência dentro da ORF de um gene que codifica uma proteína flagelar de 160 kDa. Foram estudados sete pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica, além de quatro pacientes com a forma

indeterminada e sete pacientes controles soronegativos para inflamação por *T. cruzi*. Os autores mostraram que as seqüências de DNA do minicírculo do cinetoplasto e a seqüência repetitiva satélite podem ser freqüentemente detectadas em lesões de tecido cardíaco. A seqüência da proteína flagelar foi raramente detectada (2%).

Machado *et al.* (2000) apresentaram uma metodologia simples e prática de detecção do *T. cruzi* e *T. rangeli* em amostras de fezes e hemolinfa de triatomíneos. Essa metodologia utiliza a PCR para amplificar o gene do mini-exon de *T. rangeli* e o DNA satélite do *T. cruzi*. Os resultados encontrados pelos autores confirmam a alta sensibilidade e especificidade do DNA satélite do *T. cruzi*.

Virreira *et al.* (2003) compararam a sensibilidade de vários conjuntos de iniciadores comumente usados para detecção do *T. cruzi* por PCR. Entre esses iniciadores, os autores testaram os pares TCZ 1 e 2 e Diaz 1 e 2, que amplificam o DNA satélite do *T. cruzi*; e o par O 1 e 2, que amplifica uma região conservada do elemento E13. Outros iniciadores para seqüências do kDNA e para a proteína flagelar F29 também foram testados. Os autores mostram que os iniciadores que amplificam o DNA satélite detectaram DNA do parasito em todas as linhagens testadas e com a mesma sensibilidade. Os outros iniciadores foram menos sensíveis e variaram de acordo com as linhagens.

Os estudos citados acima são um exemplo da potencialidade do DNA repetitivo para a detecção do *T. cruzi* e para o diagnóstico da doença de Chagas em diferentes amostras biológicas do inseto vetor e do hospedeiro vertebrado.

Além do seu potencial uso para diagnóstico, o DNA satélite diverge rapidamente de uma espécie para outra e permite uma poderosa ferramenta para distinguir espécies relacionadas do gênero *Trypanosoma*. *T. cruzi* está presente como numerosos clones naturais organizados em duas principais linhagens filogenéticas altamente polimórficas.

Estudos realizados por Bastrenta *et al.* (1999) compararam perfis de RFLPs de DNA entre amostras de *T. cruzi* previamente caracterizadas por RAPD (7 *loci*) e MLEE (22 *loci*), usando a repetição de 195 pb como sonda. Os polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição do DNA satélite foram analisados em 23 amostras de *T. cruzi* com uma grande variabilidade filogenética. Os padrões observados com as enzimas *Hinf I* e *Hae III* suportam a existência de dois grupos. O dimorfismo observado neste estudo está associado às duas linhagens principais do *T. cruzi* (I e II), fornecendo uma nova evidência da divisão de táxon de *T. cruzi*.

Elias *et al.* (2005) compararam as seqüências nucleotídicas do DNA satélite de seis cepas do *T. cruzi* (Silvio X10 c11, G, Y, Esmeraldo c13, CL-Brener e M6241 c16).

Os autores mostraram que polimorfismos nas seqüências do DNA satélite permitem a distinção dos grupos I e II do parasito. Também foi demonstrado que a cepa CL-Brener possui seqüências dos dois grupos, embora aproximadamente 2/3 sejam de seqüências do grupo II.

JUSTIFICATIVA

2.0 JUSTIFICATIVA

Apesar de uma considerável redução na incidência de infecção humana por *T. cruzi* em crianças e jovens, especialmente nos países do cone sul, ainda há cerca de 100 milhões de pessoas, isto é, 25% da população Latino-Americana, sob risco de adquirir a doença (WHO, 2004). Com o advento de novas tecnologias e uma maior compreensão dos diversos fatores relacionados à biologia do parasito e o desenvolvimento da doença, o uso de novas estratégias de prevenção, controle e tratamento vêm sendo discutidos.

Um dos desafios na pesquisa da doença de Chagas tem sido correlacionar marcadores moleculares das cepas de *Trypanosoma cruzi* com a epidemiologia da doença. Com relação ao fenótipo de susceptibilidade ou resistência do *T. cruzi* a drogas, estudos com rDNA e mini-exon realizados por Murta e cols (1998) utilizando cepas de *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes ao Benzonidazol e Nifurtimox não apresentaram correlação entre os marcadores e o fenótipo de susceptibilidade ou resistência. Encontrou-se, no entanto forte correlação entre susceptibilidade do *T. cruzi* a drogas e cepas do zimodema B. Esse estudo sugere que o uso das técnicas de biologia molecular torne possível a confirmação simultânea da presença do parasito no sangue de pacientes chagásicos e a caracterização de susceptibilidade da cepa de *T. cruzi* à droga. Esses marcadores moleculares auxiliariam na prescrição de esquemas terapêuticos específicos para o tratamento de pacientes com infecções por cepas sensíveis ou resistentes às drogas. Elias *et al.* (2005) mostrou que seqüências nucleotídicas do elemento repetitivo de 195 pb (DNA satélite) estão associadas a cepas dos grupos I e II do *T. cruzi*. Marcadores mais sensíveis para os grupos de *T. cruzi* também são importantes, pois além de contribuir para estudos epidemiológicos, permitiriam a classificação do parasito sem a necessidade do isolamento das cepas.

A presença de seqüências repetitivas em milhares de cópias por genoma aumenta a sensibilidade, possibilitando sua utilização em ferramentas de biologia molecular. Através da reação em cadeia da polimerase (PCR), com iniciadores desenhados para amplificar o DNA satélite de *T. cruzi* foi possível detectar DNA do parasito a partir de 0,1 fg de DNA amostra (Vidigal, 1996). Essas e outras seqüências de DNA repetitivas são específicas do *T. cruzi* e apresentam alta sensibilidade no diagnóstico da doença de Chagas (Gonzalez *et al.*, 1984; Requena *et al.*, 1992 Araya *et al.*, 1997; Olivares-Villagómez *et al.*, 1998; Lane *et al.*, 2003; Virreira *et al.*, 2003). Entretanto, não existem marcadores moleculares que permitam diagnosticar e

classificar as cepas do *T. cruzi* quanto à susceptibilidade a drogas, zimodema e/ou grupos de *T. cruzi*.

OBJETIVOS

3.0 OBJETIVO GERAL

Identificar marcadores moleculares para o diagnóstico e classificação das cepas do *Trypanosoma cruzi* quanto ao fenótipo de susceptibilidade a drogas, zimodema e/ou grupos I e II do *T. cruzi*.

3.1 Objetivos específicos

- Selecionar seqüências repetitivas de DNA com possibilidades de uso no diagnóstico e classificação das cepas do *T. cruzi*.
- Estudar a variabilidade do perfil de amplificação dessas seqüências em diferentes cepas do *T. cruzi*.
- Analisar os polimorfismos das seqüências nucleotídicas do DNA satélite do *T. cruzi*.
- Desenhar iniciadores específicos para os marcadores polimórficos selecionados e avaliar os perfis de amplificação utilizando esses iniciadores.
- Avaliar a sensibilidade e a especificidade da PCR multiplex utilizando os iniciadores TcSat 4, Diaz 7 e Diaz 8, na detecção e classificação de cepas do *T. cruzi*.
- Validar o uso da PCR multiplex em amostras clínicas e de campo.

METODOLOGIA

4.0 METODOLOGIA

4.1 Amostras de *Trypanosoma cruzi* e de outros Kinetoplastídeos

Neste estudo utilizamos 30 cepas do *T. cruzi* que foram previamente caracterizadas de acordo com sua susceptibilidade *in vivo* ao benzonidazol (BZ) e nifurtimox (NFX) (Filardi & Brener, 1987) (Tabela 2). Algumas cepas também foram previamente caracterizadas quanto ao perfil de isoenzimas, RAPD e polimorfismo dos genes do RNA ribossomal 24S α e do mini-exon (Murta *et al.*, 1998). Estas cepas foram isoladas de pacientes chagásicos agudos e crônicos e de outros hospedeiros vertebrados e invertebrados de diferentes áreas geográficas. Nas análises das seqüências nucleotídicas do DNA satélite, escolhemos 12 cepas do *T. cruzi*, 8 susceptíveis (Barra Seca, CI-Brener, Ernane, J, Luna, PNM, Quaraizinho e Romano) e 4 naturalmente resistentes ao BZ e NFX (Colombiana, Noel, VL-10 e Yuyu). Estas cepas pertencem aos zimodemas Z1, Z2 e ZB. Todas as cepas foram obtidas do criobanco de *T. cruzi* do Centro de Pesquisas René Rachou.

Para os ensaios de validação da técnica, utilizamos um outro grupo de amostras:

- 7 amostras de DNA de *T. cruzi* isoladas de pacientes na fase aguda da doença, vítimas do surto epidêmico de doença de Chagas ocorrido em Santa Catarina em março de 2005 (Pacheco *et al.*, Anais do XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2005). Essas amostras foram gentilmente cedidas pelo Dr. Mário Steindel da Universidade Federal de Santa Catarina;
- 24 amostras de sangue de camundongos experimentalmente infectados com as cepas Y e Colombiana;
- amostras de fezes de 15 triatomíneos da espécie *Triatoma infestans*, coletados no município de Mato Queimado – RS e
- amostras de DNA de *Trypanosoma rangeli*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*, obtidas no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou.

Tabela 2

Cepas e clones do *Trypanosoma cruzi* utilizadas neste trabalho, sua classificação segundo o fenótipo de susceptibilidade a drogas e diferentes marcadores moleculares.

<i>T. cruzi</i>	Origem ¹	Hospedeiro	Sus. ²	Z. ³	G. ⁴	rDNA ⁵	Mex ⁵
Barra seca*	RGS	<i>T. infestans</i>	S	1	I	2	2
CA-I	Arg	Humano F.C.	S	1	I	1/2	2
Colombiana*	Col	Humano F.C.	R	1	I	2	2
DM-28	Ven	<i>D. marsupialis</i>	ND	1	I	2	ND
Quaraizinho*	RGS	<i>T. infestans</i>	S	1	I	2	2
SC-14	SC	<i>P. megistus</i>	ND	1	I	ND	ND
Sc-28	SC	<i>D. marsupialis</i>	R	1	I	ND	2
SC-42	SC	<i>D. marsupialis</i>	ND	1	I	ND	ND
SC-51	SC	<i>P. megistus</i>	ND	1	I	ND	ND
Tehuantepec 17	Mex	Triatomíneo	S	1	I	ND	ND
Yuyu*	Ba	<i>T. infestans</i>	R	1	I	2	2
Chaninha	MG	<i>F. domesticus</i>	S	2	II	1	1
Exr 424/3	SP	<i>P. opossum</i>	S	2	II	1	1
Exr 426/1	SP	<i>D. marsupialis</i>	S	2	II	1	1
Ernane*	Go	Humano F.C.	S	2	II	1	1
Noel*	MG	Humano F.A.	R	2	II	1	1
PNM*	MG	Humano F.C.	S	2	II	1	1
São Felipe	Ba	Humano F.C.	S	2	II	1	1
SMJ	Go	Humano F.C.	S	2	II	1	1
VL-10*	MG	Humano F.C.	R	2	II	1	1
Y	SP	Humano F.A.	MR	2	II	1	1
CL	RGS	<i>T. infestans</i>	S	B	II	1	1
Cl-Brener*	RGS	<i>T. infestans</i>	S	B	II	1	1
FL	RGS	<i>T. infestans</i>	S	B	II	1	1
Ibarra	Arg	Humano F.C.	S	B	II	1	1
J*	MG	Humano F.A.	S	B	II	1	1
JA	Go	Humano F.C.	S	B	II	1	1
Luna*	Arg	Humano F.A.	S	B	II	1	1
MR	RGS	<i>T. infestans</i>	S	B	II	1/2	1
Romano*	Arg	Humano F.A.	S	B	II	1	1

1 – Origem das cepas: Arg- Argentina; Ba- Bahia; Col- Colômbia; Go- Goiás; Mex- México; MG- Minas Gerais; RGS- Rio Grande do Sul; SC- Santa Catarina; SP- São Paulo; Ven- Venezuela. 2 – Susceptibilidade *in vivo* das cepas do *T. cruzi* a droga (Filardi & Brener, 1987): S – sensível; R – Resistente; MR – Moderadamente Resistente. 3 – Zimodema das cepas do *T. cruzi* (Murta *et al.*, 1998). 4 – Grupo do *T. cruzi* (Anonymous, 1999). 5 – Marcadores moleculares rDNA 24S (rDNA) e mini-exon (Mex) (Murta *et al.*, 1998). ND – não determinado. F.A. – Fase Aguda e F.C. – Fase Crônica. * - cepas e clones selecionados para análise das seqüências nucleotídicas.

4.2 Seqüências de DNA alvo e iniciadores específicos para diagnóstico e classificação de cepas do *T. cruzi*

Neste estudo, foram utilizados dois elementos repetitivos do DNA de *T. cruzi*: a seqüência repetitiva de 195pb conhecida como DNA satélite (100.000 a 120.000 cópias por genoma) e o elemento repetitivo de 1025 pb denominado E13 (10.000 a 20.000 cópias por genoma). Essas duas seqüências repetitivas correspondem a aproximadamente 15% do DNA total do parasito, sendo importante alvo para diagnóstico da doença, conforme descrito na literatura.

Os iniciadores utilizados estão listados na Tabela 3. Os pares de iniciadores Diaz 7 e 8 (Diaz *et al.*, 1992) e O1-O2 (Requena *et al.*, 1992), foram previamente descritos na literatura. Os iniciadores TcE13 foram desenhados a partir da seqüência nucleotídica depositada no banco de dados (GenBank, accession number M74536). Os iniciadores Tcsat foram desenhados a partir da análise das seqüências do DNA satélite do *T. cruzi* realizada nessa dissertação.

Tabela 3

Iniciadores específicos para PCR do DNA satélite (195 pb) e elemento E13 do *T. cruzi*.

SEQ.	Senso/ Anti		INICIADORES	REF.
DNA Satélite	Senso	Diaz 7	5' CGCAAACAGATATTGACAGAG 3'	Diaz <i>et al.</i> , 1992
	Anti	Diaz 8	5' TGTTACACACTGGACACCAA 3'	
	Anti	TcSat 1	5' TCATAATTCGAAACAAAACA 3'	Presente dissertação
	Senso	TcSat 2	5' TGTTTCGAATTATGAATGGC 3'	
	Anti	TcSat 3	5' TTTTCGAGCGGCTGCTGCAC 3'	
	Senso	TcSat 4	5' GCAGCCGCTCGAAAACATCC 3'	
	Anti	TcSat 5	5' ATGGTGCTGCACTCGGCG 3'	
	Senso	O1	5' TGGCTTGGAGGAGTTATTGT 3'	
Anti	O2	5' AGGAGTGACGGTTGATCAGT 3'		
E13	Senso	TcE13 1	5' CCTTTTTTCCTAACTTGTTTGGT 3'	Presente dissertação
	Anti	TcE13 2	5' ATTCGTCAGCCTGCTTCGTT 3'	
	Senso	TcE13 3	5' GCACGCATGGGAGGTAAGAT 3'	
	Anti	TcE13 4	5' TGATGGTGTGGCGAGCAGTC 3'	
	Senso	TcE13 5	5' AGCTGCCCGGAAGATTATTATG 3'	

4.3 Extração de DNA

a) método de fenol-clorofórmio

O sedimento de epimastigotas (aproximadamente 10^8 parasitos) foi ressuspenso em tampão de extração contendo 50 mM de Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM de NaCl e 0,5% de SDS, pH 8,0 e incubado com 100 µg/ml de proteinase K por 12h a 37°C. Posteriormente, o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 1:1:24 e clorofórmio/álcool isoamílico 1:24 e precipitado pela adição de 3 volumes de etanol 100% e acetato de sódio 0,3 M a -20°C por 12h. O DNA foi então lavado 2X com etanol 70% e ressuspenso em 100 µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM, pH 8,0). A concentração do DNA obtido foi determinada por espectrofotômetro considerando 1 unidade de absorvância 260 nm = 50 µg/ml .

b) Método de lise – Amostras em papel de filtro

I – Sangue de camundongo

O sangue de camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi* foi obtido por punção retro-orbital no pico de parasitemia. O número de parasitos circulantes foi estimado pelo método descrito por Brener (1965). Amostras de 5µl de sangue foram gotejadas em papel filtro, secas à temperatura ambiente durante 30 minutos e armazenadas em sacos plásticos a 4°C. No momento da extração, a área correspondente à gota de sangue foi cortada e colocada em um tubo, onde em seguida foram adicionados 100µl de água deionizada. A amostra foi então aquecida a 70°C por 10 minutos e centrifugada por 3 minutos a 17.900 x g. O sobrenadante contendo o DNA foi utilizado para PCR.

II – Fezes de *T.infestans*

Fezes de *T.infestans* foram coletadas puncionando o abdômen do inseto. Essas amostras foram diluídas em PBS e a presença do *T. cruzi* foi monitorada em microscópio ótico. Triatomíneos infectados e não-infectados foram selecionados e uma nova amostra de fezes foi coletada agora em papel de filtro. Adicionalmente coletamos amostras de fezes da lâmina para comparação dos resultados. O DNA das amostras em papel de filtro foram extraídas conforme item anterior.

4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para amplificação dos fragmentos do DNA satélite e do elemento E13 de *T. cruzi*. O conjunto de iniciadores utilizados encontram-se listados na Tabela 3. Cada reação continha tampão de reação (50mM KCl e 20mM Tris-HCl, pH 8,4); 1,9mM de MgCl₂; dNTPs (200 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos) (PROMEGA); 5 pmoles de cada iniciador; enzima Taq DNA polimerase (INVITROGEN); diferentes concentrações de DNA de *T. cruzi*, em volume final de 10µl. As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler[®] utilizando diferentes ciclos de amplificação de acordo com o fragmento de interesse. Os programas estão listados na Tabela 4.

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a PCR, 3µl do produto de PCR foi submetido à análise em gel de poliacrilamida 6% ou 10%, de acordo com o tamanho do fragmento esperado e da resolução das bandas. Para a polimerização do gel foram utilizados persulfato de amônio (APS) 10% (v/v) e TEMED (N,N,N',N' – tetrametil-etilenodiamina) 0,05% (v/v). O produto de PCR foi misturado com igual volume de tampão de amostra de DNA 2X (0,08% de azul de bromofenol, 0,08% de xilenocianol, 5% de ficol) e submetido à corrida eletroforética em cuba contendo tampão TBE (89mM TRIS-base pH 8,0, 89mM de ácido bórico e 2mM de EDTA). O gel foi fixado em 150ml de solução de etanol a 10% (v/v) com 0,5% de ácido acético (v/v), e impregnado por nitrato de prata a 0,2%. Finalmente, o gel foi lavado em água deionizada e revelado em solução aquosa de hidróxido de sódio 3% (p/v) com 0,5% de formaldeído (v/v), até o aparecimento das bandas (Sanguinetti *et al.*, 1994).

Tabela 4Programas utilizados na PCR do DNA satélite e do elemento E13 do *T. cruzi*.

PGR.	INICIADORES	Nº DE CICLOS	REAÇÃO DE PCR			EXT. FINAL
			DESAT. INICIAL	DES. ANEL.	EXT.	
P1	Diaz 7 e 8		94°C 20"	57°C 15"	72°C 30"	
P2	TcSat 2-4 TcSat 4 Diaz 7 e 8		95°C 20"	60°C 10"	72°C 15"	
P3	TcSat 1 Diaz 7 e 8 TcSat 1-3		95°C 20"	55°C 10"	72°C 15"	
P4	TcSat 3 Diaz 7 TcSat 1 e 5	30	95°C 5'	59°C 10"	72°C 20"	72°C - 5'
P5	O 1 e 2		95°C 40"	55°C 1'	72°C 1'	
P6	TcE13 1 e 2 TcE13 2 e 3 TcE13 4 e 5		95°C 1'	55°C 30"	72°C 1'	

PGR – Programa; DES – Desnaturação; ANEL – Anelamento; EXT – Extensão.

4.6 Purificação do produto de PCR

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram purificados utilizando o Kit QIAquick (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente foi adicionado o tampão PB com detergente ao produto de PCR. A amostra foi submetida à centrifugação em uma coluna. O DNA permaneceu ligado na coluna e os outros componentes da reação de PCR (magnésio, tampão de reação e outros) foram lavados por centrifugação a $17.900 \times g$ por 1 min com o tampão PE contendo etanol. O DNA foi eluído após a adição de $50\mu\text{l}$ de água deionizada aquecida a 95°C por 2 min e centrifugação da coluna.

4.7 Purificação de DNA em gel de agarose 1%

Outra estratégia para purificar fragmentos de DNA foi submeter o produto de PCR à eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, excisar e purificar o fragmento de interesse utilizando o Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante. Após cortar a banda do gel, foi adicionado o tampão QG (1:5 v/v) e o tubo foi aquecido a 50°C para dissolver completamente a agarose. Em seguida, foi adicionado isopropanol para precipitar o DNA, e todo o volume foi colocado em uma coluna. Após centrifugação o DNA permaneceu ligado e foi adicionado novamente o tampão QG para remover todo o resto de agarose. Para a lavagem, foi adicionado o tampão PE com etanol e a amostra foi centrifugada a $17.900 \times g$ por 1 min. A eluição do DNA foi feita com $50\mu\text{l}$ de água deionizada aquecida a 95°C por 2 min, seguido de centrifugação da coluna.

4.8 Preparação de bactérias competentes

Bactérias *Escherichia coli* da linhagem TOP 10F' foram preparadas para a transformação por choque térmico. Uma colônia de bactéria foi colocada em 5ml de meio LB (peptona de caseína, extrato de levedura 0,5% e NaCl 10mM) e mantida por 12h a 37°C sob agitação. Dessa cultura saturada, $500\mu\text{l}$ de células foi incubado em 100ml de meio LB, a 37°C sob agitação por 2 a 3 horas. O crescimento das bactérias foi monitorado através de medidas espectrofotométricas, até ser atingido 0,7 (OD_{600}). Atingido este crescimento as bactérias foram incubadas no gelo por 10 minutos e posteriormente centrifugadas a $4170 \times g$ a 4°C por 10 min. O sedimento foi

ressuspendido em 50ml de solução de CaCl_2 100mM com HEPES 10mM, pH 7,0 e mantido no gelo por 30 minutos. As bactérias foram novamente centrifugadas a 4700 x g a 4°C por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 2ml de solução de CaCl_2 100mM com HEPES 10mM e glicerol 10%, pH 7,0. As células foram mantidas no gelo por 2 horas e em seguida aliquotadas (100µl/tubo) e armazenadas a -70°C.

4.9 Clonagem do DNA satélite (195 pb) no vetor TOPO

Para a clonagem dos produtos de PCR foi utilizado o vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (INVITROGEN). Para a reação de ligação, 4µl do produto de PCR purificado foi incubado com 1µl de tampão salino (fornecido pelo fabricante) e 1µl do vetor durante 5 minutos a temperatura ambiente. Todo o conteúdo da ligação foi incubado com 100µl de bactérias quimiocompetentes por 30 minutos no gelo. Em seguida a amostra foi incubada a 42°C por 30 segundos e colocadas no gelo por 2 minutos. As bactérias foram incubadas com 1ml de meio LB a 37°C sob agitação por 1 hora. Posteriormente elas foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 100µg/ml de ampicilina, 0,425µl/ml de IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 1M e 80µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) e incubadas a 37°C. Foram selecionadas 10 colônias brancas de cada cepa clonada e a presença do inserto de interesse foi confirmada por PCR utilizando iniciadores específicos para o DNA satélite.

