Capa: Foto *Trypanosoma cruzi* por Rubem Figueiredo. Disponível em: www.ioc.fiocruz.br/.../img/chagas_2.jpg. Acesso em 15 de maio de 2010.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação comparativa de diferentes métodos de quantificação de formas teciduais de *Trypanosoma cruzi* na infecção experimental

Mariana Bryan Augusto

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação comparativa de diferentes métodos de quantificação de formas teciduais de *Trypanosoma cruzi* na infecção experimental

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de **Mestre em CIÊNCIAS**.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Mariana Bryan Augusto

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Ribeirão Preto
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICA, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE CITADA A FONTE.

Augusto, Mariana Bryan

Avaliação comparativa de diferentes métodos de quantificação de formas teciduais de *Trypanosoma cruzi* na infecção experimental. Ribeirão Preto, 2010.

90 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Albuquerque, Sérgio.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. CL B5. 3. Atividade enzimática. 4. Vias de inoculação. 5. Quantificação parasitária.

Aluna: Mariana Bryan Augusto

Título: Avaliação comparativa de diferentes métodos de quantificação de formas teciduais de *Trypanosoma cruzi* na infecção experimental

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque pela oportunidade de realizar este trabalho, por sua orientação e seus ensinamentos.

Aos demais docentes do laboratório, Prof^a. Dra. Ana Amélia Carraro-Abrahão e Prof. Dr. Clóvis do Prado Júnior, que contribuíram com seus conhecimentos enriquecendo este trabalho.

Agradeço a colaboração fundamental dos técnicos, Miriam, Antônia e Georgius.

Aos meus colegas e amigos da pós-graduação, Mariana, Kelly, Christian, Luiz Gustavo, Carla e Renata, agradeço pela ajuda na realização deste e igualmente pelo companheirismo.

A Prof^a. Dra. Nádia Monesi e sua aluna Dr^a Juliana Candido pelo aprendizado de técnicas existentes no laboratório. Prof^a. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui e seu aluno de doutorado Luis Miguel, bem como a Prof^a. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis e sua aluna de doutorado Lizziane Kretli, pelo uso de seus laboratórios.

Meus amigos biomédicos (Daiane, Milla, Carla, Ângela, Israel, Vitor) que me acompanharam durante a realização deste estudo, e amigos biólogos que mesmo distantes, estão sempre presentes. Assim como todos aqueles que de alguma forma colaboraram para que este trabalho fosse concluído.

Agradeço ao Antonio Flávio pelo carinho, paciência e amizade. Do mesmo modo suas sugestões e correções realizadas neste trabalho.

Por fim, aos meus pais que estão sempre presentes em todas minhas etapas e, sem dúvida, muito do que realizei até agora foi devido a sua sabedoria, nossa amizade e afeto.

Agradeço às agências de fomento, FAPESP e CNPq, que permitiram a concretização deste.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELA.....	v
LISTA DE ABREVIACÕES.....	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
RESUMEN.....	xi
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	2
1.2. Transmissão, epidemiologia e tratamento da Doença de Chagas	5
1.3. Características moleculares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
3.2. Obtenção das formas tripomastigotas do parasito.....	14
3.3. Animais.....	14
3.4. Avaliação da parasitemia sanguínea	15
3.5. Técnica de dissecação.....	15
3.6. Técnica histológica	16
3.7. Determinação do índice de infecção tecidual avaliado por técnica histológica	16
3.8. Determinação quantitativa de <i>Trypanosoma cruzi</i> por caracterização de β -galactosidase	16
3.9. Avaliação quantitativa tecidual de <i>T. cruzi</i> por meio de <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (<i>Real Time-PCR</i>)	17
3.10. Análise estatística	19
4. RESULTADOS	21
4.1. Avaliação da parasitemia	21
4.2. Determinação quantitativa de <i>Trypanosoma cruzi</i> por caracterização de β -galactosidase	21
4.3. Comparação entre atividade enzimática, histológica e molecular (<i>PCR</i> convencional).....	23
4.4. Avaliação quantitativa tecidual de <i>T. cruzi</i> por meio de <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (<i>Real Time-PCR</i>)	35
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXO 1 - Tabelas de valores brutos da leitura em espectrofotômetro em 570 nm referente à atividade da β -galactosidase.....	63
ANEXO 2 – Análise da formação de dímero dos <i>primers</i> D71 e D72 de <i>T. cruzi</i>	66
ANEXO 3 – Curvas obtidas na técnica de <i>Real Time-PCR</i>	70

LISTA DE FIGURAS

Figura	pág.
1-Nível parasitêmico dos grupos IP (intraperitoneal), SC (subcutâneo) e OR (oral) infectado com a cepa CL B5 de <i>T. cruzi</i>	23
2- Espectro de absorção de tecidos provenientes de um animal não contaminado (controle negativo) e de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em meio LIT adicionadas do substrato CPRG.....	24
3- Curva padrão da concentração de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em meio LIT por determinação da atividade da β -galactosidase em 570 nm.....	25
4- Comparativo da atividade enzimática em 570 nm entre os tecidos estudados no grupo inoculado via IP.....	26
5- Cortes histológicos de tecidos de animais do grupo controle, não infectado e grupo inoculado pela via IP, observados em microscópio óptico na objetiva de 400X. A) Tecido cardíaco do animal pertencente ao grupo controle; B) Tecido cardíaco de animal infectado contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta); C) Tecido muscular do animal pertencente ao grupo controle; D) Tecido muscular contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta).....	27
6- Fotografia de gel de agarose 1,5% corado com <i>GelRed</i> para detecção de DNA de <i>T. cruzi</i> por meio da visualização de bandas marcadas na posição de 125pb dos tecidos estudados (coração, fígado, baço, intestino e musculatura esquelética). Em cada foto há o marcador de peso molecular de 100pb juntamente com os grupos controle de cada tecido. (IP – intraperitoneal; CT – controle; C – coração, F – fígado; B – baço; I – intestino; M – musculatura esquelética).....	27
7- Comparativo da atividade enzimática em 570 nm entre os tecidos estudados no grupo inoculado via SC.....	28