4.10 Extração de plasmídeos recombinantes

As colônias de bactérias selecionadas foram crescidas a 37°C por 16 horas sob agitação em 6ml de meio LB contendo 100µg/ml de ampicilina. Posteriormente uma alíquota de 500µl foi criopreservada em glicerol 50% e o restante da cultura foi utilizada para purificação do plasmídeo utilizando o Kit QIAprep (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante. A cultura foi centrifugada a 4170 x g a 4°C por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento de bactérias foi ressuspendido em 250µl de tampão de ressuspensão. Posteriormente, foi adicionado 250µl de tampão de lise e 350µl de tampão de neutralização. A suspensão foi aplicada na coluna, centrifugada por 10 min e o eluato descartado. A coluna foi lavada e o plasmídeo recombinante foi eluído em 50µl de água deionizada aquecida a 95°C por 2 min e por centrifugação da

coluna. A presença dos plasmídeos foi confirmada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

4.11 Sequenciamento de DNA

Os plasmídeos contendo o inserto de interesse foram seqüenciados utilizando o Kit terminator ET DYEnamic (Amersham Bioscience) e os iniciadores M13 forward 5' GTAAAACGACGGCCAG 3' e iniciadores específicos para cada inserto. A reação foi realizada em uma placa de 96 poços da seguinte forma: 4µl do Kit terminator ET DYEnamic; 5,0 pmoles de iniciador e aproximadamente 150 ng de DNA em um volume final de 10µl. As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador Mastercycler®, com 25 ciclos de 20 seg a 95°C, 15 seg a 50°C e 1min a 60°C. Após esta etapa, as amostras foram precipitadas de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do kit, e seqüenciadas em seqüenciador capilar Megabace 500 (Amersham).

4.12 Análise e edição de seqüências

As seqüências obtidas foram processadas utilizando o programa de identificação de bases Phred (Ewing & Green 1998; Ewing *et al.*, 1998). Este programa é responsável pela leitura binária dos cromatogramas gerados pelo seqüenciador e conversão em formato texto com uma taxa de erro menor que aquela atribuída pelo programa de identificação de base padrão. O programa Phred também atribui valores de qualidade às bases (valor de Phred = $q = -10 \times \log_{10}(p)$, onde p é a probabilidade estimada de erro de uma base), baseando-se na estimativa da taxa de erro e resolução do pico que foi calculado para cada base individualmente. Foram consideradas de boa qualidade apenas as bases com valores de Phred igual ou superior a 20. Os arquivos de saída gerados continham as seqüências, valores de qualidade das seqüências no formato FASTA e um arquivo PHD.

As seqüências obtidas foram mascaradas contra a seqüência do vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] utilizando o programa Cross_Match, que utiliza a implementação do algoritmo Smith-Waterman-Gotoh (Smith & Waterman 1981; Gotoh 1982), substituindo a base original por um x. Foi criado um arquivo com a extensão .fasta.screen contendo as seqüências mascaradas e o arquivo de qualidade foi renomeado para .fasta.screen.qual.

Em seguida, as seqüências do DNA satélite de *T. cruzi* mascaradas pelo Cross_Match tiveram a seqüência do vetor retirada e o restante foi alinhado usando o programa de alinhamento múltiplo de seqüências Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Seqüências de baixa qualidade, inferiores a 195 pb e partes de seqüências que excederam os 195 pb (não múltiplos de 195) foram desconsideradas. Seqüências com 390 pb ou 585 pb foram divididas em unidades de 195 pb. Ao final, apenas seqüências de 195 pb correspondentes à unidade de repetição do DNA satélite foram consideradas. A edição dessas seqüências foi realizada com o programa Bioedit (Hall, 1999), que produziu arquivos de saída com a extensão .fasta. Discrepâncias entre as seqüências foram averiguadas por inspeções visuais dos cromatogramas utilizando o programa Gene Tool (<http://www.doubletwist.com>) e editadas manualmente, quando necessário.

4.13 Montagem de árvores filogenéticas

Diferentes árvores filogenéticas foram construídas utilizando o programa MEGA 3 (Kumar *et al.*, 2004). Utilizamos o algoritmo Neighbor-Joining e diferentes modelos, como número de diferenças, parâmetro Kimura 2, Tajima-Nei e Tamura-Nei. Árvores filogenéticas foram construídas e comparadas nos diferentes modelos. Calculamos os valores de “bootstrap” com 1000 replicações. Também construímos árvores usando o programa Clustal X 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) e visualizamos usando o programa TreeView (win 32), desenvolvido por Roderic D.M. (<http://taxonomy.zoology.qila.ac.uk/rod/rod.html>).

4.14 Desenho de iniciadores específicos

Iniciadores específicos para amplificar fragmentos de diferentes tamanhos do DNA satélite e do elemento E13 do *T. cruzi* foram desenhados utilizando o programa Gene Tool. O programa faz uma análise de oligonucleotídeos indicados pelo usuário e apresenta entre outras coisas um “score” para a qualidade do oligonucleotídeo e possíveis problemas em uma reação de PCR. Os critérios utilizados para escolha dos iniciadores foram: os oligonucleotídeos devem ter temperatura de anelamento “melting” (T_m) entre 40°C e 60°C, com os melhores “scores” e preferencialmente que não formem dímeros, “hairpin” ou que apresentem outros sítios de anelamento no DNA do *T. cruzi*.

RESULTADOS

5.0 RESULTADOS

5.1 - Análise e escolha das seqüências para estudo

Com o objetivo de identificar seqüências úteis para o diagnóstico e a classificação das diferentes cepas de *T. cruzi*, fizemos uma busca na literatura e selecionamos para nosso estudo três seqüências repetitivas de DNA (Tabela 5):

Como critérios para seleção das seqüências, utilizamos: tamanho da seqüência repetitiva, número de cópias e a existência de outros estudos relatando seu uso para diagnóstico ou classificação de cepas.

Utilizando o banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) encontramos várias seqüências nucleotídicas dos três elementos repetitivos selecionados (Quadro 1). As seqüências listadas do DNA satélite (195 pb) e do minicírculo de kDNA foram alinhadas e comparadas entre si. Para o alinhamento do minicírculo de kDNA, consideramos apenas a região delimitada pelos iniciadores S 35 e S 36.

Tabela 5

Seqüências repetitivas do DNA do *T. cruzi*, selecionadas para este estudo.

NOME DA SEQUÊNCIA	pb	Nº DE CÓPIAS	INICIADORES	FRAGMENTO	REFERÊNCIA
DNA Satélite	195 pb	100.000	Diaz 7	195 pb	Diaz <i>et al.</i> , 1992.
		-	Diaz 8		
Elemento E13	1025 pb	120.000	TCZ 1	188 pb	Moser <i>et al.</i> , 1989.
		10.000 - 20.000	O 1 O 2		
Minicírculo de kDNA	330 pb	10.000- 20.000	S 35 S 36	330 pb	Sturm <i>et al.</i> , 1989.

Quadro 1

Códigos de acesso das seqüências repetitivas do DNA do *T. cruzi* utilizadas neste trabalho.

SEQUÊNCIA	CÓDIGO DE ACESSO			
	AY520089	AY520082	AY520075	AY520068
	AY520088	AY520081	AY520074	AY327543
	AY520087	AY520080	AY520073	AY188964
DNA satélite	AY520086	AY520079	AY520072	K00393
	AY520085	AY520078	AY520071	
	AY520084	AY520077	AY520070	
	AY520083	AY520076	AY520069	
Elemento E13	M74536			
Minicírculo de	AF242560	AF242562	AF114153	U07846
kDNA	AF242561	AF242563	AF399842	U07845

A Figura 2 representa o alinhamento das seqüências do minicírculo de kDNA. As barras verticais representam as posições nucleotídicas com pelo menos 90% de identidade entre as seqüências. O tamanho do fragmento variou nas seqüências depositadas no banco de dados de 320pb a 340pb. Observamos que as seqüências analisadas apresentam um nível de variabilidade muito alto para os nossos estudos. Não encontramos regiões conservadas no fragmento amplificado pelos iniciadores S 35 e S 36. Em uma avaliação preliminar, clonamos e sequenciamos o produto de PCR (utilizando os iniciadores S 35 e S 36) de três cepas do *T. cruzi* (dados não mostrados). Nossos resultados confirmaram a alta variabilidade das seqüências mesmo quando comparamos seqüências de uma mesma colônia de bactérias transformadas. Diante disso, não utilizamos esse fragmento em nossas análises.



Figura 2

Alinhamento de 12 seqüências do fragmento do minicírculo do kDNA do *T. cruzi*, entre os iniciadores S 35 e S 36. Todas as seqüências foram obtidas do banco de dados GenBank e o alinhamento foi realizado utilizando o programa Clustal X. Os códigos de acesso das seqüências estão indicados à esquerda. Algumas seqüências apresentam repetições dos fragmentos estudados e foram divididas para permitir o alinhamento. As barras verticais coloridas marcam posições nucleotídicas com pelo menos 90% de identidade. Os iniciadores S 35 e S 36 estão localizados nas posições 326 a 352 e 1 a 27, respectivamente.

O elemento repetitivo E13 possui apenas uma seqüência nucleotídica descrita no banco de dados, por isso não avaliamos previamente a variabilidade desse elemento repetitivo. Dados da literatura, no entanto indicam o par de iniciadores O 1 e O 2 para amplificar um fragmento de 250 pb do elemento E13 com alta sensibilidade e especificidade para a detecção do *T. cruzi* (Requena *et al.*, 1992; Vidigal, 1996).

O alinhamento das seqüências do DNA satélite está representado pela Figura 3. Ao contrário do segmento do kDNA analisado anteriormente, o DNA satélite do *T. cruzi* apresenta regiões conservadas e polimórficas regularmente distribuídas na seqüência. Este perfil é adequado ao nosso estudo, pois favorece o desenvolvimento de ferramentas moleculares para classificação do parasito. Os iniciadores TCZ 1 e TCZ 2 são complementares a sítios mais conservados do DNA satélite comparado com os iniciadores Diaz 7 e Diaz 8. No entanto, o fragmento amplificado pelos iniciadores TCZ 1 e TCZ 2 é de 188 pb, enquanto os iniciadores Diaz 7 e Diaz 8 amplificam um fragmento de tamanho igual à unidade de repetição do DNA satélite (195 pb). Este fato nos levou à escolha dos iniciadores Diaz 7 e Diaz 8 para nosso estudo.

Considerando as informações obtidas nesta primeira etapa, optamos por estudar as seqüências nucleotídicas do DNA satélite (DNA repetitivo satélite de 195 pb) e o elemento repetitivo E13. Embora seja uma seqüência abundante, optamos por não utilizar a seqüência do minicírculo de kDNA amplificada pelos iniciadores S 35 e S 36 devido à alta variabilidade encontrada na análise das seqüências disponíveis em bancos de dados.

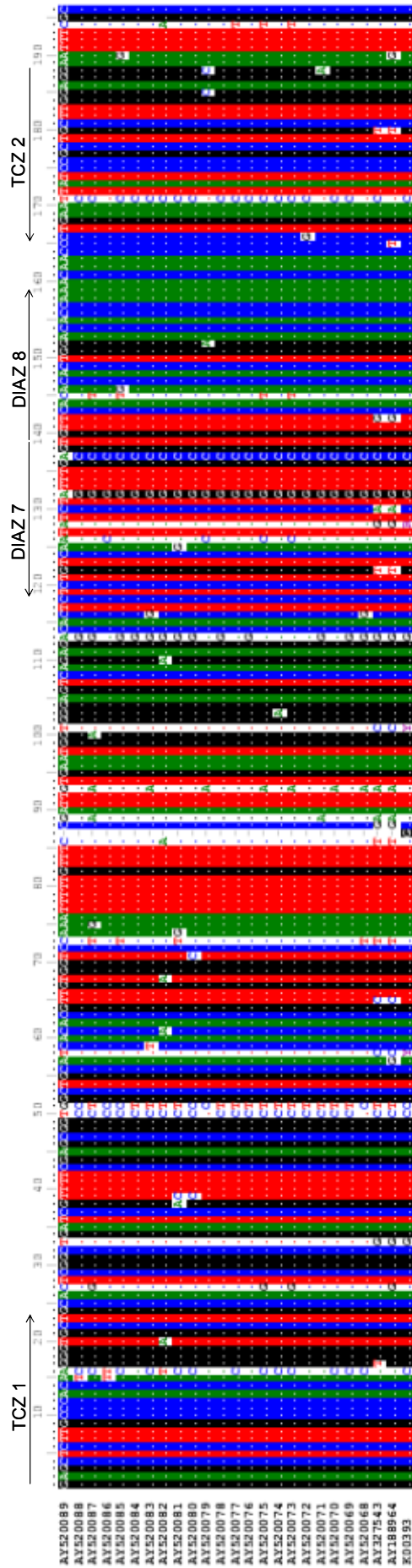


Figura 3

Alinhamento de 25 seqüências do DNA satélite (195 pb) do *T. cruzi*. Todas as seqüências foram obtidas do banco de dados GenBank e o alinhamento foi realizado utilizando o programa Clustal X. Os códigos de acesso das seqüências estão indicados à esquerda. As barras verticais coloridas marcam posições nucleotídicas com pelo menos 90% de identidade. Os iniciadores TCZ 1 e TCZ 2 estão localizados nas posições 1 a 23 e 165 a 188, respectivamente. Os iniciadores Diaz 7 e Diaz 8 estão localizados nas posições 118 a 138 e 139 a 159, respectivamente.

5.2 - Análise do elemento repetitivo E13

5.2.1 – Análise dos iniciadores O 1 e 2 e desenho de novos iniciadores.

A Figura 4 mostra o perfil eletroforético do fragmento de 250 pb do elemento E13, amplificado com os iniciadores O 1 e 2. Observamos que das 6 cepas do *T. cruzi* analisadas, três (Colombiana, Yuyu e Ernane) amplificaram o fragmento. Apesar de fazermos uma pesquisa exaustiva usando várias concentrações de DNA, ciclos e temperaturas de anelamento, observamos que algumas amostras do *T. cruzi* não amplificaram com estes iniciadores, sugerindo que existe um polimorfismo no sítio de anelamento do iniciador. Observamos ainda a amplificação de outros produtos próximos ao fragmento esperado de 250 pb. Considerando os resultados obtidos, desenhamos novos iniciadores para amplificar um fragmento maior do elemento E13 em todas as amostras do *T. cruzi*. Os novos iniciadores, nomeados ordenadamente TcE13 1 a 5, foram desenhados a partir da seqüência nucleotídica do elemento E13 (GenBank, accession number M74536). A Figura 5 mostra a disposição dos iniciadores na seqüência nucleotídica do elemento E13.

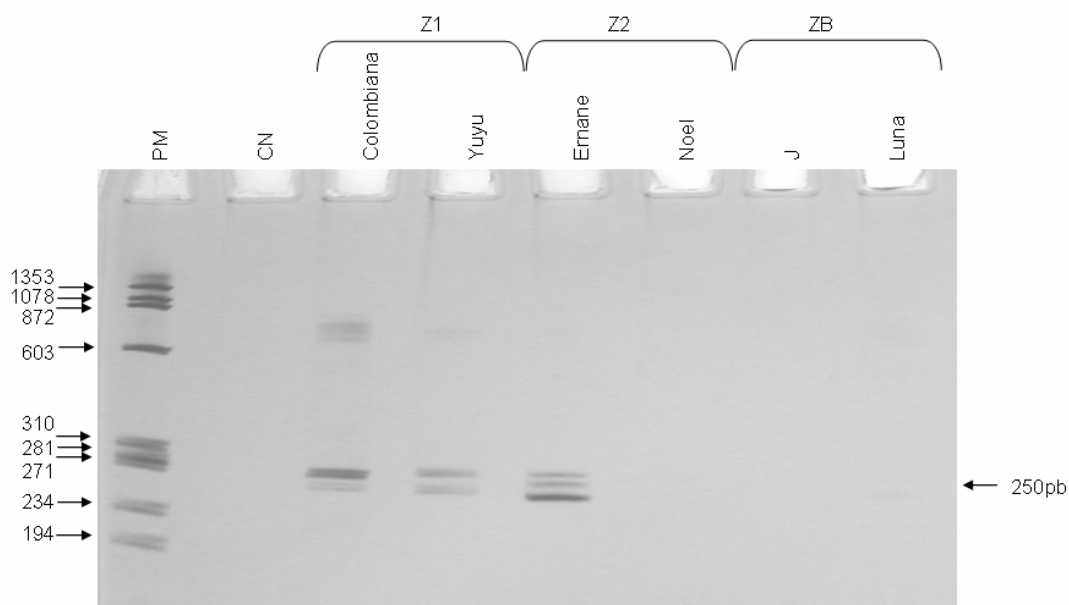


Figura 4

Perfil eletroforético (gel de poliácridamida 6% corado com prata) do produto de PCR do elemento E13 de 6 cepas do *T. cruzi*. Os iniciadores utilizados foram O 1 e O 2. As cepas utilizadas estão classificadas por zimodema. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

GAATTCATATATTGAATG AGAATA.AAAGATTG AAGCAATTA.ACTAACGA.ACCTTTTT
 TcE13 1 TcE13 5
 TCCTAACTTGGTTTGGTTTCCATAAATAATTTCCAGGATCCGGCCAGCTGCCCGGAAGA
 TTATTATGTATCGATATGTTTTTTTTGGATTACTCTGGTGGTTCCCTCCTGTCTCCTTT
 TGGCTCCCTCCACACGTGTCTCAGTGTTTTGC TTTAGTACGGCCACACACGGGTAGC
 TTGAGCCCGGGATATCTTTTTTCTTTTTGACGTCATTTCCGTTAGGCCACCAACTCG
 GTCAGTTTCGGCAAGCATCCACTCTCCACAGCATGGCTCCCTGATATTTTGGAGTCAT
 CTCAGATGTAACGCCGGCACCCACGGCCGTGGCACGCATGGGAGGTAAG ATGGAAC
 TcE13 3
 GCGGGCAGCAAAGATATTGTGCTGCACATGTGTCTGTTGCATTTGTTCTGTCTGTGG
 TGCCTTCAATGTGGAAGAAG AGGG ATGAACATTGCACGATTTGGTGGCTTGGAGGA
 O 1
 GTTATTGTGCACTTTTTTGTATGATCTTTGGTTCCGGCCGTGTCTCTGGGGCCATTGC
 CTCCTCTGAGTGGACTTCGATGGCCATTTTTTTTTGTTGTTTGGGAGTAAAAACAC
 ATTGGGAGCGATGAA ACCACACGTCATGCATGGCTGTTCCAGGGAGGTATGTATTTG
 GGGTGGAGTGCACATATGTGGATGTCTGTGTGAG ACCAAGCGGGGGCTGACTGATC
 O 2
 AACCGTCACTCCCTTTTCTGGAGAGTGTGCTCTTATTTTTTTTTTGTCCCTTTTGTGT
 CGGGGCACGACGGGATTGG AGGCCACCGTCCCACGAAAGTCCCTTGGCCACATACA
 CACTCTCATGCCACTGTGGCCCCGGAGTGGGGTGCAATCCAAATTTGTGCTGCTT
 TTGCATTGGCGCAATTATTTTATTTATTATTGTGACGCC TCCCTGTCCGGCCGTGCC
 TcE13 4 TcE13 2
 ACTTTGATTGGATTGTGTGGGACTGCTCGCCAACACCATCAAACGAAGCAGGCTGA
 CGAATTC

Figura 5

Seqüência nucleotídica do elemento E13 do *T. cruzi* (GenBank, accession number M74536) e a disposição dos iniciadores O 1 e 2 e TcE13 1 a 5 dentro da seqüência. As bases destacadas em azul representam os iniciadores senso; as bases destacadas em vermelho representam os iniciadores antisenso.

5.2.2 – Análises dos iniciadores TcE13 1 a 5.

O uso dos pares de iniciadores TcE13 1 e 2, TcE13 2 e 3 e TcE13 4 e 5, permitiu-nos compreender um pouco mais da variabilidade do elemento repetitivo E13 em *T. cruzi*. Utilizamos esses iniciadores em reações de PCR com 1 pg de DNA molde e os resultados estão apresentados na Figura 6A. Observamos que o par de iniciadores TcE13 1 e 2 não amplificou nenhum fragmento nas cepas dos zimodemas 1 e 2. As cepas do zimodema B, porém, apresentaram vários fragmentos inespecíficos.

Por outro lado, o par de iniciadores TcE13 2 e 3 amplificou vários fragmentos de diferentes tamanhos nas cepas do *T. cruzi* pertencentes aos três zimodemas estudados, resultado de ligações inespecíficas. Para esse par de iniciadores, o tamanho do fragmento esperado é de 649 pb, porém um fragmento único que detectamos nas cepas do Z2 foi de aproximadamente 450 pb. Os perfis eletroforéticos observados foram semelhantes entre cepas do mesmo zimodema.

Repetimos a PCR anterior utilizando diluições ao décimo de 1000 a 10 fg de DNA da cepa Romano com o objetivo de visualizarmos com maior resolução os fragmentos de DNA amplificados (Figura 6B). A menor quantidade de DNA molde detectada foi de 10 fg. No entanto, tanto o par de iniciadores TcE13 1 e 2 quanto o par TcE13 2 e 3 apresentaram muitos fragmentos inespecíficos, alguns muito próximos do tamanho esperado, 972 e 649 pb, respectivamente.

O terceiro conjunto de iniciadores testados foi o par TcE13 4 e 5, cujo fragmento esperado era um fragmento de 902 pb. Semelhante aos anteriores, observamos a presença de várias bandas de tamanhos muito próximos, no entanto foi possível observar o produto amplificado em 5 das 6 cepas testadas. Também observamos fragmentos inespecíficos, alguns desses mais intensos que o fragmento esperado de 902 pb (Figura 6C).

A variabilidade dessa seqüência entre as cepas do *T. cruzi* e a semelhança de segmentos do elemento E13 com outras seqüências do DNA do parasito, demonstrado em nossos resultados, dificulta a busca de marcadores polimórficos nesse elemento repetitivo. Devido a estes fatos, além da ausência do produto de tamanho esperado em algumas cepas, optamos por não continuarmos a análise do elemento E13.

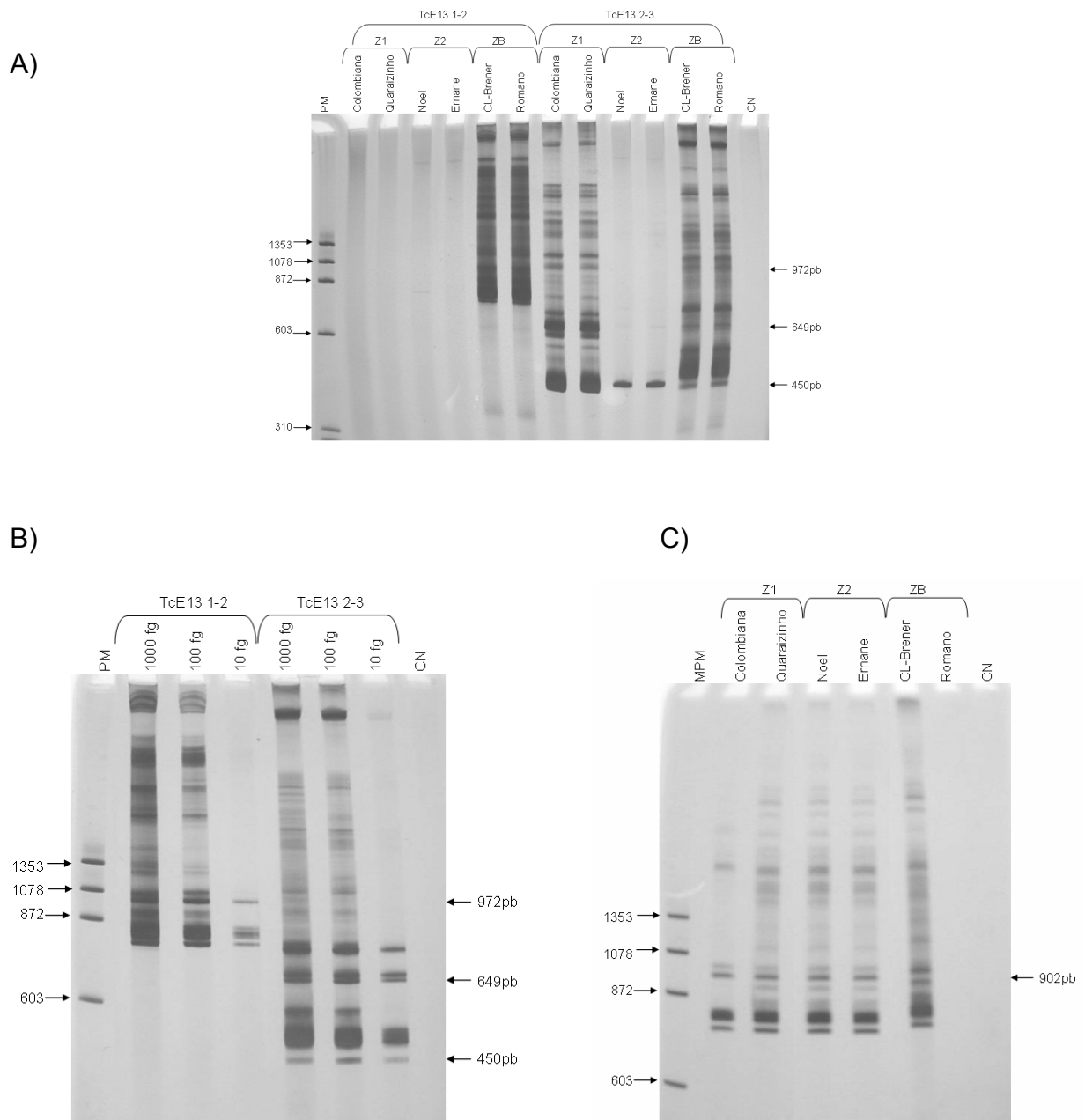


Figura 6

Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 6% corado com prata) do elemento E13 do *T. cruzi* utilizando: A) os iniciadores TcE13 1 e 2 (canaletas 2 a 7), e TcE13 2 e 3 (canaletas 8 a 13). B) os mesmos iniciadores com diferentes quantidades de DNA molde da cepa Romano (ZB). C) os iniciadores TcE13 4 e 5. As cepas utilizadas estão classificadas por zimodema. O fragmento esperado em cada caso está indicado à direita. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

5.3 – Estudo do DNA satélite do *T. cruzi*

5.3.1 – Análise das seqüências nucleotídicas do DNA satélite do *T. cruzi*.

5.3.1.1 – Identificação de polimorfismos de seqüências.

Utilizando o par de iniciadores Diaz 7 e 8, clonamos e sequenciamos o DNA satélite de 12 cepas do *T. cruzi* (Tabela 2). Foram analisadas 160 seqüências nucleotídicas do DNA satélite selecionadas de acordo com os critérios especificados na metodologia (ver item 4.12). O numero de seqüências analisadas por cepa está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6

Distribuição por cepa das seqüências do DNA satélite (195 pb) do *T. cruzi*, utilizadas em nosso estudo.

CEPA	Z. ¹	Sus. ²	Nº SEQÜÊNCIAS		
			<i>T. cruzi</i> I	<i>T. cruzi</i> II	Total
Barra Seca	1	S	6	5	11
Colombiana	1	R	19	0	19
Yuyu	1	R	6	15	21
Quaraizinho	1	S	9	8	17
Romano	B	S	0	12	12
J	B	S	0	11	11
Luna	B	S	0	7	7
Ci-Brener	B	S	0	6	6
Noel	2	R	0	9	9
PNM	2	S	0	17	17
VL-10	2	R	0	15	15
Ernane	2	S	0	15	15
Total			40	120	160

1 – Zimodema das cepas do *T. cruzi* (Murta *et al.*, 1998).

2 – Susceptibilidade *in vivo* das cepas do *T. cruzi* a droga (Filardi & Brener, 1987): S – sensível; R – Resistente.

Comparamos os polimorfismos observados entre as seqüências de cada cepa e entre cepas em relação aos diferentes zimodemas, e fenótipo de susceptibilidade ao BZ e NFX. Nossa expectativa seria detectar polimorfismos que poderiam ser utilizados no diagnóstico da doença de Chagas e na classificação das cepas. As Figuras 7 e 8 representam essas comparações. Cada nucleotídeo nas figuras está representado por um “spot” colorido.

Metade das 160 seqüências analisadas é idêntica à pelo menos uma outra seqüência da mesma cepa de origem. Essas seqüências foram retiradas e as 80 seqüências representativas foram depositadas no banco de dados GenBank (Accession Number: DQ914442 a DQ914521 – ver Anexo 1) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). Estas seqüências foram alinhadas utilizando o programa de alinhamento múltiplo de seqüências Clustal X, conforme pode ser observado no Anexo 2 deste trabalho. Observamos polimorfismos em 89 posições do fragmento de 195 pb. A maioria desses polimorfismos está limitada a um pequeno número de seqüências e não servem para o nosso estudo. Não encontramos polimorfismos associados com o fenótipo de resistência a drogas, porém encontramos polimorfismos em 8 posições do DNA satélite que foram exclusivos em cepas do *T. cruzi* pertencentes ao zimodema 1. A posição, tipo e a freqüência desses polimorfismos nas seqüências analisadas está apresentado na Tabela 7. Nenhuma seqüência apresentou simultaneamente os oito polimorfismos citados.

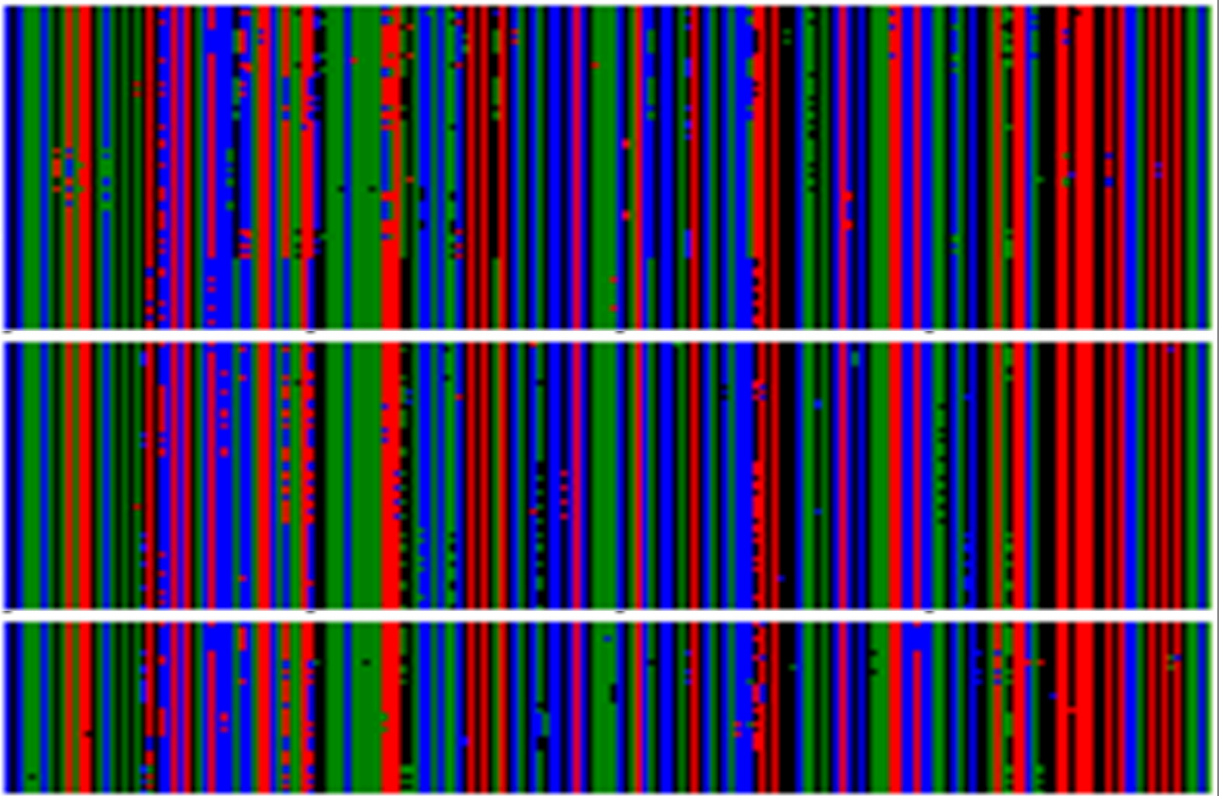


Figura 7

Alinhamento das unidades repetitivas de 195 pb do DNA satélite do *T. cruzi*. As seqüências estão divididas em três grupos de acordo com o zimodema das cepas de origem. Os três grupos são, de cima para baixo: Z1, Z2 e ZB. Os nucleotídeos estão representados por “spots” coloridos: verde – Adenina; vermelho – Timina; azul – Citosina; preto – Guanina.

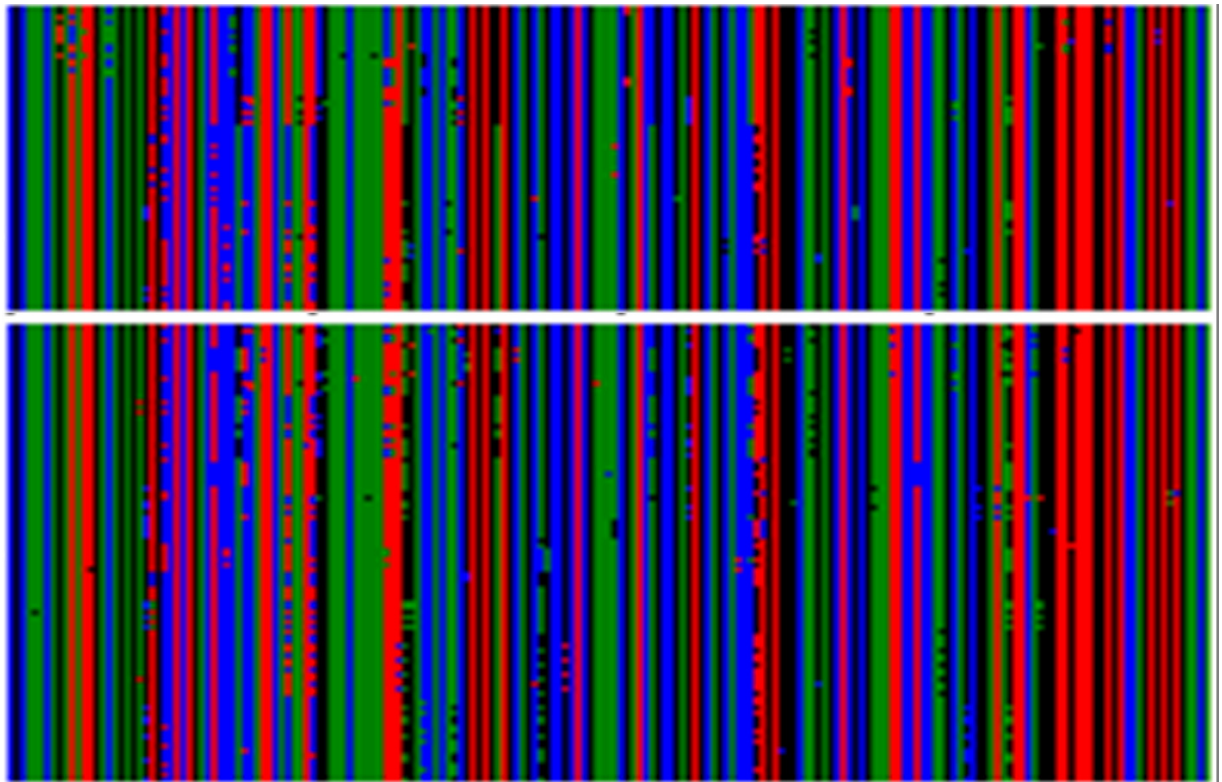


Figura 8

Alinhamento das unidades repetitivas de 195 pb do DNA satélite do *T. cruzi*. As seqüências estão divididas em dois grupos de acordo com o fenótipo de susceptibilidade das cepas de origem ao BZ e NFX. Os dois grupos são, de cima para baixo: cepas resistentes e sensíveis ao BZ e NFX. Os nucleotídeos estão representados por “spots” coloridos: verde – Adenina; vermelho – Timina; azul – Citosina; preto – Guanina.

Tabela 7

Posição, tipo e freqüência dos polimorfismos do fragmento de 195 pb do DNA satélite do *T. cruzi*, que foram exclusivos em cepas pertencentes ao zimodema 1.

CEPA		BS	Col	Quara	Yuyu	
Nº SEQ.		11	19	17	21	
POSIÇÃO E TIPO DO POLIMORFISMO	38 A/G	55	100	53	29	FREQUENCIA DO POLIMORFISMO (%)¹
	51 G/C	45	100	47	10	
	52 G/A	27	0	6	5	
	63 T/A	36	79	35	5	
	80 A/G	45	100	53	29	
	105 A/C	55	100	53	29	
	131 A/G	18	16	35	0	
	154 C/A	18	0	12	14	

BS – Barra Seca; Col – Colombiana; Quara – Quaraizinho.

¹ – Freqüência calculada a partir da 160 seqüências obtidas neste trabalho.

5.3.1.2 – Relações filogenéticas entre as seqüências.

Uma árvore filogenética foi construída utilizando as 160 seqüências nucleotídicas do DNA satélite de 12 cepas do *T. cruzi* (Figura 9 e Tabela 6). Observamos a formação de dois ramos principais que estão associados com os grupos I e II do *T. cruzi*. Um dos ramos, delimitado por um círculo vermelho (Figura 9) contém exclusivamente cepas do *T. cruzi* I (Zimodema 1). O outro ramo, bem maior, contém as cepas do *T. cruzi* II (Zimodemas 2 e B) e parte das seqüências de cepas *T. cruzi* I. Das quatro cepas *T. cruzi* I (Barra Seca, Colombiana, Yuyu e Quaraizinho) (Tabela 6), a Colombiana foi a única cujas seqüências ficaram agrupadas exclusivamente no ramo *T. cruzi* I, as outras três também se distribuíram no ramo *T. cruzi* II. O ramo da árvore destacado pelo círculo vermelho agrupou aproximadamente 20% das seqüências da cepa Yuyu, 50% das seqüências das cepas Barra Seca e Quaraizinho e 100% das seqüências da cepa Colombiana. Essa heterogeneidade sugere que existem polimorfismos exclusivos no DNA satélite de cepas do grupo I, e que esses polimorfismos não estão presentes em todas as unidades repetitivas. A tabela 6 mostra que das 160 seqüências de DNA satélite analisadas, 40 foram *T. cruzi* I e 120 *T. cruzi* II. Todas as 36 seqüências das cepas do zimodema B e as 56 do zimodema 2 foram *T. cruzi* II. Das 68 seqüências das cepas do zimodema 1, 40 foram *T. cruzi* I e 28 *T. cruzi* II.

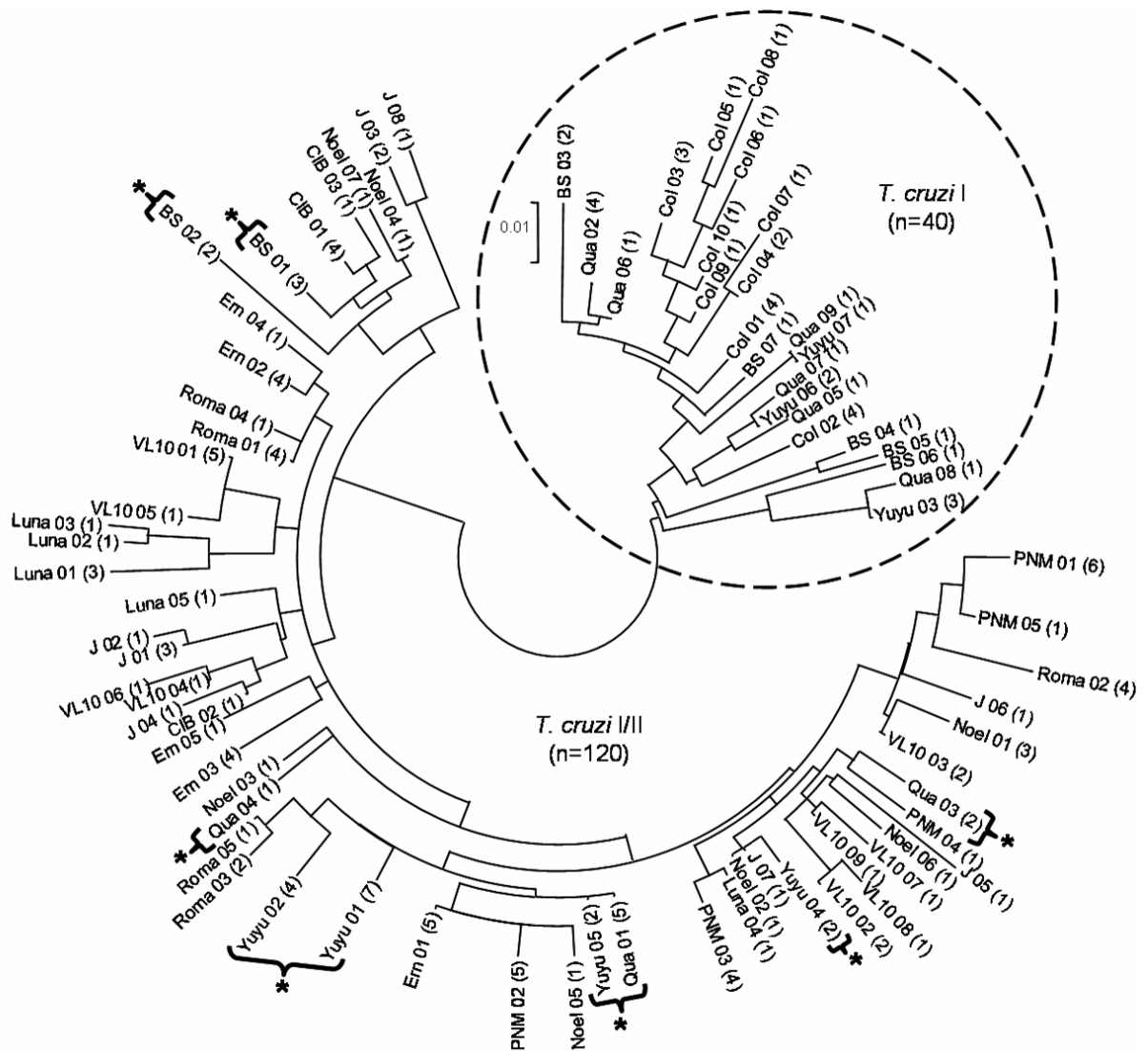


Figura 9

Árvore filogenética Neighbor-joining das 80 seqüências representativas do DNA satélite de 12 cepas do *T. cruzi*. O braço maior agrupa seqüências de cepas dos grupos I e II do *T. cruzi*. O braço menor, delimitado por um círculo, agrupa apenas seqüências de cepas do grupo *T. cruzi* I. Entre parênteses ao lado do código de identificação das seqüências (ver Anexo 1) está indicado o numero de seqüências idênticas obtidas neste trabalho. Cepas do *T. cruzi*: BS - Barra Seca, Col – Colombiana, Qua – Quaraizinho, CLB – CL-Brener, Roma – Romano, Ern – Ernane.

* – Seqüências de cepas do grupo *T. cruzi* I presentes no braço maior.

5.3.1.3 – Desenho de novos iniciadores.

A análise dos polimorfismos do DNA satélite do *T. cruzi* não revelou a presença de nenhum marcador molecular para o fenótipo de sensibilidade ou resistência a drogas, um dos nossos objetivos. No entanto, alguns polimorfismos permitem a distinção de cepas pertencentes ao zimodema 1, comparado com cepas pertencentes aos zimodemas 2 e B do *T. cruzi*. Desse modo, é possível utilizar tais polimorfismos para classificar os parasitos de acordo com os dois grupos principais: *T. cruzi* I (zimodema 1, associado com o ciclo silvestre do parasito) e *T. cruzi* II (zimodema 2, associado com o ciclo doméstico do parasito).

As análises desses polimorfismos foram então utilizadas para o desenho racional de novos iniciadores com a finalidade de por meio da reação de PCR, detectarmos com alta sensibilidade o DNA do parasito e simultaneamente classificarmos as cepas quanto aos grupos I e II do *T. cruzi*.

Foram desenhados e testados cinco iniciadores, dois senso e três antisenso, complementares aos diferentes sítios polimórficos encontrados. A Tabela 3 apresenta a seqüência nucleotídica de cada um dos iniciadores, nomeados seqüencialmente de TcSat 1 a 5. A Figura 10 apresenta a disposição desses iniciadores no fragmento de 195pb do DNA satélite do *T. cruzi*. Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa Gene Tool (ver item 4.14). Eles foram desenhados preferencialmente complementares às bases polimórficas características de cepas do *T. cruzi* I na extremidade 3' do iniciador. Os iniciadores TcSat são complementares a seis dos oito sítios polimórficos detectados. Não foram desenhados iniciadores complementares aos sítios polimórficos nas posições 131 (A/G) e 154 (C/A) que juntamente com 52 (G/A) foram os menos freqüentes.



Figura 10

Seqüência nucleotídica de duas unidades repetitivas do DNA satélite do *T. cruzi* (390 pb) e a disposição dos iniciadores Diaz 7 e 8 e TcSat 1 a 5 dentro da seqüência. As bases em azul representam os iniciadores senso; as bases em vermelho representam os iniciadores antisenso. Os polimorfismos encontrados apenas em seqüências de cepas pertencentes ao zimodema 1 estão em verde. A linha tracejada delimita a unidade de repetição de 195 pb.

5.3.2 – Análises da PCR utilizando diferentes combinações de iniciadores.

Diferentes combinações de iniciadores foram testadas nas reações de PCR com amostras de 10pg de DNA das cepas Colombiana e Quaraizinho do zimodema 1 (*T. cruzi* I), Noel e Ernane, do zimodema 2 e CL Brener e Romano, do zimodema B (*T. cruzi* II). As concentrações de reagentes para PCR e os programas utilizados estão sumarizados na metodologia (ver item 4.4). Paralelamente aos iniciadores testados foram realizadas reações de PCR utilizando os iniciadores Diaz 7 e 8 como controle da reação.

5.3.2.1 - Análise dos iniciadores Diaz 7 e 8.

O par de iniciadores Diaz 7 e 8 foi utilizado como ponto de partida para reações de PCR, clonagem e sequenciamento do DNA satélite do *T. cruzi*. Análises de seqüências depositadas em bancos de dados, seqüenciadas em nosso laboratório e de produtos de PCR submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida mostram que existe um grau razoável de variabilidade nos sítios de anelamento desses iniciadores, resultando em diferentes perfis de amplificação e/ou seleção de seqüências específicas. Esta variabilidade é devida à ocorrência de polimorfismos na seqüência nucleotídica dos iniciadores que não foram investigados em nosso trabalho. Comparações entre seqüências nucleotídicas do DNA satélite depositadas em bancos de dados (Figura 11) mostram que no sítio de anelamento do iniciador Diaz 7 existem polimorfismos preferencialmente localizados em cepas do zimodema 1 (*T. cruzi* I). Polimorfismos no sítio de anelamento do iniciador Diaz 8 parecem ter pouca ou nenhuma relação com os grupos do *T. cruzi*.

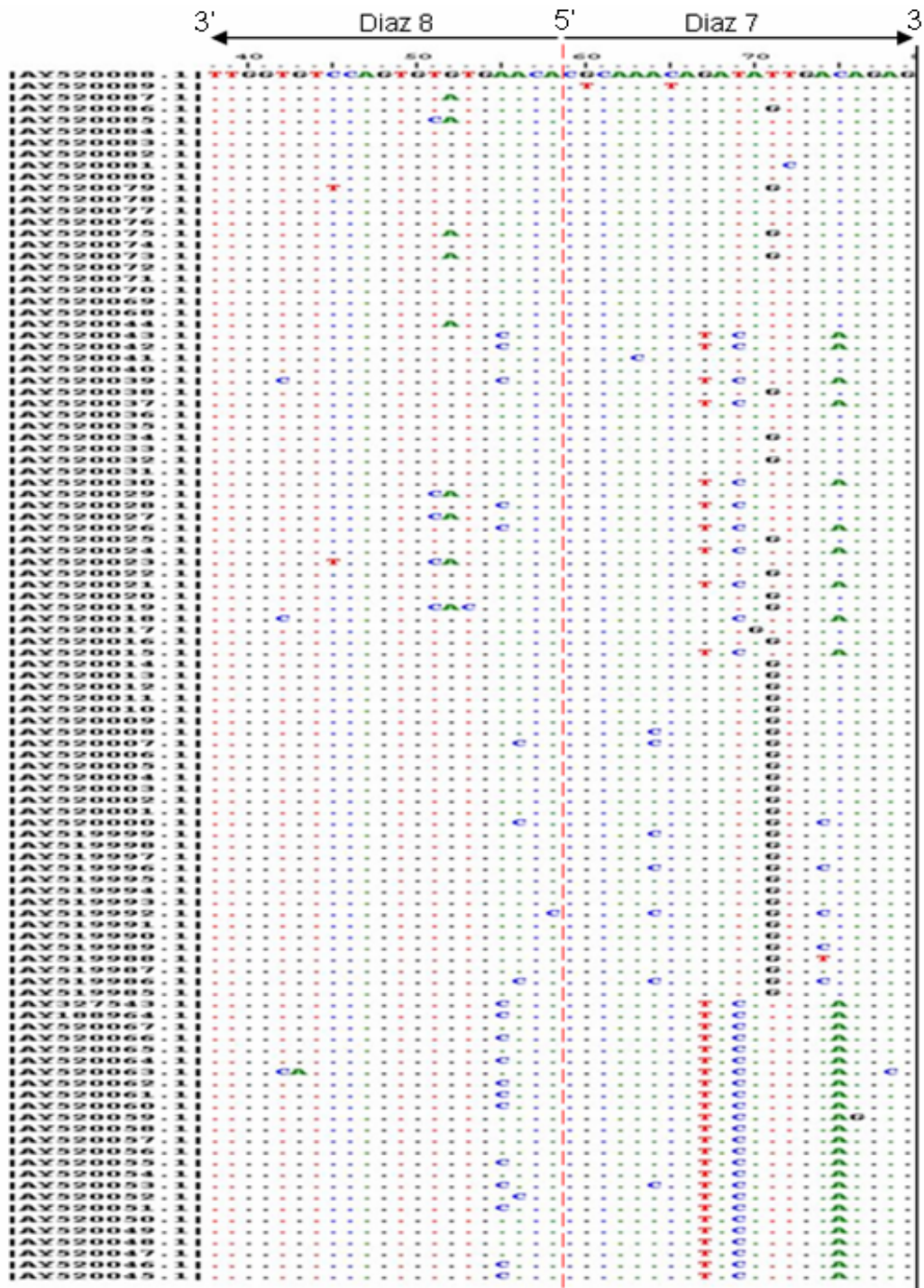


Figura 11

Alinhamento dos sítios complementares aos iniciadores Diaz 7 e Diaz 8 em 105 seqüências do DNA satélite (195 pb) do *T. cruzi* depositadas no banco de dados GenBank. Os códigos de acesso às seqüências estão indicados à esquerda. A linha vermelha tracejada delimita os dois iniciadores, indicados na parte superior da figura.

Comparamos os perfis de amplificação do DNA satélite de 30 cepas do *T. cruzi* com os iniciadores Diaz 7 e 8 (Figura 12). Todas as cepas foram testadas na concentração de 1 pg de DNA molde. Verificamos que existem diferenças significativas na intensidade dos fragmentos amplificados, em geral associadas a cepas do *T. cruzi* I. Observamos também presença do fragmento de 195pb em todas as 30 cepas estudadas. Além do fragmento esperado de 195 pb, observamos a presença de múltiplos desse fragmento que correspondem às unidades repetitivas em tandem. Esse perfil de amplificação é comum em seqüências repetitivas de DNA.

Para estudarmos a sensibilidade de detecção do fragmento de 195 pb por PCR com os iniciadores Diaz 7 e 8, selecionamos 3 cepas dos zimodemas 1, 2 e B. Comparamos os produtos amplificados por PCR utilizando diluições ao décimo (de 10.000 a 0,1fg) de DNA genômico (Figura 13). Os resultados mostram que o limite de detecção de DNA foi de 1fg para a cepa Colombiana (Z1) e CL-Brener (ZB), e de 0,1fg para a cepa Ernane (Z2). Estes resultados estão de acordo com as nossas observações anteriores, que indicam uma maior intensidade das bandas amplificadas nas cepas do *T. cruzi* do zimodema 2.

A especificidade da PCR foi analisada em relação ao DNA de outros parasitos como: *T. rangeli*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Como mostra a Figura 13, nenhum produto amplificado foi observado para esses parasitos, confirmando a especificidade da PCR. Este estudo está de acordo com trabalhos descritos na literatura, onde está apresentado o potencial uso da seqüência do DNA satélite do *T. cruzi* para o diagnóstico da doença de Chagas (Vidigal, 1996).

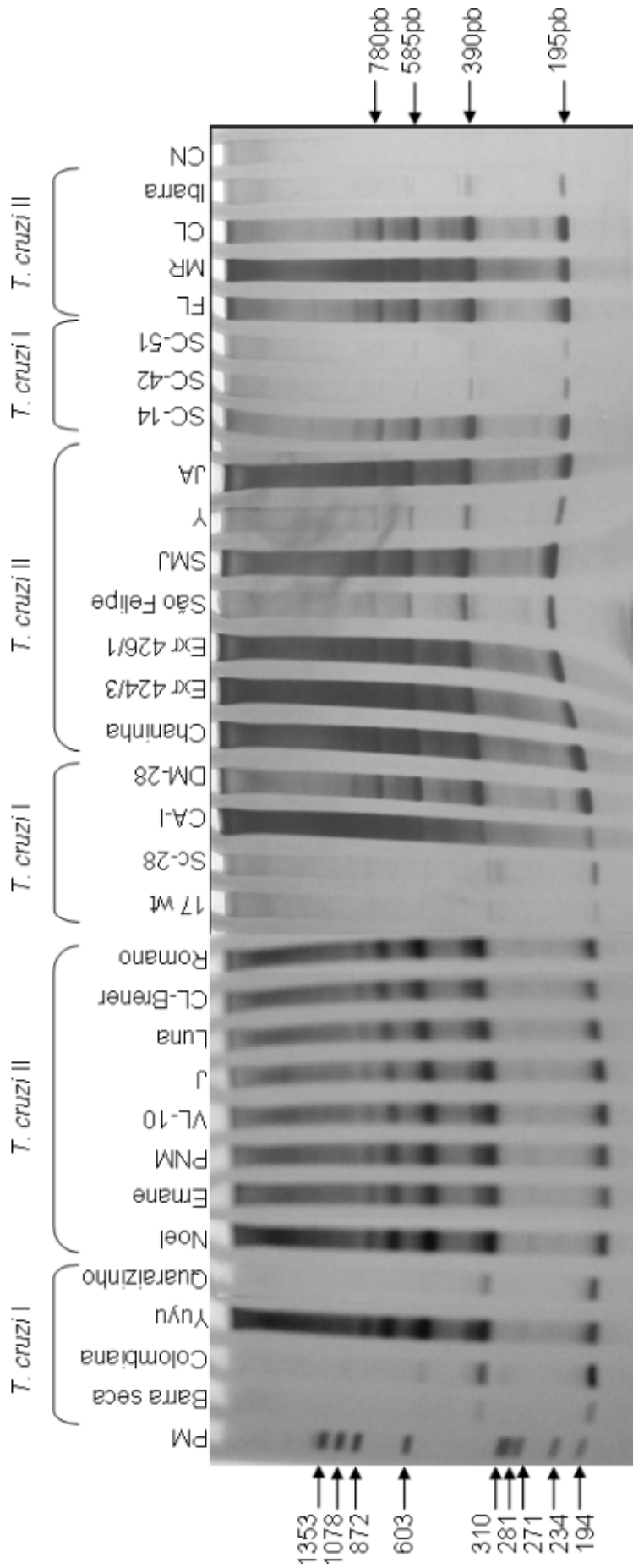


Figura 12

Perfil de amplificação do DNA satélite de 30 cepas do *T. cruzi*, utilizando os iniciadores Diaz 7 e Diaz 8. Além do fragmento esperado de 195 pb, foram também observados múltiplos da seqüência. As cepas analisadas estão classificadas segundo o grupo I e II do *T. cruzi*. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

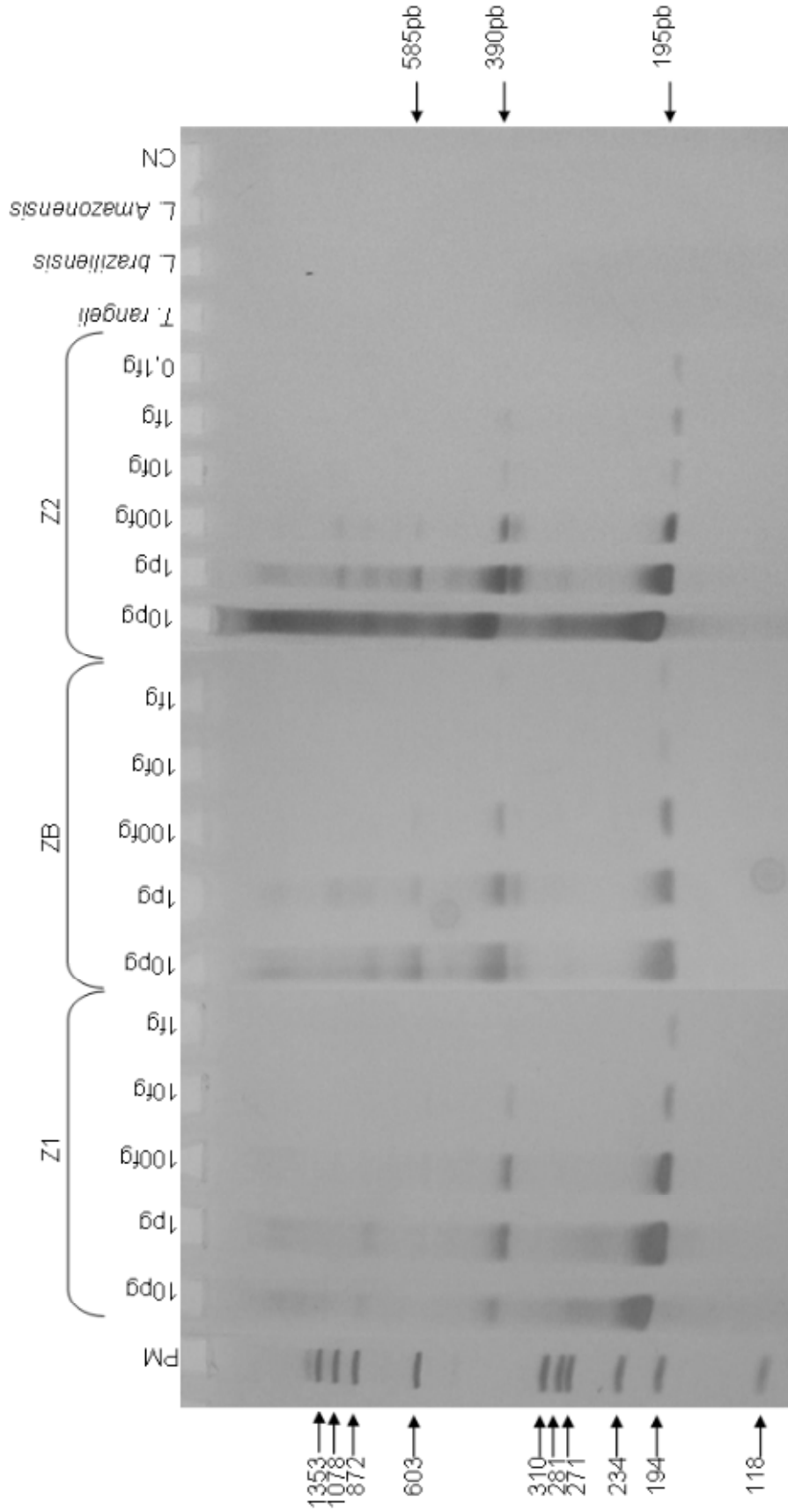


Figura 13

Perfil de amplificação do DNA satélite de cepas do *T. cruzi* dos zimodemas 1, 2 e B, utilizando os iniciadores Diaz 7 e Diaz 8. Diluições ao décimo das cepas Colombiana (Z1), CL-Brener (ZB) e Ernane (Z2) estão apresentadas na Figura. Além do fragmento esperado de 195 pb, também foram observados múltiplos da sequência. A figura também mostra a PCR utilizando amostras de 100 pg DNA de *T. rangeli*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

5.3.2.2 – Análise dos iniciadores TcSat 1-5.

A Figura 14 mostra o produto amplificado por PCR de 6 cepas do *T. cruzi* utilizando o par de iniciadores TcSat 1-5. Observamos um fragmento de tamanho esperado (80 pb) com baixa intensidade nas cepas Z1 e em uma cepa ZB. Esse perfil é inesperado, uma vez que a análise das seqüências indicava a presença desse polimorfismo apenas em cepas do zimodema 1. Esse resultado foi repetido em outros ensaios de PCR e outras cepas do *T. cruzi*, confirmando a heterogeneidade dessa seqüência também em cepas do ZB. Na figura, observamos também a presença de uma banda de 275 pb que pode corresponder a um fragmento amplificado entre iniciadores anelados a unidades repetitivas adjacentes que é comum de ocorrer no DNA satélite do *T. cruzi*. Observamos também que a PCR utilizando os iniciadores TcSat 1-5 apresenta baixa sensibilidade. Utilizando 10 pg de DNA genômico, conseguimos amplificar apenas algumas cepas do parasito.

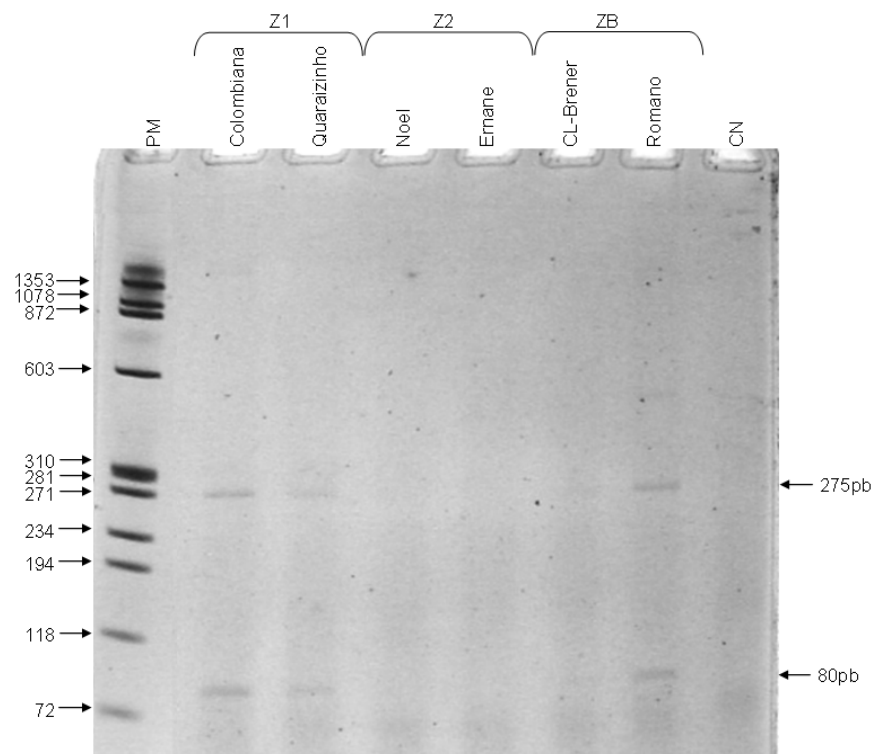


Figura 14

Perfil eletroforético (gel de poli-acrilamida 6% corado com prata) do DNA satélite de 6 cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcSat 1 e TcSat 5. As cepas analisadas estão classificadas segundo o zimodema. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

5.3.2.3 – Análises dos iniciadores TcSat 3, Diaz 7 e TcSat 1 e 3.

O uso dos iniciadores TcSat 3 e Diaz 7 nas reações de PCR permitiu a amplificação de fragmentos de 98 pb em todas as cepas testadas, indistintamente do zimodema ou grupo (Figura 15). Tentativas de aumentar a especificidade desses iniciadores resultaram em perfis de bandas com menor intensidade ou ausentes em todas as cepas sendo, portanto esse par de iniciadores inadequado ao propósito de diagnóstico.

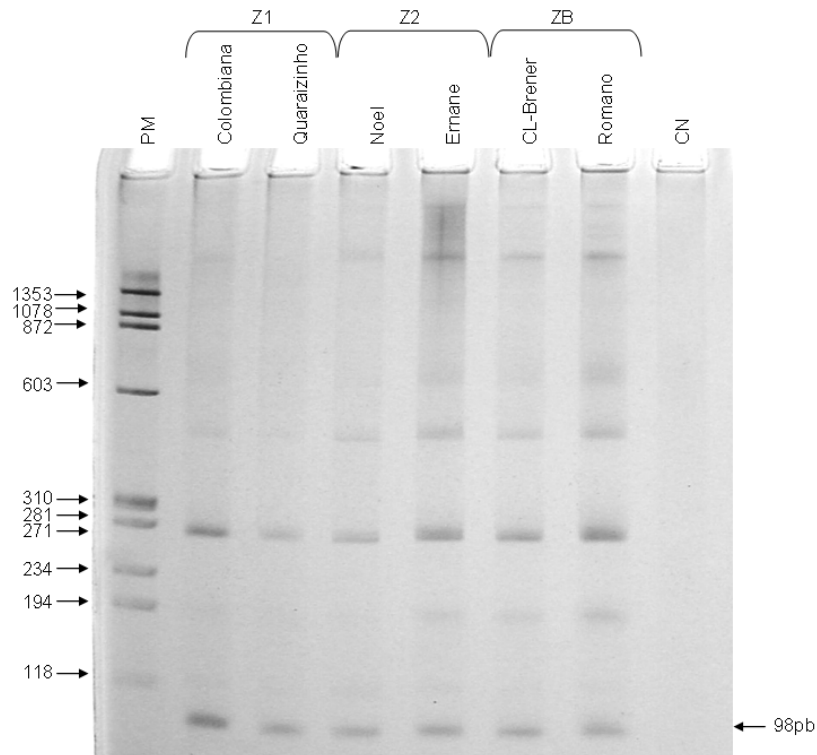


Figura 15

Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 6% corado com prata) do DNA satélite de 6 cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcSat 3 e Diaz 7. As cepas analisadas estão classificadas segundo o zimodema. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

Testamos ainda o par de iniciadores TcSat 1-3, que amplificaria um fragmento de 56 pb. No entanto não foi observado produto amplificado em nenhuma das cepas do *T. cruzi* utilizadas. Para confirmar este resultado, repetimos a PCR utilizando as mesmas amostras e reagentes, trocando apenas o par de iniciadores para Diaz 7 e 8. Observamos a amplificação do fragmento esperado de 195 pb.

5.3.2.4 – Análise dos iniciadores TcSat 2 e 4.

A PCR empregando os iniciadores TcSat 2-4 (Figura 16) apresentou o fragmento esperado de 168 pb. Além da banda esperada, foram também observados outros fragmentos maiores, que correspondem às unidades repetitivas em tandem do fragmento esperado. Observamos esse perfil de amplificação nas cepas pertencentes aos zimodemas 1 e B. Nenhum produto foi amplificado nas cepas do zimodema 2.

As primeiras análises dos iniciadores foram realizadas com apenas seis cepas do *T. cruzi*, duas de cada zimodema. No entanto, devido à possibilidade de utilizarmos este perfil em conjunto com outra PCR (outros iniciadores), resolvemos verificar o perfil dos produtos de PCR utilizando um maior número de cepas. Os resultados deste ensaio estão apresentados na Tabela 8, onde o perfil eletroforético observado está representado na tabela pela presença (+) ou ausência (-) de produto amplificado.

Analisamos a presença desse fragmento em 30 cepas do *T. cruzi*: 11 cepas pertencentes ao Z1, 10 cepas Z2 e 9 cepas ZB. Observamos que duas cepas Z1 e três ZB não apresentaram produto com esses iniciadores. Por outro lado, três cepas Z2 amplificaram o fragmento de 168 pb. Concluímos que a PCR do DNA satélite do *T. cruzi* utilizando esse par de iniciadores não é adequada para a detecção e nem a classificação das cepas.

As diferentes combinações de pares de iniciadores testados produziram perfis de bandas não adequados para a classificação das cepas, uma vez que não amplificou exclusivamente o DNA de cepas zimodema 1. Assim, resolvemos avaliar os perfis de amplificação por PCR em um sistema multiplex. Testamos dois conjuntos de iniciadores: 1) TcSat 1 e os iniciadores Diaz 7 e 8; e 2) TcSat 4 e os iniciadores Diaz 7 e 8.

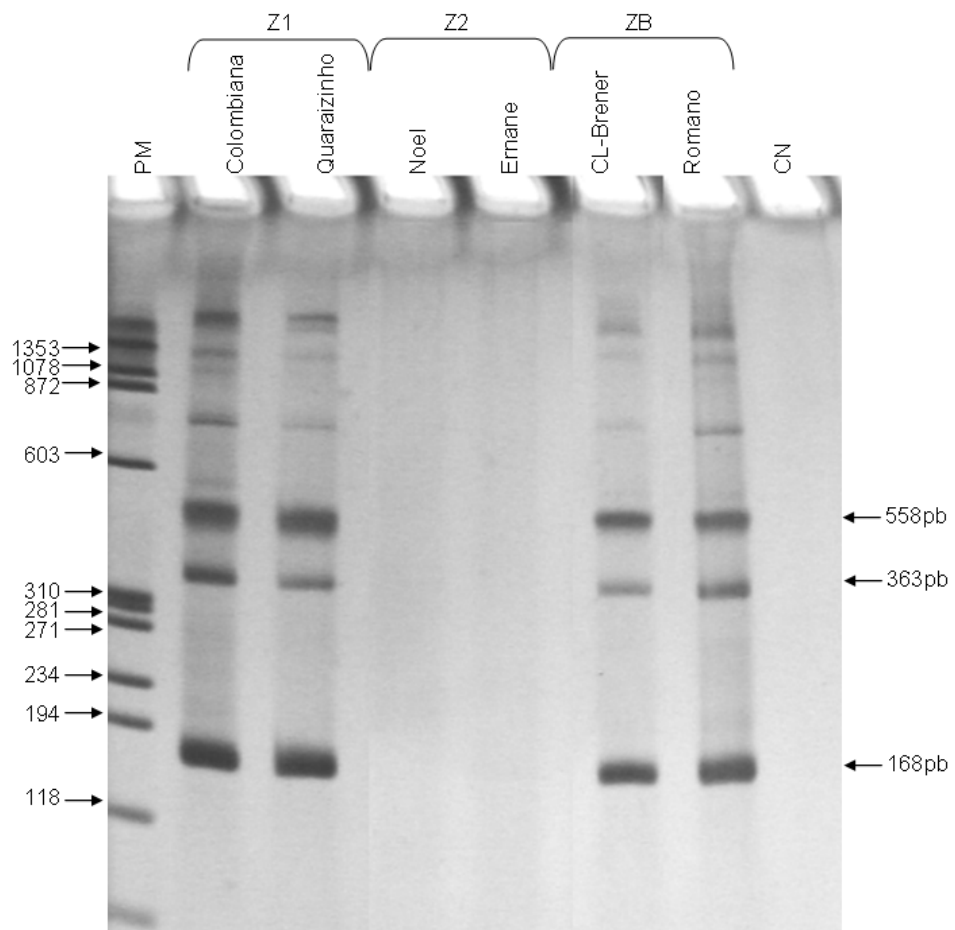


Figura 16

Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 6% corado com prata) do DNA satélite de 6 cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcSat 2 e TcSat 4. As cepas analisadas estão classificadas segundo o zimodema. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

Tabela 8

Análise do produto amplificado por PCR de 30 cepas do *T. cruzi*. Os iniciadores utilizados foram o par TcSat 2 e 4. Os sinais + e – indicam respectivamente a presença e a ausência de produto amplificado na cepa.

Cepa	Z. ¹	PCR	Cepa	Z. ¹	PCR	Cepa	Z. ¹	PCR
Colombiana	1	+	Ernane	2	-	Cl-Brener	B	+
Quaraizinho	1	+	Noel	2	-	Romano	B	+
Barra Seca	1	+	VL-10	2	-	J	B	+
CA-I	1	+	Chaninha	2	-	Luna	B	-
Yuyu	1	-	PNM	2	+	FL	B	+
17 wt	1	+	São Felipe	2	-	CL	B	+
SC-14	1	+	SMJ	2	-	JÁ	B	-
Sc-28	1	+	Y	2	-	Ibarra	B	-
SC-42	1	+	Exr 424	2	+	MR	B	+
SC-51	1	+	Exr 426	2	+			
DM-28	1	-						

1 – Zimodema das cepas do *T. cruzi* (Murta *et al.*, 1998).

5.3.2.5 – Análises dos iniciadores TcSat 1 Diaz 7 e 8.

Utilizando o conjunto de iniciadores TcSat 1 e Diaz 7 e 8 (Figura 17), observamos produto amplificado nas cepas pertencentes aos zimodemas 1 e B. No entanto, uma cepa do zimodema 1 (Quaraizinho) não amplificou. Os fragmentos observados correspondem ao produto amplificado de 195 pb dos iniciadores Diaz 7 e 8 e fragmentos de tamanhos múltiplos de 195 pb. Não foi observado em nenhum caso o fragmento de 153 pb esperado como produto amplificado pelos iniciadores TcSat 1 e Diaz 8. Diante desses resultados, excluímos a utilização desses iniciadores em nossa análise

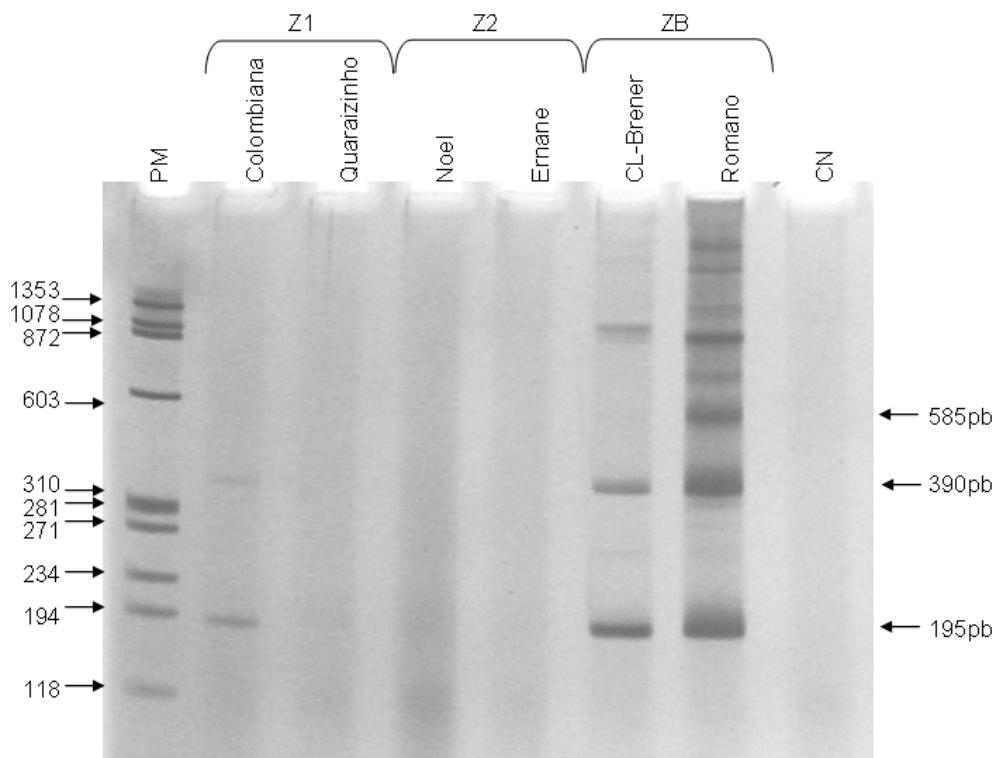


Figura 17

Perfil eletroforético (gel de poli-acrilamida 6% corado com prata) do DNA satélite de 6 cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcSat 1, Diaz 7 e 8. As cepas analisadas estão classificadas segundo o zimodema. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

5.3.2.6 – Análises dos iniciadores TcSat 4, Diaz 7 e 8.

Diferente do perfil apresentado anteriormente, a PCR utilizando os iniciadores TcSat 4 e Diaz 7 e 8 amplificaram um conjunto de fragmentos que permitiram a distinção de cepas do *T. cruzi* nos grupos I e II. Conforme está apresentado na Figura 18, o fragmento esperado de 111 pb resultado da amplificação com os iniciadores TcSat 4 e Diaz 8 está presente em todas as cepas do *T. cruzi* testadas.

Além do fragmento de 111pb, observamos a presença do fragmento de 195 pb que corresponde à amplificação dos iniciadores Diaz 7 e 8. No entanto, esse fragmento está presente apenas nas cepas do *T. cruzi* II (zimodemas 2 e B). Outros fragmentos de 306 e 390 pb, provavelmente resultados da amplificação entre iniciadores anelados a seqüências adjacentes, estão presentes nas amostras. Este perfil foi confirmado em várias reações de PCR utilizando um número maior de cepas, como será visto adiante.

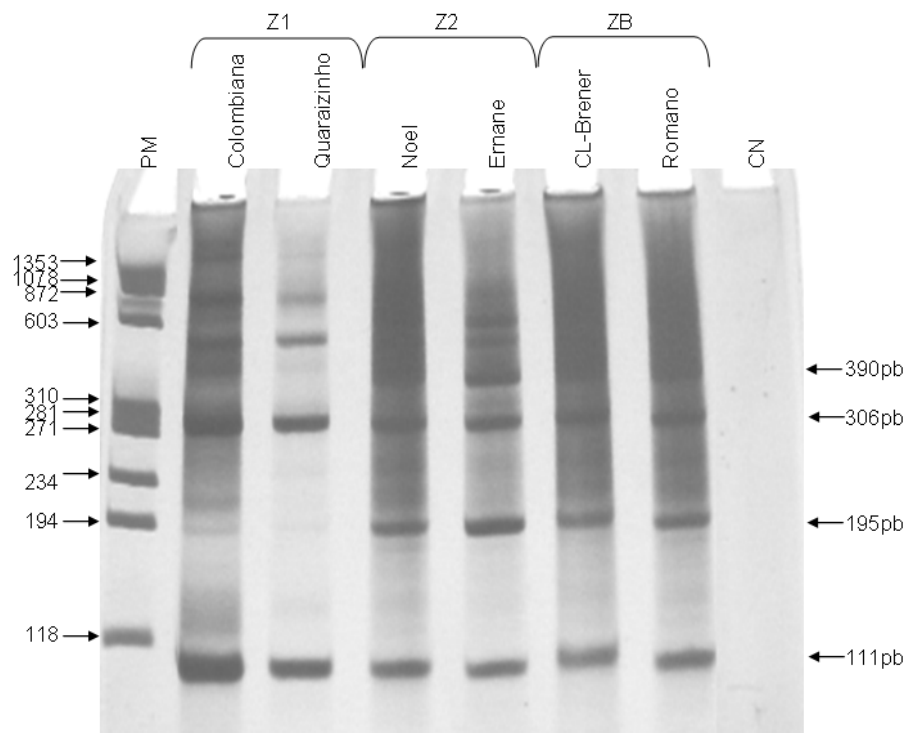


Figura 18

Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 6% corado com prata) do DNA satélite de 6 cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcSat 4, Diaz 7 e Diaz 8. As cepas analisadas estão classificadas segundo o zimodema. Além dos fragmentos esperados de 111 pb e 195 pb, múltiplos das seqüências também são observados. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

Para avaliarmos o uso dessa combinação de iniciadores na PCR para a detecção e classificação de cepas de *T. cruzi*, utilizamos um painel de 30 cepas do *T. cruzi*, sendo 11 cepas do *T. cruzi* I (Z1) e 19 cepas do *T. cruzi* II (10 cepas do Z2 e 9 do ZB). Os resultados deste estudo estão apresentados na Figura 19. Todas as cepas estudadas amplificaram o fragmento de 111 pb, que pode ser utilizado como controle de amplificação do DNA do *T. cruzi* na reação de PCR. Nenhuma das 11 cepas do *T. cruzi* I apresentou o fragmento de 195 pb, enquanto que todas as cepas do *T. cruzi* II apresentaram esse fragmento. Este resultado está de acordo com nossos resultados anteriores e mostra que o uso da PCR com os iniciadores TcSat 4 e Diaz 7 e 8 pode ser uma ferramenta útil para detecção e classificação de cepas do *T. cruzi*.

Foram observadas diferenças significativas na intensidade das bandas em algumas cepas do parasito analisadas. Estas diferenças não têm relação com os grupos I e II do *T. cruzi* ou zimodema.

Para avaliarmos os limites de detecção e discriminação das cepas do *T. cruzi*, selecionamos as cepas Colombiana (*T. cruzi* I) e Ernane (*T. cruzi* II). Comparamos a sensibilidade por PCR utilizando diluições seriadas ao décimo de DNA genômico de 10.000 a 1 fg (Figura 20). Observamos que a quantidade de DNA mínima para detecção das bandas de 111 e de 195 pb foi de 10 fg para ambas as cepas. Os resultados mostram que foi possível discriminar as cepas dos grupos do *T. cruzi* nessa faixa de concentração de DNA.

Avaliamos a especificidade da PCR através de comparações entre o perfil eletroforético de DNA em cepas do *T. cruzi* e dos parasitos: *T. rangeli*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Figura 20). Nenhum produto amplificado foi observado nestes parasitos na concentração de 100 pg de DNA, confirmando a especificidade da PCR.

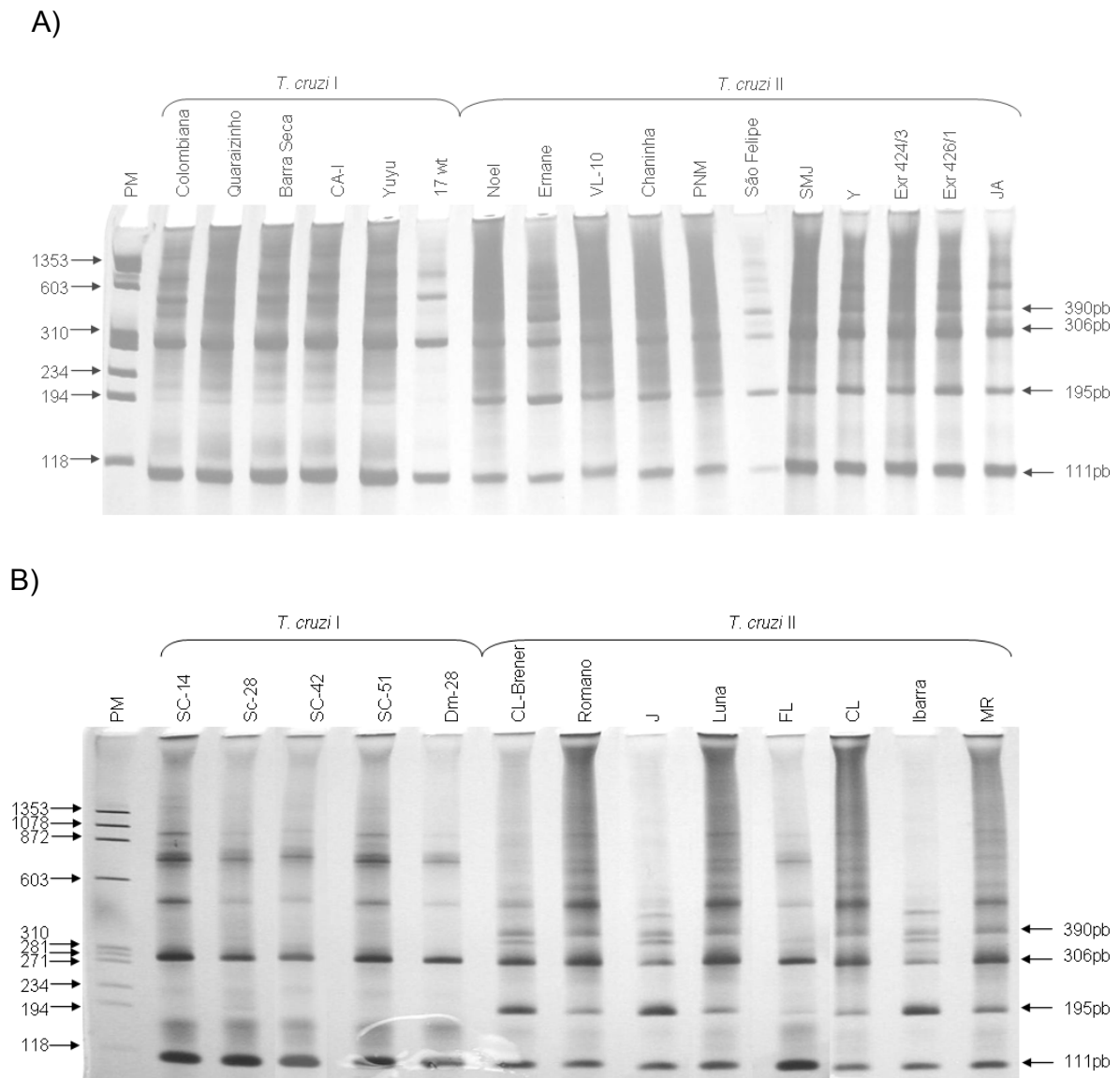


Figura 19

Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 6% corado com prata) do DNA satélite de 30 cepas do *T. cruzi* utilizando os iniciadores TcSat 4, Diaz 7 e 8. As cepas analisadas estão classificadas segundo os grupos do *T. cruzi* I e II. As 30 cepas utilizadas estão divididas nas Figuras A e B. Além dos fragmentos esperados de 111 pb e 195 pb, múltiplos das seqüências também são observados. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

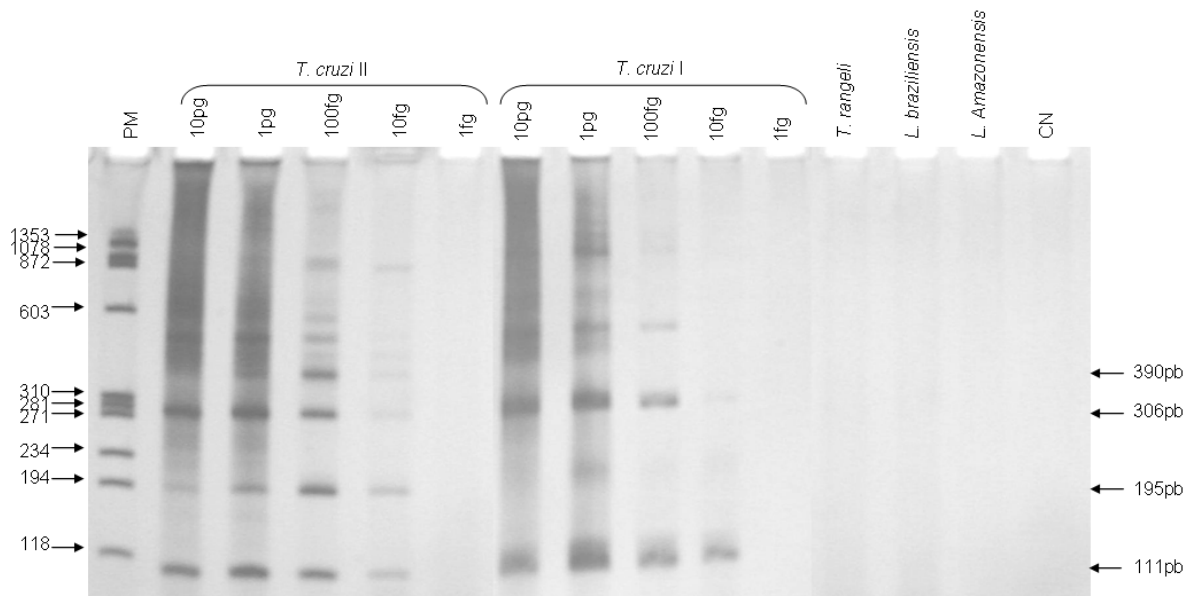


Figura 20

Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 6% corado com prata) do DNA satélite de 2 cepas do *T. cruzi*, com os iniciadores TcSat 4 e Diaz 7 e 8. Diluições ao décimo das cepas Colombiana (*T. cruzi* I), e Ernane (*T. cruzi* II) estão apresentadas na Figura. Além dos fragmentos esperados de 111 pb e 195 pb, múltiplos das seqüências também são observados. A Figura também mostra a PCR utilizando amostras de 100 pg de DNA de *T. rangeli*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

5.3.3 – Análises com amostras típicas de pesquisa de campo.

A fim de avaliarmos as possibilidades de uso do sistema de PCR multiplex em amostras de *T. cruzi* de campo, utilizamos os iniciadores TcSat 4, Diaz 7 e 8 para a detecção e discriminação das cepas do *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. As amostras selecionadas foram: sangue de camundongos experimentalmente infectado com *T. cruzi* e coletado em papel de filtro, DNA do creme leucocitário de pacientes chagásicos na fase aguda e fezes de *Triatoma infestans* naturalmente infectados, depositadas em papel de filtro.

5.3.3.1 – Ensaio com sangue de camundongos experimentalmente infectado com *T. cruzi* e coletado em papel de filtro.

Camundongos C57 foram infectados com as cepas: Colombiana (*T. cruzi* I) e Y (*T. cruzi* II) do *T. cruzi*. No pico da parasitemia, 16º dia de infecção para a cepa Colombiana e 7º dia para a cepa Y, o sangue dos camundongos foi coletado do plexo retro-orbital e o número de parasitos/ μ l foi determinado pelo método de Brener. Amostras de 5 μ l de sangue foram coletados em papel de filtro e o DNA extraído conforme item 4.3b.

Em uma etapa preliminar, avaliamos a extração utilizando água ou tampão TE (Tris-EDTA) para a eluição, e a presença ou ausência de proteinase K na etapa de extração. As amostras contendo proteinase K foram incubadas a 56°C por 30 minutos e depois aquecidas a 94°C por 10 minutos para inativação da enzima. Enquanto que as amostras sem proteinase K apenas foram aquecidas a 70°C por 10 minutos. Nossos resultados mostram que a extração sem proteinase K e a eluição em água é a metodologia mais adequada para extração de DNA de sangue em papel de filtro (Figura 21).

Para avaliarmos se o DNA do hospedeiro poderia interferir na PCR multiplex, foram realizados testes de especificidade e de inibição da reação pelo DNA do camundongo. Nestes ensaios, foram utilizadas amostras de 10 ng de DNA purificado de um camundongo não infectado, sozinho ou misturado a diluições seriadas ao décimo de 1 pg a 10 fg do DNA purificado das cepas Colombiana e Y. Nenhum produto amplificado foi observado ao se utilizar o DNA de camundongo sozinho. Além disso, a presença do DNA do camundongo na reação não alterou a sensibilidade da PCR multiplex (10 fg) mesmo ao utilizarmos uma concentração de DNA do camundongo 10⁶ vezes maior que a concentração de DNA do parasito. A Figura 22 mostra esses

resultados utilizando DNA purificado de camundongo e do *T. cruzi*, e também os resultados de amostras de DNA de sangue de camundongos experimentalmente infectados com as cepas Colombiana e Y, extraídas do papel de filtro e amplificadas pela PCR multiplex (2 amostras de cada cepa).

Ao todo utilizamos 24 amostras de sangue de camundongos experimentalmente infectados, 12 amostras de cada cepa. Observamos a presença dos fragmentos de 111 pb para ambas cepas e o fragmento de 195 pb foi exclusivo para a cepa Y (*T. cruzi* II). Das 24 amostras testadas, 10 não amplificaram nenhum fragmento. Além disso, observamos a presença de um “rastros” uniforme em todas as amostras, provavelmente devido à presença de proteínas e demais restos celulares, resultante do processo de extração. As 10 amostras que não apresentaram produto amplificado foram re-testadas, e permaneceram negativas. Além disso, fizemos uma nova extração do DNA do sangue dos camundongos e o resultado da PCR permaneceu negativo. Como controle da reação de PCR, amplificamos todas as amostras com os iniciadores Diaz 7 e 8, que apresenta maior sensibilidade de detecção do DNA do parasito (0,1 fg) e comparamos com o multiplex Diaz 7 e 8 adicionado do TcSat 4 (10 fg). Os resultados mostraram que as amostras negativas para PCR multiplex também foram negativas para PCR com Diaz 7 e 8 (dados não mostrados).

A Tabela 9 resume os resultados das 24 amostras de DNA de sangue de camundongo amplificadas por PCR multiplex. Nossos resultados mostraram que das 12 amostras de cada cepa, 8 amostras da cepa Colombiana e 6 da cepa Y foram positivas para a PCR e permitiram a correta classificação dos grupos do *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. O número de parasitos por microlitro de sangue das amostras variou de 0,2 a 3.922. No entanto a PCR somente apresentou produto amplificado quando utilizamos amostras com pelo menos 20 parasitos por microlitro para a cepa Colombiana e 200 parasitos por microlitro para a cepa Y. Nestes ensaios, portanto, a sensibilidade de detecção da cepa Colombiana foi dez vezes maior que a sensibilidade da cepa Y.

Embora 75% das amostras da cepa Colombiana tenham apresentado resultados positivos contra somente 50% das amostras da cepa Y, não podemos afirmar que o sistema de PCR funciona melhor com cepas do *T. cruzi* I. A forma de coleta, tratamento com anticoagulante e homogeneização, afeta o número de parasitos presentes em cada amostra. Além disso, a variabilidade do número de cópias do DNA satélite e a frequência dos polimorfismos complementares aos iniciadores podem estar interferindo na sensibilidade das cepas estudadas, sem, no entanto ter relação com o grupo do *T. cruzi* a qual pertencem.

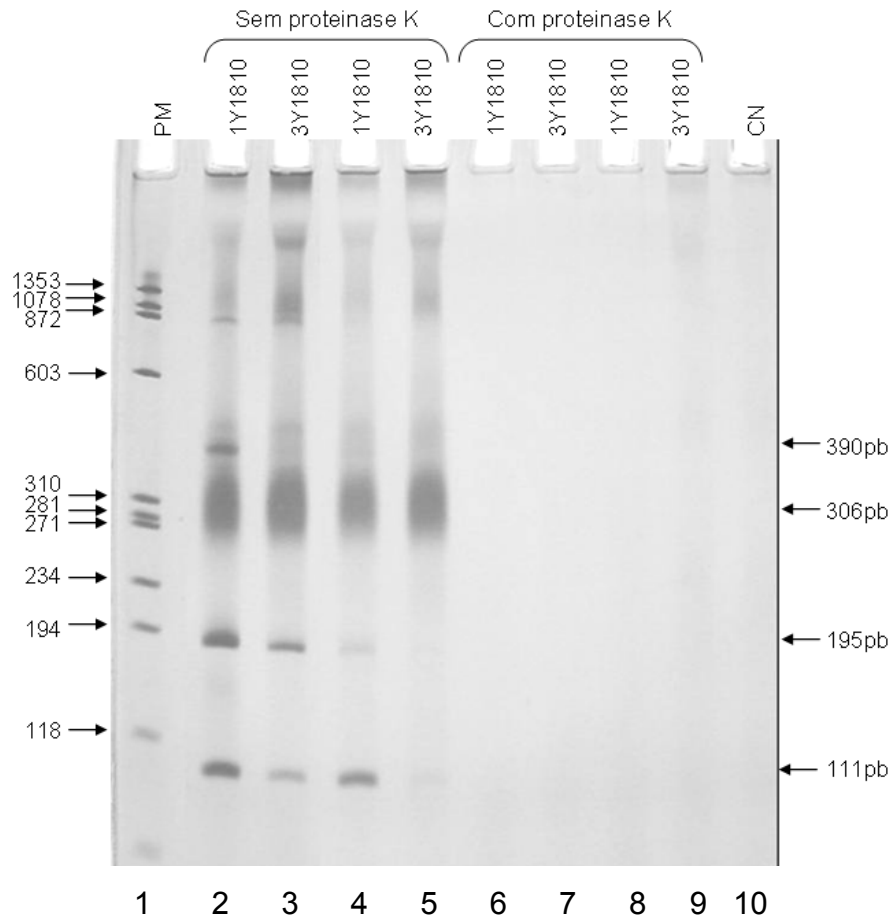


Figura 21

Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 6% corado com prata) do DNA satélite de sangue de camundongo infectado com a cepa Y do *T. cruzi*, extraído de papel de filtro com e sem proteinase K. Os iniciadores utilizados foram TcSat 4, Diaz 7 e 8. As canaletas 2, 3, 6 e 7 são de amostras eluídas em água. As canaletas 4, 5, 8 e 9 são das mesmas amostras eluídas em TE. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

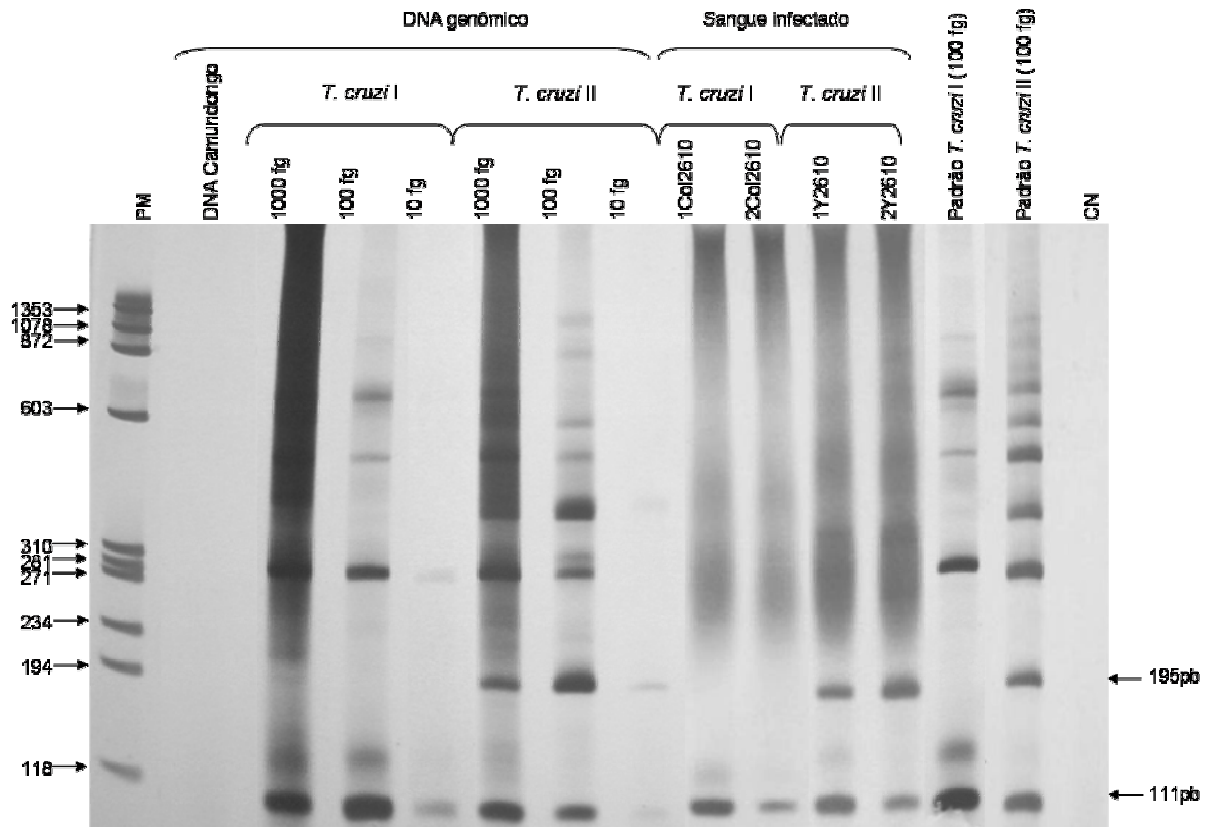


Figura 22

Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 6% corado com prata) da PCR multiplex utilizando excesso de DNA de camundongo ao qual foram adicionadas quantidades conhecidas de DNA do *T. cruzi*. A figura também mostra amostras de sangue de camundongos experimentalmente infectados com as cepas: Colombiana (*T. cruzi* I) e Y (*T. cruzi* II). Como controles foram utilizados DNA de camundongo não infectado, amostras de DNA padrão das cepas Colombiana e Y e um controle negativo sem DNA. As amostras utilizadas estão classificadas segundo os grupos do *T. cruzi* I e II. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

Tabela 9

Análise por PCR de 24 amostras de DNA extraído de sangue de camundongos infectados com *T. cruzi*. Os iniciadores utilizados foram TcSat 4, Diaz 7 e 8.

Cepa	Amostra	Paras/μl	PCR*	Cepa	Amostra	Paras/μl	PCR*
Colombiana	Col_1	400	I	Y	Y_1	3922	-
	Col_2	200	I		Y_2	3052	II
	Col_3	20	I		Y_3	169	II
	Col_4	2	-		Y_4	2000	II
	Col_5	0,2	-		Y_5	200	II
	Col_6		I		Y_6	20	-
	Col_7		I		Y_7	2	-
	Col_8		-		Y_8	0,2	-
	Col_9		I		Y_9		II
	Col_10		I		Y_10		-
	Col_11		-		Y_11		-
	Col_12		I		Y_12		II

* Produto de PCR característico de *T. cruzi* I ou *T. cruzi* II

(-) – PCR negativo

5.3.3.2 – Ensaio com DNA de creme leucocitário humano infectado com *T. cruzi*.

As amostras de creme leucocitário de pacientes infectados com *T. cruzi* foram coletadas e o DNA foi extraído no laboratório do Dr. Mário Steindel (Laboratório de Protozoologia, Universidade Federal de Santa Catarina). Em nosso estudo, testamos 7 amostras de pacientes na fase aguda da doença de Chagas. Estas amostras foram tipadas por PCR utilizando os iniciadores dos genes do mini-exon e subunidade 24S do RNA ribossomal (rDNA) (Pacheco *et al.*, Anais do XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2005) e todas foram classificadas como *T. cruzi* II. Além disso, essas mesmas amostras foram submetidas à caracterização isoenzimática e foram classificadas como zimodema Z2.

Testes de especificidade e de inibição da reação pelo DNA humano foram realizados semelhantes aos ensaios descritos para o DNA de camundongo. Foram utilizadas amostras de 24 ng de DNA humano purificado, sozinho ou misturado a diluições seriadas ao décimo de 1 pg a 10 fg do DNA purificado das cepas Colombiana e Y. Da mesma forma que o DNA de camundongo, o DNA humano não é amplificado pela PCR multiplex nestas concentrações utilizadas, assim como não altera a sensibilidade da PCR (10 fg) mesmo estando presente a uma concentração $2,4 \times 10^6$ vezes maior que a concentração de DNA do parasito. A Figura 23 mostra esses resultados da PCR multiplex utilizando DNA humano purificado e DNA do *T. cruzi*, e também os resultados de 4 amostras de DNA do creme leucocitário de pacientes na fase aguda da doença de Chagas. Como controles da PCR, adicionamos amostras de DNA genômico de cepas padrão do grupo I (Colombiana) e II (Y) do *T. cruzi*.

Observamos que todas as 7 amostras de pacientes apresentaram o perfil *T. cruzi* II, com a presença do fragmento de 195 pb, semelhante à amostra padrão grupo II. Todas as amostras testadas pertencem a cepas do *T. cruzi* II, o que está de acordo com as análises de isoenzimas, mini-exon e rDNA 24S. Esses dados corroboram com os dados da literatura que mostram uma associação do grupo *T. cruzi* II com o ciclo doméstico do parasito.

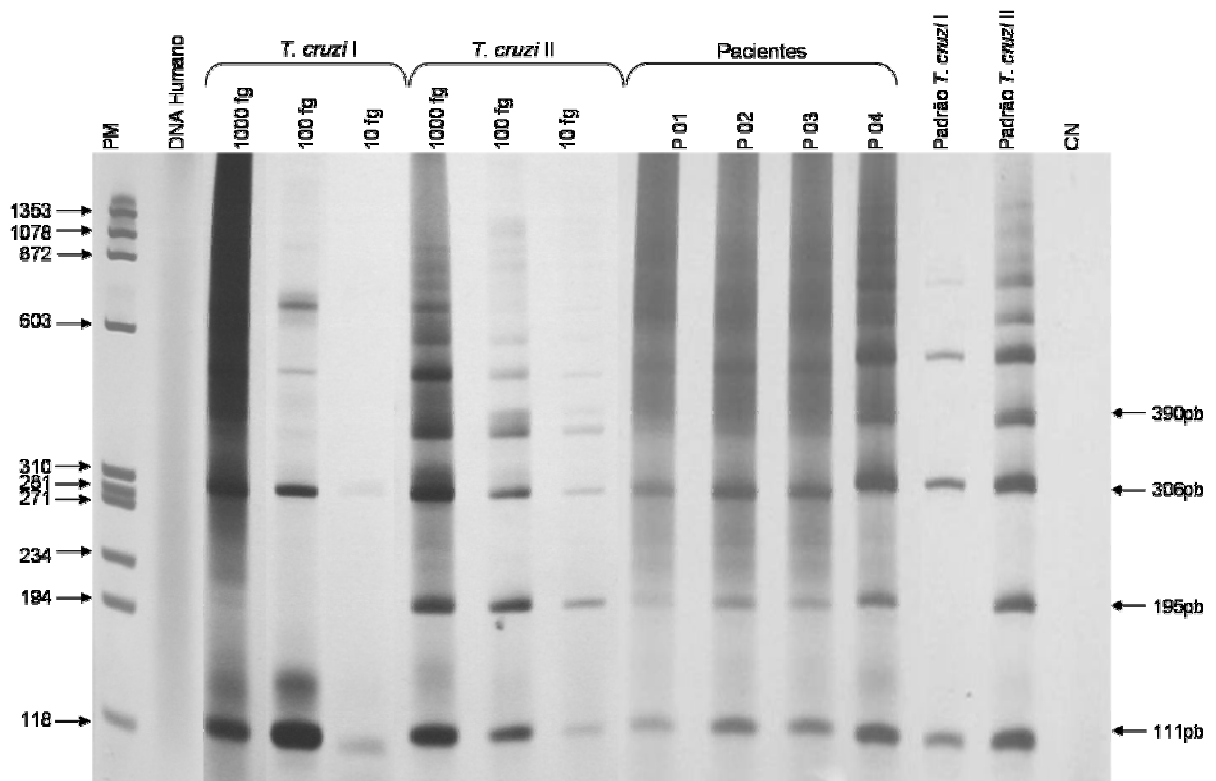


Figura 23

Perfil eletroforético (gel de poliácridamida 6% corado com prata) da PCR multiplex utilizando excesso de DNA humano ao qual foram adicionadas quantidades conhecidas de DNA do *T. cruzi*. A figura também mostra amostras de DNA de creme leucocitário de 4 pacientes na fase aguda da doença de Chagas. Como controles foram utilizados DNA humano não infectado, amostras de DNA padrão das cepas Colombiana (*T. cruzi* I) e Y (*T. cruzi* II) e um controle negativo sem DNA. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

5.3.3.3 – Ensaios com fezes de triatomíneos coletadas em papel de filtro.

Testamos em nosso estudo, 15 amostras de fezes de *Triatoma infestans* coletados no sítio Bondinha, no município de Mato Queimado – RS e mantidos no Laboratório de triatomíneos do CPqRR. Realizamos um exame microscópico em lâmina das fezes para a identificação dos triatomíneos infectados com *T. cruzi*. Seleccionamos 11 amostras positivas e 4 negativas. Algumas amostras foram colocadas diretamente em papel de filtro enquanto outras, com menor quantidade foram diluídas em 5 µl de PBS antes de serem colocadas sobre o papel de filtro.

A Figura 24 representa o perfil de amplificação por PCR multiplex de 5 amostras de

fezes de *T. infestans* e 2 amostras de DNA padrão *T. cruzi* grupo I e II. Os resultados mostram que as três primeiras amostras apresentaram perfil de amplificação *T. cruzi* grupo I, semelhante ao grupo padrão I. A Tabela 10 mostra que a PCR multiplex foi negativa para 4 amostras e foi positiva para as 11, confirmando os achados microscópicos. Todas as amostras foram classificadas como *T. cruzi* I, o que está de acordo com os dados da literatura que mostram uma associação do grupo *T. cruzi* I com o ciclo silvestre do parasito.

Tabela 10

Análise por PCR de 15 amostras de DNA extraído de fezes de *T. infestans*. Os iniciadores utilizados foram TcSat 4, Diaz 7 e Diaz 8.

Amostra	PCR	Microsc.
Ti_1		+
Ti_2		+
Ti_3		+
Ti_4		+
Ti_5		+
Ti_6		+
Ti_7		+
Ti_8		+
Ti_9		+
Ti_10		+
Ti_11		+
Ti_12	-	-
Ti_13	-	-
Ti_14	-	-
Ti_15	-	-

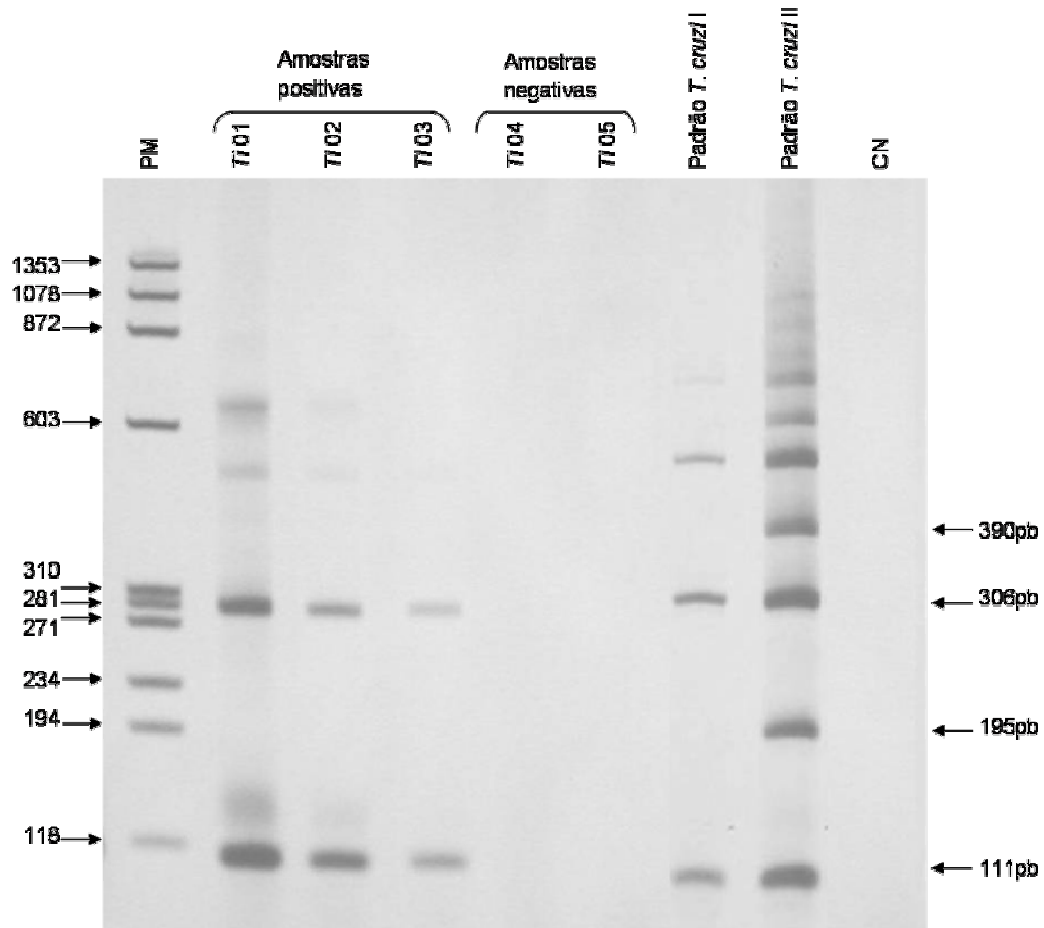


Figura 24

Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 6% corado com prata) da PCR multiplex de 5 amostras de DNA extraídas de fezes de *T. infestans* coletados no município de Mato Queimado – RS. Das 5 amostras, 3 apresentaram *T. cruzi* detectado por exame microscópico e 2 amostras não possuíam o parasito. Como controles foram utilizadas amostras de DNA padrão das cepas Colombiana (*T. cruzi* I) e Y (*T. cruzi* II) e um controle negativo sem DNA. PM – padrão de Peso Molecular Φ X 174 digerido com a enzima *Hae* III (em pb); CN – Controle Negativo (sem DNA).

DISCUSSÃO

6.0 DISCUSSÃO

Atualmente, a doença de Chagas continua sendo um importante problema de saúde pública por diversos motivos. Estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas com o *T. cruzi* e que 100 milhões de pessoas estão sob risco de infecção nas Américas (WHO, 2004). É necessário manter controle em áreas de habitat silvestre e de novas moradias, como ao norte da América do Sul onde estão sendo registrados muitos casos de infecção aguda (Añez *et al.*, 1999). Também é importante manter ações de controle em áreas onde a doença foi erradicada. A identificação de triatomíneos silvestres com potencial para se domiciliar é outra medida importante de controle (Schofield *et al.*, 1999).

O ressurgimento de muitos casos de infecção aguda e a ocorrência de surtos de infecção oral do *T. cruzi* mostram a necessidade de métodos mais sensíveis e rápidos de diagnóstico da doença. A PCR tendo como alvos o DNA do cinetoplasto e o DNA repetitivo nuclear do *T. cruzi* tem sido utilizada para a detecção do parasito em pacientes chagásicos crônicos, infecção congênita e no acompanhamento pós-tratamento específico (Ávilla *et al.*, 1993; Virreira *et al.*, 2003; Galvão *et al.*, 2003). No entanto, a sensibilidade da PCR pode variar de acordo com a cepa do parasito e com o tipo de amostra utilizada. Além disso, a PCR com os iniciadores descritos na literatura fornece poucas informações para um estudo epidemiológico da doença de Chagas. A classificação das cepas do *T. cruzi* seja por isoenzimas ou por marcadores de DNA, necessita de grandes quantidades de amostras do parasito. Para isso, é necessário o isolamento da cepa no hospedeiro, o que nem sempre é possível. Considerando essas dificuldades, buscamos no presente trabalho, identificar marcadores moleculares sensíveis e específicos e que permitam classificar as cepas do *T. cruzi* quanto ao fenótipo de susceptibilidade a drogas, zimodema e/ou grupos I e II do *T. cruzi*.

Neste trabalho, descrevemos um sistema de PCR multiplex capaz de detectar o DNA do *T. cruzi* a partir de 10 fg de DNA do parasito (1/30 do DNA total de um parasito), e simultaneamente classificar a cepa quanto aos grupos principais I e II. Com esse sistema conseguimos detectar e classificar corretamente amostras de DNA purificado de 30 cepas pertencentes a três diferentes zimodemas do parasito (Z1, Z2 e ZB), 14 de 24 amostras de sangue em papel de filtro de camundongos experimentalmente infectados com cepas dos grupos I e II do *T. cruzi*, 7 amostras de pacientes na fase aguda da doença de Chagas e 11 amostras de fezes de triatomíneos coletadas em papel de filtro.

A diversidade genética do *T. cruzi* está em parte associada à grande diversidade de sinais clínicos e de respostas ao tratamento quimioterápico na doença de Chagas, sendo importante também para o diagnóstico da doença. Em nosso estudo, observamos que os iniciadores utilizados para detecção do *T. cruzi*, O 1 e 2 (Requena *et al.*, 1992) e Diaz 7 e 8 (Moser *et al.*, 1989) apresentaram ausência ou diminuição na intensidade do produto amplificado em certas cepas do parasito. A PCR utilizando os iniciadores O 1 e 2 amplificou apenas três das seis cepas analisadas. As cepas não amplificadas pertencem ao grupo *T. cruzi* II. Este resultado está de acordo com outros autores, que descreveram a falha dos iniciadores O 1 e 2 na amplificação de algumas cepas da linhagem 2 do parasito (Virreira *et al.*, 2003). Embora esta diversidade de produto amplificado seja importante para a diversidade do parasito e para estudos de classificação das cepas, esses iniciadores não são adequados para o diagnóstico da doença de Chagas.

Por outro lado, Virreira *et al.* (2003) mostraram que a PCR utilizando os iniciadores Diaz 1 e 2 amplificou com a mesma intensidade o fragmento de 195 pb de 7 cepas de *T. cruzi*. Esse fragmento corresponde à unidade repetitiva do DNA satélite do *T. cruzi*. Nossos resultados com os iniciadores Diaz 7 e 8 mostraram amplificação do DNA satélite do *T. cruzi* em todas as 30 cepas analisadas. No entanto, as cepas do *T. cruzi* I apresentam um fragmento de 195 pb com menor intensidade comparado com cepas do *T. cruzi* II. A diferença entre os iniciadores Diaz 1 e 2 e Diaz 7 e 8 é de apenas um nucleotídeo a mais na extremidade 3' do iniciador Diaz 7. Análises das seqüências nucleotídicas depositadas em bancos de dados não mostram polimorfismo nessa base. No entanto observamos três bases polimórficas ao longo da seqüência complementar ao iniciador Diaz 7, sendo típicos de seqüências do *T. cruzi* I. Esses polimorfismos podem diminuir a especificidade de anelamento do iniciador Diaz 7 na seqüência de cepas do grupo I do *T. cruzi*.

Diversos marcadores moleculares têm sido descritos para classificar as cepas do *T. cruzi*. Estudos realizados por Miles *et al.* (1978 e 1980), Romanha *et al.* (1979) e Romanha (1982), basearam-se nos perfis isoenzimáticos para classificar o parasito em diferentes zimodemas. Posteriormente, marcadores genéticos foram utilizados para classificar o *T. cruzi* a partir de seqüências aleatórias (RAPD) (Steindel *et al.*, 1993) ou específicas no DNA do cinetoplasto (Morel *et al.*, 1980) e no DNA nuclear (Souto *et al.*, 1996). Esses marcadores refletem a grande heterogeneidade de cepas do *T. cruzi*, no entanto a necessidade de correlacionar a variabilidade genética com perfis fenotípicos do parasito estimulou a busca por novos marcadores moleculares.

Murta *et al.* (1998) caracterizou várias cepas do *T. cruzi* segundo diferentes marcadores moleculares. Os autores mostraram que o perfil isoenzimático heterozigoto (zimodema B), está associado ao fenótipo de susceptibilidade de cepas do *T. cruzi* ao BZ. Essa correlação entre o marcador isoenzimático e o fenótipo de susceptibilidade a drogas é importante para a quimioterapia da doença de Chagas, pois com a identificação de um marcador para o zimodema B, estaríamos simultaneamente identificando cepas sensíveis a drogas e assim contribuindo para a elaboração de esquemas terapêuticos mais eficientes. Essa possibilidade nos estimulou a buscar marcadores mais sensíveis para o mesmo fenótipo ou para o zimodema. Nossos resultados mostraram, porém que os polimorfismos encontrados no DNA satélite do *T. cruzi* não estão associados ao fenótipo de susceptibilidade ou resistência a drogas, mas estão associados aos grupos I e II do *T. cruzi*.

A classificação do *T. cruzi* em grupos I e II foi criada em 1999 por um grupo de especialistas (Anonymous, 1999) como uma forma de padronizar a nomenclatura do parasito. Os principais marcadores moleculares descritos foram agrupados em cepas de *T. cruzi* I e II. Essa classificação é fortalecida por estudos filogenéticos utilizando diferentes marcadores como polimorfismos dos genes do rDNA e mini-exon, perfis de RAPD e RFLP do DNA genômico do parasito, hibridizado com sondas específicas para o DNA satélite (195 pb) do *T. cruzi* (Souto *et al.*, 1996; Tibayrenc *et al.*, 1993; Bastrenta *et al.*, 1999). Esses estudos indicam a existência de duas linhagens principais do parasito. A importância epidemiológica dessa classificação está na ampla distribuição de cepas do *T. cruzi* I dentro do ciclo silvestre do parasito e de cepas do *T. cruzi* II no ciclo doméstico. Além disso, *T. cruzi* I também é a única forma encontrada em infecções humanas ao norte da floresta amazônica e *T. cruzi* II está associado a lesões do trato digestivo (Prata, 2001). Neste ponto, a PCR multiplex que desenvolvemos pode contribuir de forma rápida e prática, para os estudos epidemiológicos da doença de Chagas.

O DNA repetitivo do *T. cruzi* apresenta duas importantes características para o nosso estudo: alto número de cópias no genoma do parasito, e alta frequência de polimorfismos. Essas características aumentam a sensibilidade de detecção da seqüência e são alvos importantes para a classificação de cepas. As seqüências altamente repetitivas conhecidas como elemento E13 e DNA satélite (195 pb) do *T. cruzi* já foram estudadas por diversos autores, que recomendam o seu uso para diagnóstico e classificação de cepas do parasito (ver item 1.9, Introdução).

Apenas uma seqüência nucleotídica do elemento repetitivo E13 do *T. cruzi* está descrita na literatura (Requena *et al.*, 1992). Assim, a variabilidade dessa seqüência não era conhecida. Por outro lado, o DNA satélite do *T. cruzi* possui várias seqüências depositadas em bancos de dados, permitindo a análise das mesmas. Não estava clara no início do nosso trabalho, a existência de polimorfismos associados aos grupos I e II do *T. cruzi*; no entanto posteriormente novas seqüências foram depositadas e foi possível identificar tais polimorfismos. A existência de regiões conservadas ao longo do DNA satélite do *T. cruzi* favorece o uso de iniciadores específicos complementares a sítios polimórficos da seqüência, para amplificar fragmentos do DNA satélite contendo esses polimorfismos.

Comparamos a variabilidade intra-específica da região do kDNA do *T. cruzi* flanqueada pelos iniciadores S 35 e S 36. O kDNA do *T. cruzi* é um importante alvo para diagnóstico molecular da doença de Chagas (Galvão *et al.*, 2003) e para a classificação de esquizodemas (Sturm *et al.*, 1989). Os iniciadores S 35 e S 36 por sua vez amplificam tipicamente um fragmento de 330 pb em *T. cruzi* e um fragmento de 760 pb em *T. rangeli*, possibilitando a identificação de espécie e de infecções mistas (Vargas *et al.*, 2000). Apesar dessa ser uma região promissora para o nosso estudo, analisamos a variabilidade dessas seqüências depositadas em bancos de dados, e verificamos que ela é incompatível com a nossa proposta. Em uma análise preliminar, o produto de PCR amplificado com esses iniciadores foi clonado e seqüenciado. No entanto, não conseguimos seqüências nucleotídicas de boa qualidade, mesmo após várias tentativas. A alta freqüência de polimorfismos no fragmento amplificado provavelmente causou o erro de definição de bases pelo MegaBace. Esse resultado mostra que o fragmento de kDNA amplificado por PCR não é adequado para análises de polimorfismos, devido a sua alta variabilidade. Desse modo, optamos por não analisar as seqüências do kDNA neste trabalho. A alta variabilidade encontrada na região variável do minicírculo não exclui a possibilidade de que a região conservada do kDNA possa ser utilizada para o diagnóstico e classificação das cepas.

A análise do elemento E13 mostrou que a variabilidade entre cepas também é alta neste elemento repetitivo. Nenhum dos pares de iniciadores testados foi capaz de amplificar satisfatoriamente o fragmento esperado em todas as cepas testadas. O elemento E13 se encontra disperso pelo genoma do *T. cruzi*, podendo ou não estar organizado em tandem (Requena *et al.*, 1992). Ele foi identificado a partir de suas propriedades cinéticas de reassociação. Ele apresenta polimorfismos inter e intracepas. Além disso, o elemento E13 possui homologia de 120 nucleotídeos da extremidade 5'

com a região 3' terminal de outro elemento repetitivo, o elemento SIRE (Requena *et al.*, 1992 e 1996). Essa variabilidade pode ser de grande importância para a regulação gênica do parasito, uma vez que a família de elementos repetitivos dispersos pelo genoma do *T. cruzi* se encontra freqüentemente associada a eventos de transposição genética. Além disso, muitos elementos repetitivos carregam seqüências promotoras e reguladoras, participando assim da ativação ou desativação de genes (Aksoy, 1991; Novak *et al.*, 1993; Requena *et al.*, 1994; Vazquez *et al.*, 1994). Apesar dessa possibilidade de uso para a classificação de cepas do *T. cruzi*, a variabilidade observada no elemento E13 impede o uso de iniciadores específicos com propósitos de diagnóstico.

A similaridade entre o elemento E13 e SIRE explica a existência de ligações inespecíficas observadas em nossas reações de PCR. SIRE é um elemento repetitivo amplamente distribuído no genoma do *T. cruzi* e está relacionado a regiões intergênicas, como os genes TcP2 β e H2 α (Vazquez *et al.*, 1994; Requena, 1996) e a outros elementos repetitivos, como E13, C6 e TcRel (Requena, 1996; Vazquez *et al.*, 1999). Desse modo, iniciadores complementares a sítios na região homóloga desses elementos repetitivos irão se anelar em diferentes regiões do genoma do parasito e amplificar diferentes fragmentos inespecíficos.

Estudos anteriores com o DNA satélite mostraram que existem polimorfismos entre repetições de uma mesma cepa e entre cepas diferentes (Gonzalez *et al.*, 1984). Polimorfismos entre repetições de uma mesma cepa podem diminuir a sensibilidade de detecção das seqüências. Os polimorfismos entre cepas por outro lado, permitem o agrupamento dessas cepas (por linhagem, zimodema, fenótipo de resistência a drogas etc.). Desse modo, diversos estudos têm demonstrado que esse elemento repetitivo é um bom alvo para diagnóstico molecular da doença de Chagas e que pode ser utilizado para estudos taxonômicos (Gonzalez *et al.*, 1984; Vidigal, 1996; Olivares-Villagómez *et al.*, 1998; Bastrenta *et al.*, 1999; Lane *et al.*, 2003; Virreira *et al.*, 2003). Uma metodologia utilizada para o isolamento e análise de seqüências nucleotídicas do DNA satélite foi descrita por Elias *et al.* (2005). Os autores utilizaram a digestão enzimática com a enzima Sac I para cortar o DNA satélite em fragmentos de 195 pb. Esses fragmentos são submetidos à eletroforese em gel de agarose, purificados, clonados e seqüenciados. Em nosso trabalho, clonamos e sequenciamos o fragmento do DNA satélite de 12 cepas do *T. cruzi*, amplificados por PCR. Nossa metodologia tem a desvantagem de selecionar negativamente as seqüências que apresentem polimorfismos nos sítios de anelamento dos iniciadores. Mesmo que ocorra um

pareamento imperfeito com os sítios polimórficos, os iniciadores “mascaram” a presença desses polimorfismos. Nossos resultados, assim como as análises de seqüências depositadas em bancos de dados, mostram que existem polimorfismos no sítio de anelamento do iniciador Diaz 7. Embora esses polimorfismos possam estar presentes em todas as cepas do *T. cruzi*, eles são mais freqüentes em cepas pertencentes aos zimodemas Z1 e ZB. Como o iniciador Diaz 7 não é perfeitamente complementar a esses polimorfismos, a reação de PCR terá como molde seqüências não polimórficas ou com pareamento imperfeito. No entanto, nosso objetivo era detectar o parasito por PCR e tentar buscar um marcador para susceptibilidade a drogas ou perfil isoenzimático do *T. cruzi*, utilizando essa seqüência. Diante disso, investigamos a presença de polimorfismos no produto amplificado por PCR.

Um dos objetivos da dissertação foi identificar polimorfismos associados ao fenótipo de susceptibilidade ou resistência do *T. cruzi* a drogas. Com este marcador, poderíamos detectar o DNA do parasito e classificar as cepas quanto à sensibilidade a drogas. A análise de 160 seqüências nucleotídicas de 12 cepas do parasito mostrou que não existem polimorfismos associados a esse fenótipo no DNA satélite do *T. cruzi*. Considerando a natureza do DNA repetitivo do *T. cruzi*, a probabilidade de identificarmos tais polimorfismos seria maior em seqüências classificadas como do tipo SINE (Short Interspersed Nuclear Element), cujo papel na regulação gênica foi descrito para alguns genes (Requena, 1996).

Neste trabalho, identificamos polimorfismos no DNA satélite do *T. cruzi* amplificado por PCR, associados aos grupos I e II do parasito. Outros autores também mostraram uma associação entre seqüências do DNA satélite de cepas do *T. cruzi* com os grupos I e II. Bastrenta e cols. (1999) utilizando a metodologia de RFLP detectaram dois perfis de restrição da seqüência de DNA satélite associados às duas linhagens principais do parasito. Recentemente, Elias e cols. (2005) através da análise das seqüências nucleotídicas do DNA satélite do *T. cruzi*, observaram que as cepas foram separadas em dois ramos filogeneticamente distintos. Entretanto, não está descrito na literatura uma metodologia para diagnóstico e classificação das cepas nos grupos do *T. cruzi*, simultaneamente. Por esse motivo, identificamos nas seqüências do grupo I do *T. cruzi*, polimorfismos associados à discriminação dos dois grupos e desenhamos iniciadores complementares a esses sítios polimórficos. Como a maioria das cepas do *T. cruzi* I apresentou seqüências nos dois grupos, não desenhamos iniciadores específicos para *T. cruzi* II. Estudamos ainda a possibilidade de utilizar enzimas de restrição para cortar especificamente os sítios polimórficos do *T. cruzi* I. No entanto,

esta seria uma opção mais cara e envolveria um número maior de etapas, comparado a uma reação de PCR.

Estudos filogenéticos empregando o DNA satélite do *T. cruzi* têm demonstrado a existência de dois grupos de seqüências distintos, associados com cepas dos grupos de *T. cruzi* I e II (Elias *et al.*, 2005). Estes estudos também mostram que seqüências da cepa CL-Brener estão presentes nos dois grupos. Utilizando 115 cepas classificadas por meio de rDNA como grupo 1/2, lenne *et al.* (Anais do XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2005) mostraram que estas cepas tinham seqüências nos dois grupos de *T. cruzi*. Entretanto, em nossa análise das 160 seqüências do DNA satélite, observamos que as seqüências da cepa CL-Brener estão presentes apenas no ramo *T. cruzi* II. Além disso, observamos que três das quatro cepas *T. cruzi* I analisadas foram classificadas por rDNA como grupo 2. Entretanto elas apresentaram seqüências em ambos os ramos. Para verificarmos se a presença de algumas seqüências de cepas do *T. cruzi* I no ramo II ocorreu devido ao mascaramento de polimorfismos nos sítios de anelamento dos iniciadores, modificamos as seqüências nucleotídicas das cepas do *T. cruzi* I agrupadas no ramo *T. cruzi* II, inserindo nelas os mesmos polimorfismos observados no sítio de anelamento dos iniciadores Diaz 7 e 8 das seqüências depositadas em bancos de dados. Não observamos alterações na disposição das seqüências nos dois ramos principais. Concluímos então que a presença dessas seqüências nos dois grupos do *T. cruzi* não é devido ao sequenciamento do produto de PCR, mas polimorfismos de fato (dados não mostrados).

Das 4 cepas de *T. cruzi* I estudadas, apenas as seqüências da cepa Colombiana foram agrupadas exclusivamente no ramo do *T. cruzi* I. Essa cepa foi isolada de um paciente na fase crônica da doença de Chagas, enquanto as demais cepas *T. cruzi* I foram isoladas de *Triatoma infestans*. Estudos moleculares têm confirmado que algumas cepas de *T. cruzi* são multiclonais, mas a freqüência da multiclonalidade ainda não é conhecida (Oliveira *et al.*, 1998). É possível que algumas destas cepas sejam multiclonais, e que o hospedeiro vertebrado ao ser infectado pode agir como um “filtro biológico”, selecionando populações de parasitos. Assim, a heterogeneidade do DNA satélite de cepas isoladas de hospedeiros invertebrados pode não ser encontrada no hospedeiro vertebrado. Seqüências do DNA satélite da cepa Silvio x10 (Z1) estão depositadas nos bancos de dados e estão presentes apenas no grupo I de *T. cruzi* (Elias *et al.*, 2005). Essa cepa, assim como a cepa Colombiana, foi isolada de um paciente na fase crônica, reforçando a hipótese. Entretanto, essa hipótese teria que ser

mais bem investigada utilizando um maior número de amostras Z1 provenientes de vários hospedeiros.

Alguns dos polimorfismos encontrados apenas em cepas do zimodema 1 ocorreram com uma frequência muito baixa dentro das cepas, o que pode comprometer a sensibilidade da PCR. Assim, desenhamos iniciadores apenas para os polimorfismos mais frequentes nas seqüências estudadas. Esses iniciadores possuem uma ou duas bases polimórficas, preferencialmente localizadas na extremidade 3' do iniciador. Nosso objetivo era combinar a PCR com os iniciadores Diaz 7 e 8, que amplificou o DNA satélite de todas as cepas do *T. cruzi* testadas, com outra PCR, utilizando os iniciadores desenhados, para amplificar apenas um fragmento do DNA satélite de cepas do *T. cruzi* I. Em nosso estudo, testamos várias combinações desses iniciadores. Entretanto, os resultados mostraram ausência de amplificação de algumas cepas, presença de vários fragmentos inespecíficos e perfil indefinido. Esses resultados ocorreram provavelmente devido a diferenças na temperatura de anelamento dos iniciadores, associado à frequência variável dos polimorfismos no DNA satélite das cepas do *T. cruzi*. Nossos estudos mostram claramente que a heterogeneidade detectada por PCR com esses iniciadores TcSat do DNA satélite do *T. cruzi* é maior que a observada pela análise das seqüências de DNA. Os estudos filogenéticos mostram a existência de dois grupos de seqüências do DNA satélite distintos. No entanto, dados da literatura e obtidos com esse trabalho sugerem que os dois tipos de seqüências do DNA satélite possam estar presentes em cepas de ambos os grupos do parasito, porém com diferenças quanto à frequência de cada tipo de seqüência nos grupos I e II do *T. cruzi*.

Com o sistema PCR multiplex esperávamos a amplificação do fragmento de 111 pb (flanqueado pelos iniciadores TcSat 4 e Diaz 8) apenas em cepas do *T. cruzi* I e do fragmento de 195 pb (flanqueado pelos iniciadores Diaz 7 e 8) em cepas dos dois grupos. O perfil observado, no entanto mostra que os polimorfismos no sítio de anelamento do iniciador TcSat 4 está presente em todas as cepas do *T. cruzi*, e não apenas em *T. cruzi* I. Acreditamos que este perfil encontrado nas diferentes cepas do *T. cruzi* está relacionado à frequência de sítios complementares aos iniciadores e à variação quantitativa do DNA satélite em *T. cruzi* I e II. Elias *et al.* (2003) mostrou que o conteúdo de DNA satélite da cepa Silvio x10 (*T. cruzi* I) é quatro a seis vezes menor que o das cepas Y e CL-Brener (*T. cruzi* II). Desse modo, em cepas do *T. cruzi* II, a abundância do DNA satélite é suficiente para que ambos os iniciadores senso (TcSat 4 e Diaz 7) se liguem a seus respectivos sítios e amplifiquem os fragmentos de 195 e de

111 pb. Em cepas *T. cruzi* I, o número de repetições é menor e a competição por sítios complementares favorece o iniciador TcSat 4, amplificando o fragmento de 111 pb. Um importante fator para a seleção preferencial do iniciador TcSat 4 é a temperatura de anelamento maior que a de Diaz 7, permitindo que ele se anele a seu respectivo sítio complementar antes e com maior facilidade que o iniciador Diaz 7.

Embora o perfil eletroforético esperado para a PCR utilizando os iniciadores TcSat tenha sido diferente do observado, foi possível discriminar cepas do *T. cruzi* I e II utilizando o conjunto de iniciadores TcSat 4 e Diaz 7 e 8. Observamos um fragmento de 111 pb em todas as cepas do *T. cruzi*, e um fragmento de 195 pb apenas em cepas do *T. cruzi* II. Esse sistema de PCR multiplex foi utilizado para amplificar 30 cepas de *T. cruzi* isoladas de 6 espécies de hospedeiros em 9 localidades de 4 países diferentes. Do total de cepas analisadas, 11 foram classificadas como *T. cruzi* I (Z1) e 19 como *T. cruzi* II (10 Z2 e 9 ZB). Diferenças na quantidade de produto amplificado foram observadas entre as cepas e refletem a heterogeneidade do número de repetições do DNA satélite. Uma característica importante dessa PCR é a amplificação do fragmento de 111 pb em todas as cepas estudadas, o que pode ser utilizado para indicar a presença do DNA de *T. cruzi* na amostra.

A PCR multiplex que descrevemos nesta dissertação é bastante sensível quando comparada a outras técnicas de diagnóstico molecular. Utilizando amostras de DNA genômico do *T. cruzi*, foi possível amplificar o DNA satélite do parasito a partir de 10 fg de DNA, que corresponde a aproximadamente 1/30 do DNA de um parasito. Essa sensibilidade é igual a de outros iniciadores utilizados para diagnóstico da doença de Chagas, como O 1 e 2 (Vidigal, 1996) e S 35 e 36 (Kirchhoff *et al.*, 1996), que amplificam fragmentos do elemento E13 e do kDNA, respectivamente. Os iniciadores Diaz 7 e 8 apresentam uma sensibilidade da PCR ainda maior, aproximadamente 0,1 e 1 fg dependendo da cepa do *T. cruzi*. Entretanto, utilizando o sistema multiplex temos a grande vantagem de detectar e caracterizar a cepa nos dois diferentes grupos I e II do *T. cruzi*. A tipagem feita por meio do rDNA e genes do mini-exon necessita de maiores concentrações de DNA, em torno de 100 pg. Esse valor é aproximadamente 10.000 vezes maior comparado com o sistema multiplex (10 fg) que desenvolvemos neste trabalho. Essa sensibilidade, no entanto pode variar significativamente se considerarmos que a quantidade do DNA satélite varia muito nas diferentes cepas do parasito. Um outro ponto importante é que o cultivo dos parasitos em meio LIT para obtenção de maior quantidade de material, pode selecionar uma determinada população do parasito, não refletindo mais a heterogeneidade populacional original

(Veloso *et al.*, 2005). A especificidade dessa PCR multiplex foi confirmada pela ausência de amplificação ao utilizarmos amostras de DNA de parasitos filogeneticamente próximos (*T. rangeli* e *Leishmania spp.*). Esse resultado está de acordo com estudos anteriores que descrevem o DNA satélite do *T. cruzi* como uma seqüência específica do genoma desse parasito (Moser *et al.*, 1989; Vidigal, 1996; Virreira *et al.*, 2003).

Utilizando amostras de DNA extraído de sangue de camundongo infectado com *T. cruzi* coletado em papel de filtro, conseguimos detectar o DNA do parasito a partir de 100 parasitos/ 5µl de sangue para a cepa Colombiana e 1000 parasitos/ 5µl para a cepa Y. Não podemos afirmar que este seja o limite de sensibilidade da PCR multiplex utilizando amostras de DNA extraídas de papel de filtro, uma vez que as amostras testadas com menor numero de parasitos também foram negativas em reações de PCR utilizando os iniciadores Diaz 7 e 8. A grande vantagem de se utilizar amostras de sangue em papel de filtro está na facilidade de coleta e manuseio da amostra no campo e na simplicidade do método de extração, que economiza tempo e custo.

Uma diminuição na sensibilidade de detecção é esperada devido a perdas durante a extração do DNA e à inibição parcial ou total da PCR provocada por proteínas e outros componentes celulares da amostra. É importante observar que o DNA de camundongo não é amplificado e nem interfere na sensibilidade de detecção do DNA do *T. cruzi*, o que foi demonstrado por meio dos testes de especificidade e inibição da PCR multiplex com DNA purificado de camundongo. O pequeno volume de sangue utilizado e a dificuldade em se homogeneizar esse tipo de amostra também interferem no resultado. Moser *et al.* (1989) utilizando DNA extraído de 100 µl de sangue infectado detectou o DNA satélite do *T. cruzi* a partir de 8 parasitos presentes na amostra. Em nosso estudo não testamos a sensibilidade de detecção em um volume maior de sangue (adicionando quantidades conhecidas do parasita). Esses experimentos deverão ser realizados para complementar os dados de sensibilidade.

A PCR multiplex foi positiva para 7 amostras de DNA de creme leucocitário provenientes de pacientes na fase aguda da doença de Chagas devido ao recente surto dessa doença no estado de Santa Catarina em 2005. A caracterização dessas amostras por isoenzimas e por PCR com iniciadores do rDNA e mini-exon, mostrou que elas pertencem ao grupo do *T. cruzi* II (Pacheco *et al.*, Anais do XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2005). Nossos resultados com a PCR multiplex também mostraram que todas as amostras são classificadas como *T. cruzi* II. Desse modo, a PCR multiplex utilizando os iniciadores TcSat 4 e Diaz 7 e 8 não somente

contribuiu como um novo marcador molecular, mas também permitiu a classificação das cepas do parasito nos grupos I e II sem a necessidade de isolamento da cepa correspondente. Assim como para o DNA de camundongo, os testes de especificidade e inibição da PCR multiplex com DNA humano mostraram que este não é amplificado e nem interfere na sensibilidade de detecção do DNA do *T. cruzi*, indicando que a PCR multiplex pode ser utilizada em amostras clínicas e de campo sem a interferência do excesso de DNA do hospedeiro.

Testamos também amostras de DNA extraídas de fezes de *T. infestans* coletadas em papel de filtro. Machado *et al.* (2000) descreveu o uso desse tipo de amostra como um método rápido e prático para detecção do *T. cruzi* e *T. rangeli* no inseto vetor. Comparamos neste caso amostras de fezes positivas e negativas para o *T. cruzi*, e utilizamos o exame microscópico a fresco como padrão ouro. Observamos nesse estudo preliminar, utilizando 15 amostras, uma sensibilidade e especificidade de 100%. O perfil eletroforético mostrou claramente que todas as amostras positivas foram classificadas como cepas do *T. cruzi* I.

Um problema observado na pesquisa de campo é a identificação de infecções mistas com diferentes genótipos do parasito. A presença de múltiplos genótipos já foi observada em insetos e mamíferos, inclusive humanos (Bosseno *et al.*, 1996; Solari *et al.*, 2001). A ocorrência destas infecções mistas varia em diferentes áreas geográficas e sua prevalência na natureza ainda não está esclarecida. A PCR multiplex que descrevemos não é capaz de discriminar infecções mistas de cepas do *T. cruzi* I e II. Neste caso, o perfil eletroforético da PCR seria semelhante a cepas do *T. cruzi* II. Esta limitação também ocorre com outras reações de PCR para diagnóstico e classificação das cepas (Vargas *et al.*, 2000; Chiurillo *et al.*, 2003; Yeo *et al.*, 2006). Entretanto, como nosso objetivo é detectar e classificar *T. cruzi* nos grupos I e II, a grande maioria das infecções mistas já observadas (entre *T. cruzi* e *T. rangeli* e entre os subgrupos de *T. cruzi* II_{a-e}) não interfere em nossas análises. Além disso, as amostras com perfil eletroforético de *T. cruzi* I em nossa PCR multiplex, sabidamente não apresentam infecções mistas entre *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, sendo possível desta forma estimar a prevalência de *T. cruzi* II e a prevalência mínima de *T. cruzi* I em uma população mesmo na ocorrência de infecções mistas dos dois grupos. Esta análise é particularmente importante em estudos com um grande número de amostras ou onde não foi possível o isolamento do parasito.

Neste trabalho, não encontramos no DNA satélite do *T. cruzi* marcadores moleculares capazes de identificar amostras com perfil isoenzimático heterozigoto (ZB).

Estas amostras pertencem ao grupo *T. cruzi* II, como foi anteriormente descrito (Murta *et al.*, 1998; El-Sayed *et al.*, 2005). O perfil ZB é particularmente interessante porque está associado com o fenótipo de susceptibilidade do *T. cruzi* ao BZ. Seria interessante no futuro buscarmos um marcador molecular por PCR para diferenciar o zimodema destas amostras.

A PCR multiplex que descrevemos é uma metodologia sensível, específica e prática, que pode ser utilizada em diferentes tipos de amostras biológicas para a detecção e classificação do *T. cruzi*. Resumidamente, ela permitiu a distinção dos grupos I e II do *T. cruzi* em amostras de DNA genômico de 30 cepas do parasito, 14 amostras de DNA extraído de sangue de camundongos em papel de filtro, 7 amostras de DNA de creme leucocitário humano e 11 amostras de DNA extraído de fezes de *T. infestans*. Essa metodologia classificou corretamente todas as amostras do parasito e foi específica para *T. cruzi*, não amplificando o DNA dos hospedeiros nem de outros tripanosomatídeos. A sensibilidade de detecção variou em função da cepa, do tipo de amostra utilizada e da metodologia de extração de DNA da amostra. No entanto não sofreu interferência do excesso de DNA do hospedeiro e essa variação não desqualificou seu uso em nenhum dos nossos estudos. Por estes motivos, acreditamos que esta PCR multiplex é uma ferramenta útil para o diagnóstico e para estudos epidemiológicos da doença de Chagas.

CONCLUSÕES

7.0 CONCLUSÕES

- ✓ O fragmento do kDNA do *T. cruzi* amplificado pelos iniciadores S 35 e S 36 (330 pb) é altamente variável e não serve para a classificação das cepas do parasito.
- ✓ O elemento E13 de *T. cruzi* apresenta polimorfismos que podem ser utilizados para a classificação de cepas do parasito, entretanto não encontramos iniciadores ideais para diagnóstico por PCR.
- ✓ Não foram identificados marcadores para o fenótipo de susceptibilidade a drogas ou zimodema, no entanto o DNA satélite de *T. cruzi* possui marcadores para a classificação de cepas segundo os grupos I e II do parasito.
- ✓ Seqüências nucleotídicas do DNA satélite do *T. cruzi* amplificado pelos iniciadores Diaz 7 e 8 possuem polimorfismos encontrados apenas em cepas do grupo I do parasito.
- ✓ Estudos filogenéticos utilizando as seqüências nucleotídicas do DNA satélite do *T. cruzi* mostram a existência de dois ramos filogeneticamente distintos associados com os grupos I e II do parasito.
- ✓ Perfis de amplificação do DNA satélite do *T. cruzi* sugerem que os polimorfismos encontrados em seqüências nucleotídicas de cepas do grupo I do *T. cruzi* também estão presentes em cepas do grupo II, porém com frequências diferentes.
- ✓ A PCR multiplex utilizando os iniciadores TcSat 4 e Diaz 7 e 8 é um método sensível e específico para o diagnóstico e classificação de cepas do *T. cruzi* e pode ser utilizada em amostras clínicas e de campo.

Conclusão final:

- ✓ A PCR multiplex que desenvolvemos é capaz de detectar e classificar as cepas do *T. cruzi* a partir de quantidades mínimas de DNA. Nosso estudo mostra que seqüências de DNA repetitivo são ideais para diagnóstico molecular da doença de Chagas e podem ser utilizadas para a classificação das cepas do *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajioka J & Swindle J 1993. The calmodulin-Ubiquitin associated genes of *Trypanosoma cruzi*: their identification and transcription. *Mol Biochem Parasitol.* 57: 127-136.
- Aksoy S 1991. Site-specific retrotransposons of the *Trypanosomatic* protozoa. *Parasitology today.* 7: 281-285.
- Andrade SG & Magalhães JB 1997. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi*: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop.* 30: 27-35.
- Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Gonzalez N, Ramirez JL, Guevara P, Rivero C, Borges R, Scorza JV 1999. Acute Chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 60(2): 215-222.
- Anonymous 1999. Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 (Suppl 1): 429-432.
- Araya JE, Cano MI, Yoshida N, da Silveira JF 1994. Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 65(1): 161-169.
- Araya J, Cano MI, Gomes HBM, Novak EM, Requena JM, Alonso C, Levin MJ, Guevara P, Ramirez JL, Franco Da Silveira J 1997. Characterization of a interspersed repetitive DNA element in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 115: 563-570.
- Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, Simpson L 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 31(9): 2421-2426.
- Avila AR, Yamada-Ogatta SF, da Silva Monteiro V, Krieger MA, Nakamura CV, de Souza W, Goldenberg S 2001. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 117(2): 169-177.
- Ayala FJ 1993. *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. *Biol Res.* 26(1-2): 47-63.
- Bastrenta B, Bosseno MF, Barnabe C, Tibayrenc M, Breniere SF 1999. Restriction fragment length polymorphism of 195 bp repeated satellite DNA of *Trypanosoma cruzi* supports the existence of two phylogenetic groups. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94(3): 323-328.
- Bogliolo AR, Lauria-Pires L, Gibson WC 1996. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop.* 61: 31-40.

- Bongertz V & Dvorak JA 1983. *Trypanosoma cruzi*: antigenic analysis of cloned stocks. *Am J Trop Med Hyg.* 32 (4): 716-722.
- Bosseno MF, Telleria J, Vargas F, Yaksic N, Noireau F, Morin A, Breniere SF 1996. *Trypanosoma cruzi*: study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Exp Parasitol.* 83 (3): 275-282.
- Braga EM, Galvão LM, Chiari E, Martins MS 1993. Difference in susceptibility to lysis between clones of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88 (4): 529-534.
- Brener Z 1965. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol.* 59: 19-26.
- Brener R, Costa AG, Chiari E 1976. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop.* São Paulo, 18: 450-455.
- Brener Z 1987. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 82: 205-212.
- Brener Z, Camargo ME, Rassi A 1992. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo, *ISTB Brazil-SBHH*, 13-29.
- Cabral HR, Glocker TM, Novals IT, Krainbuhl VA 1999. The esophagus in patients with Chagas disease in Cordoba, Argentina. Histologic-immunohistochemical, and evacuation time. *Rev Fac Cienc Med Univ Nac Cordoba.* 56: 27-33.
- Cano MI, Gruber A, Vasquez M, Cortes A, Levin MJ, Gonzales A, Degrave WM, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez JL, Alonso C, Requema JM, Franco da Silveira J 1995. *Trypanosoma cruzi* genome project: Molecular karyotype of clone CI Brener. *Mol Biochem Parasitol.* 71: 273-278.
- Castro C, Craig SP, Castaneda M 1981. Genomic organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 4: 273-282.
- Chiurillo MA, Crisante G, Rojas A, Peralta A, Dias M, Guevara P, Anez N, Ramirez JL 2003. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10 (5): 775-779.
- Conselho Regional de Farmácia do Tocantins, 2004. Web.
- Diaz C, Nussenzweig V, Gonzalez A 1992. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg.* 46(5): 616-623.
- Docampo R & Stoppani AO 1979. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys.* 197 (1): 317-321.

- Docampo R, Moreno SN, Stoppani AO, Leon W, Cruz FS, Villalta F, Muniz RF 1981. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Pharmacol.* 30 (14): 1947-1951.
- Doyle PS, Dvorak JA, Engel JC 1984. *Trypanosoma cruzi*: quantification and analysis of the infectivity of clones derived from various sources. *J Protozool.* 31: 280-283.
- Dujardin JC, Dujardin JP, Tibayrenc M, Timperman G, De Doncker S, Jacquet D, *et al.* 1995. Karyotype plasticity in Neotropical *Leishmania*: an index for measuring genomic distance among *L. (V.) peruviana* and *L. (V.) braziliensis* populations. *Parasitology.* 110, 21-30.
- Dvorak JA, Hall TE, Crane MS, Engel JC, McDaniel JP, Uriegas R 1982. *Trypanosoma cruzi* flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mitramycin-induced fluorescence. *J Protozool.* 24: 430-437.
- Elias MC, Vargas NS, Zingales B, Schenkman S 2003. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 129(1): 1-9.
- Elias MC, Vargas N, Tomazi L, Pedroso A, Zingales B, Schenkman S, Briones MR 2005. 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.* 140(2): 221-227.
- 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 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.* 309(5733): 409-415.
- Ewing B & Green P 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8: 186-194.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8: 175-185.
- Filardi, L.S. & Brener, Z 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chaga's disease. *Trans R Trop Med Hyg.* 81: 755-759.

- Franco FR, Paranhos-Bacalla GS, Yamauchi LM, Yoshida N, da Silveira JF 1993. Characterization of a cDNA clone encoding the carboxy-terminal domain of a 90-kilodalton surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect Immun.* 61(10): 4196- 4201.
- Galvao LM, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Andrade AL 2003. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *J Clin Microbiol.* 41(11): 5066-5070.
- Gibson AC & Miles MA 1986. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* 5: 1299-1305.
- Goldenberg S, Salles JM, Contreras VT, Lima Franco MP, Katzin AM, Colli W, Morel CM 1985. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* 180(2):265-70.
- Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira N, Lizardi P 1984. Minichromosomal Repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3356-3360.
- Gotoh O 1982. An improved algorithm for matching biological sequences. *J Mol Biol.* 162: 705-708.
- Haberkorn A, Gonnert R 1972. Animal experimental investigation into the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. *Arzneimittelforschung.* 22 (9): 1570-1582.
- Henderson GB, Ulrich P, Fairlamb AH, Rosenberg I, Pereira M, Sela M, Cerami A 1988. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85 (15): 5374-5378.
- Henriksson J, Aslund L, Marcina RA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ, Frasch AC, Pettersson U 1990. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 42: 213-224.
- Henriksson J, Porcel B, Rydaker M, Ruiz A, Sabaj V, Galanti N, Cazzulo JJ, Frasch AC, Pettersson U 1995. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 73: 63-74.
- Henriksson J, Aslund L, Pettersson U 1996. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology today.* 12: 108-114.
- Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR 1996. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol.* 34(5): 1171-1175.
- Kirchhoff LV, Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB 2004. Parasitic Diseases of the Heart. *Frontiers in Bioscience.* 9: 706-723.

- Kooy RF, Ashall F, Van Der Ploeg M, Overdulve JP 1989. On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 36: 73-76.
- Kumar S, Tamura K, Nei M 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5: 150-163.
- Lanar DE, Levy SC, Manning JE 1981. Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 3: 327-341.
- Lane JE, Ribeiro-Rodrigues R, Olivares-Villagómez D, Vnencak-Jones CL, Mccurley TL, Carter CE 2003. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA within murine cardiac tissue sections by in situ Polymerase Chain Reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (3): 373-376.
- Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SD. 1992. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol*. 55: 147-153.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99(1): 1-12.
- Machado EM, Alvarenga NJ, Romanha AJ, Grisard EC 2000. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 95(6): 863-866.
- Mallimaci MC, Sijvarger C, Dates A, et al 2001. Seroprevalence of Chagas' disease in Ushuaia, Argentina, an area without Triatominae. *Rev Panam Salud Publ*. 9: 169-171.
- Martin F, Marañón C, Olivares M, Alonso C, Lopez MC 1995. Characterization of a non-long terminal repeat retrotransposon cDNA (L1Tc) from *Trypanosoma cruzi*: homology of the first ORF with the Ape family of DNA repair enzymes. *J Mol Biol*. 247: 49-59.
- Maya JD, Bollo S, Nuñez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morello A, Périé J, Chauvière G 2003. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. *Biochem Pharmacol*. 65: 999-1006.
- Mcdaniel JP & Dvorak JA 1993. Identification, isolation and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol Biochem Parasitol* 57: 213-222.
- Michailowsky V, Luhrs K, Rocha MO, Fouts D, Gazzinelli RT, Manning JE 2003. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infect Immun*. 71(6): 3165-3171.
- Miles MA, Souza AA, Povoas M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 272: 819-821.

- Miles MA, Lanhan SM, De Souza AA, Pova DG 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 74: 221-242.
- Moncayo A 1999. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 (suppl I): 401-404.
- Morel CM, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci. USA* 77: 6810-6814.
- Morello A 1988. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol.* 90C (1): 1-12. Review.
- Moreno SN, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AO 1982. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch Biochem Biophys.* 218 (2): 585-591.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 27(7): 1477-1482.
- Murta SMF, Gazzineli RT, Brener Z, Romanha AJ 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazol and nifurtimox. *Mol Biol Parasitol.* 93: 203-214.
- Nakaar V, Dare AO, Hong D, Ullu E, Tschudi C 1994. Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in *Trypanosomes*. *Mol Cell Biol.* 14: 6736-6742.
- Nilsen TW 1992. Trans-splicing in protozoa and helminthes. *Infect Agents Dis.* 7: 212-218.
- Novak E, De Mello M, Gomes HB, Guevara P, Ramirez JL, Franco Da Silveira J 1993. Repetitive sequences in the ribosomal intergenic spacer of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 60: 273-280.
- Nozaki T & Cross GA 1995. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 75: 55-67.
- Olivares-Villagómez D, Mccurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE 1998. Polymerase Chain Reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg.* 59(4): 563-570.
- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SD 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(7): 3776-3780.
- Oliveira RP, Melo AI, Macedo AM, Chiari E, Pena SD 1999. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA repeat microsatellites. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 (Suppl I): 65-70.

- Olive P 1978. Nitrofurazone-induced DNA damage to tissues of mice. *Chem Biol Interact.* 20: 323-331.
- Pacheco et al., Anais do XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2005
- Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B 2003. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol Biochem Parasitol.* 129: 79-90.
- Perry KL & Agabian N 1991. mRNA processing in the *Trypanosomatidae*. *Experientia*, 47: 118-128.
- Prata A 1994. Chaga's disease. *Infect Dis Clin North Am.* 8: 61-76.
- Prata A 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chaga's disease. *The Lancet Infectious Diseases* 1: 92-100.
- Rassi A & Luquetti AO 1992. Therapy of Chagas disease. In: Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on *Transfusion* and clinical medicine (ed.) Wendel S, Brener Z, Camargo ME & Rassi A. ISBT Brazil, São Paulo, 237-247.
- Rassi A, Rassi JA, Rassi GG 2000. Fase aguda. In: *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2.^a Edição. Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. Rio de Janeiro, 231-244.
- Requena JM, Jimenez-Ruiz A, Soto M, Lopez MC, Alonso C 1992. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol Biochem Parasitol.* 51(2): 271-280.
- Requena JM, Martin F, Soto M, Lopez MC, Alonso C 1994. Characterization of a short interspersed reiterated DNA sequence of *Trypanosoma cruzi* located at the 3'- end of a poly (A) + transcript. *Gene* 146: 245-250.
- Requena JM, Lopez MC, Alonso C 1996. Genomic repetitive DNA Elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology today.* 12: 279-282.
- Romanha AJ, Silva-Pereira AA, Chiari E, Kilgour V 1979. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi* changes after prolonged subculture. *Com Biochem Physiol.* 62B: 139-142.
- Romanha AJ 1982. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. Tese PhD, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 110.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 17: 914-921.
- Santos MRS, Cano MI, Schijman A, Vazquez M, Levin MJ, Ramirez JL, Brandão A, Degraive WM, Franco Da Silveira J 1997. *Trypanosoma cruzi* genome Project: nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brener. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 821-828.
- Schmunis GA 1999. Prevention of *Transfusional Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 (suppl I): 93-101.

- Schofield CJ, Dias JCP 1999. The Southern Cone Programme against Chagas disease. *Adv Parasitol.* 42: 1–25.
- Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP 1999. The process of domestication in triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 (suppl I): 375-378.
- Segura EL, Cura EN, Estani SA, Andrade J, Lansetti JC, de Rissio AM, Campanini A, Blanco SB, Gurtler RE, Alvarez M. Long-term effects of a nationwide control program on the seropositivity for *Trypanosoma cruzi* infection in young men from Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Mar;62(3):353-362.
- Silveira AC, Vinhaes MC 1999. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 (suppl I): 405–411.
- Silveira JF 2000. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. 2ª edição. Brener, Z., Andrade, ZA., Barral-Neto, M. Rio de Janeiro, 127-147.
- Smith TF & Waterman MS 1981. Overlapping genes and information theory. *J Theoretical Biol.* 91: 379-380.
- Solari A 1980. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. *Chromosoma.* 78: 239-255.
- Solari A, Campillay R, Ortiz S, Wallace A 2001. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp Parasitol.* 97 (4): 226-233.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 83(2): 141-152.
- Steindel M, Dias Neto E, Menezes CLP, Romanha AJ, Simpson AJG 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol.* 60: 71-80.
- Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L 1989. 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.* 33(3): 205-214.
- Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA 2003. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Internat J Parasitol.* 33: 269-279.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon SA, Morris LM, Wittner M 1992. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev.* 5: 400-419.
- Tappel AL 1973. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fedn Proc.* 32: 1870-1874.
- Teixeira SM, Kirchhoff L, Donelson J 1995. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNA from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 270: 22586-22594

- Teixeira SMR 1998. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz J Med Biol Res.* 31: 1503-1516.
- Tekiel VS, Mirkin GA, Gonzalez SM 1997. Chaga's disease: reactivity against homologous tissues induced by different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 115 (pt 5): 495-502.
- Thompson C & Dvorak JA 1989. Quantitation of total DNA per cell in an exponentially growing population using the diphenylamine reaction and flow cytometry. *Analytical Biochemistry.* 177: 353-357.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research.* 25: 4876-4882.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci.* USA 83: 115-119.
- Tibayrenc M & Ayala FJ 1987. High correlation between isoenzyme classification and kinetoplast DNA variability in *Trypanosoma cruzi*. *C R Acad Sci III.* 304(4): 89-92.
- Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabe C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 1335-1339.
- Tibayrenc M 1995. Populations genetics and strain typing of microorganisms: how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci. *C R Acad Sci III.* 318 (1): 135-139.
- Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabe C, Tafuri WL, De Lana M 2003. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 223-230.
- Ullu E, Tschudi C, Gunzi A 1996. Trans-splicing in *Trypanosomatid* protozoa. In: Smith, DF., Parson, M. (ed) *Molecular Biology of Parasitic Protozoa.* IRL Press Oxford, 115-129.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.* 156(5): 1805-1809.
- Vanhame L & Pays E 1995. Control of gene expression in Trypanosomes. *Microbiol Rev.* 59: 223-240.
- Vargas N, Souto RP, Carranza JC, Vallejo GA, Zingales B 2000. Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations. *Exp Parasitol.* 96(3): 147-159.

- Vazquez MP, Schijman AG, Levin MJ 1994. A short interspersed repetitive element provides a new 3' acceptor site for trans-splicing in certain ribosomal P2 beta protein genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 64: 327-336.
- Vazquez M, Lorenzi H, Schijman AG, Ben-Dov C, Levin MJ 1999. Analysis of the distribution of SIRE in the nuclear genome of *Trypanosoma cruzi*. *Gene*. 239(2): 207-216.
- Veloso VM, Romanha AJ, Lana M, Murta SM, Carneiro CM, Alves CF, Borges EC, Tafuri WL, Machado-Coelho GL, Chiari E, Bahia MT 2005. Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. *Parasitol Res*. 96(6): 382-389.
- Vidigal PG 1996. Reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção de DNA do *Trypanosoma cruzi*: avaliação de iniciadores previamente descritos e sua aplicação em amostras biológicas. 107p. Tese Msc, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M 2003. Comparison of Polymerase Chain Reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 68(5): 574-582.
- Wagner W & So M 1990. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. *Infect. Immun*. 58: 3217-3224.
- Walder JA, Eder PS, Engaman DM, Brentano ST, Walder RY, Knutzon DS, Dorfman DM, Donelson JE 1986. The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's. *Science*. 233: 569-571.
- WHO. Organização Mundial da Saúde. Disponível em [http: www.who.gov.br](http://www.who.gov.br)
- Wickstead B, Ersfeld K, Gull K 2003. Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev*. 67(3): 360-375.
- Yeo M, Lewis MD, Carrasco HJ, Costa NA, Llewellyn M, Valente SAS, Valente VC, Arias AR, Miles MA 2006. Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. *Int J Parasitol*. doi:10.1016/j.ijpara.2006.08.002
- Zingales B, Abuin G, Romanha AJ, Chiari E, Colli W 1984. Surface antigens of stocks and clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans. *Acta Trop*. 41(1):5-16.

ANEXOS

ANEXO 1:

Código de identificação utilizado neste trabalho e “Accession Number” das seqüências nucleotídicas obtidas e depositadas no banco de dados GenBank.

CEPA	CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO	Nº SEQUÊNCIAS IDÊNTICAS OBTIDAS	ACCESSION NUMBER (GenBank)
Barra Seca	BS01	3	DQ914442
	BS02	2	DQ914443
	BS03	2	DQ914444
	BS04	1	DQ914445
	BS05	1	DQ914446
	BS06	1	DQ914447
	BS07	1	DQ914448
Quaraizinho	Qua01	5	DQ914449
	Qua02	4	DQ914450
	Qua03	2	DQ914451
	Qua04	1	DQ914452
	Qua05	1	DQ914453
	Qua06	1	DQ914454
	Qua07	1	DQ914455
	Qua08	1	DQ914456
	Qua09	1	DQ914457
Colombiana	Col01	4	DQ914458
	Col02	4	DQ914459
	Col03	3	DQ914460
	Col04	2	DQ914461
	Col05	1	DQ914462
	Col06	1	DQ914463
	Col07	1	DQ914464
	Col08	1	DQ914465
	Col09	1	DQ914466
	Col10	1	DQ914467
Yuyu	Yuyu01	7	DQ914468
	Yuyu02	4	DQ914469
	Yuyu03	3	DQ914470
	Yuyu04	2	DQ914471
	Yuyu05	2	DQ914472
	Yuyu06	2	DQ914473
	Yuyu07	1	DQ914474
CL-Brener	CIB01	4	DQ914475
	CIB02	1	DQ914476
	CIB03	1	DQ914477
J	J01	3	DQ914478
	J02	1	DQ914479
	J03	2	DQ914480
	J04	1	DQ914481
	J05	1	DQ914482
	J06	1	DQ914483
	J07	1	DQ914484
	J08	1	DQ914485
Luna	Luna01	3	DQ914486
	Luna02	1	DQ914487
	Luna03	1	DQ914488
	Luna04	1	DQ914489
	Luna05	1	DQ914490

	Roma01	4	DQ914491
Romano	Roma02	4	DQ914492
	Roma03	2	DQ914493
	Roma04	1	DQ914494
	Roma05	1	DQ914495
	Noel01	3	DQ914496
Noel	Noel02	1	DQ914497
	Noel03	1	DQ914498
	Noel04	1	DQ914499
	Noel05	1	DQ914500
	Noel06	1	DQ914501
	Noel07	1	DQ914502
	VL-10	VL10-01	5
VL10-02		2	DQ914504
VL10-03		2	DQ914505
VL10-04		1	DQ914506
VL10-05		1	DQ914507
VL10-06		1	DQ914508
VL10-07		1	DQ914509
VL10-08		1	DQ914510
VL10-09		1	DQ914511
Ernane	Ern01	5	DQ914512
	Ern02	4	DQ914513
	Ern03	4	DQ914514
	Ern04	1	DQ914515
	Ern05	1	DQ914516
PNM	PNM01	6	DQ914517
	PNM02	5	DQ914518
	PNM03	4	DQ914519
	PNM04	1	DQ914520
	PNM05	1	DQ914521