Figura**pág.**

- 8-** Cortes histológicos de tecidos de animais do grupo controle, não infectado e grupo inoculado pela via SC, observados em microscópio óptico na objetiva de 400X. A) Tecido cardíaco do animal pertencente ao grupo controle; B) Tecido cardíaco de animal infectado contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta); C) Tecido hepático do animal pertencente ao grupo controle; D) Tecido hepático contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta); E) Tecido esplênico do animal pertencente ao grupo controle; F) Tecido esplênico contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta); G) Tecido entérico do animal pertencente ao grupo controle; H) Tecido entérico contendo ninho de forma amastigota, entretanto na musculatura esquelética que envolve tecido (representado pela seta); I) Tecido muscular do animal pertencente ao grupo controle; J) Tecido muscular contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta)..... 30
- 9-** Fotografia de gel de agarose 1,5% corado com *GelRed* para detecção de DNA de *T. cruzi* por meio da visualização de bandas marcadas na posição de 125pb dos tecidos estudados (coração, fígado, baço, intestino e musculatura esquelética). Em cada foto há o marcador de peso molecular de 100pb juntamente com os grupos controle de cada tecido. (SC – subcutâneo; CT – controle; C – coração, F – fígado; B – baço; I – intestino; M – musculatura esquelética)..... 31
- 10-** Comparativo da atividade enzimática em 570 nm entre os tecidos estudados no grupo inoculado via OR..... 32
- 11-** Cortes histológicos de tecidos de animais do grupo controle, não infectado e grupo inoculado pela via OR, observados em microscópio óptico na objetiva de 400X. A) Tecido cardíaco do animal pertencente ao grupo controle; B) Tecido cardíaco de animal infectado contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta); C) Tecido hepático do animal pertencente ao grupo controle; D) Tecido hepático contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta); E) Tecido esplênico do animal pertencente ao grupo controle; F) Tecido esplênico contendo 3 ninhos de forma amastigota (representado pela seta); G) Tecido muscular do animal pertencente ao grupo controle; H) Tecido muscular contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta)..... 33
- 12-** Fotografia de gel de agarose 1,5% corado com *GelRed* para detecção de DNA de *T. cruzi* por meio da visualização de bandas marcadas na posição de 125pb dos tecidos estudados (coração, fígado, baço, intestino e musculatura esquelética). Em cada foto há o marcador de peso molecular de 100pb juntamente com os grupos controle de cada tecido. (OR – oral; CT – controle; C – coração, F – fígado; B – baço; I – intestino; M – musculatura esquelética)..... 34

Figura	pág.
13- Comparativo entre as diferentes vias de inoculação (IP - intraperitoneal, SC - subcutânea e OR - oral) da atividade enzimática em 570 nm nos tecidos estudados. A) Coração; B) Fígado; C) Baço; D) Intestino; E) Musculatura esquelética.....	36
14- Resultados das análises para determinação do limite de detecção do método da <i>PCR</i> em tempo real para quantificação de <i>T. cruzi</i> utilizando os <i>primers</i> D71 e D72 e diluições de 2,2 a $2,2 \times 10^{11}$ parasitas por reação de <i>PCR</i> , controle positivo, controle negativo e branco, sendo obtidas: A) Curva de amplificação de <i>PCR</i> em tempo real; B) Curva de linearidade do método de <i>PCR</i> em tempo real mostrando a equação da reta e o coeficiente de correlação; C) Curva de dissociação (" <i>melting curve</i> ").....	37

LISTA DE TABELA

Tabela	pág.
1- Representativo da quantidade de ninhos de formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> (por lâmina) encontrados nos tecidos em cada grupo (IP-intraperitoneal, SC-subcutâneo, OR- oral).....	34

LISTA DE ABREVIACES

ANOVA: Análise de Variância

Ca⁺: ion cálcio

CL B5: clone da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*

CPRG: *chlorophenol red β-galactopyranoside*

CT: controle

DNA: cido desoxirribonucléico

D71, D72, D75: *primers* referentes à regio D7 do gene 24S rDNA do *Trypanosoma cruzi*

IP: intraperitoneal

gp82: glicoproteína 82

µg: micrograma(s)

LIT: *Liver Infusion Tryptose*

mL: mililitro(s)

NF-κB: fator nuclear kappa B

nm: nanmetros

OR: oral

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

Real Time-PCR: *Real Time Polymerase Chain Reaction*

SC: subcutâneo

SPF: *Specific Pathogen Free*

Z1, Z2, Z3: zimodema 1, 2 e 3

RESUMO

Completando 100 anos da descoberta da moléstia, a Doença de Chagas, causada pelo agente etiológico *Trypanosoma cruzi*, ainda é considerada nas Américas Central e do Sul um problema de saúde pública, atingindo mais de 8 milhões de indivíduos. Sua transmissão ocorre de distintas maneiras, como por vetores, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes em laboratórios, via oral. O parasita é conhecido por sua heterogeneidade no genótipo e fenótipo, baseado em mutações cumulativas em diferentes sub-populações do parasita. A cepa CL Brener é uma cepa padrão para pesquisa com diversas peculiaridades interessantes como baixa infectividade em animais, resposta aos tratamentos existentes e seus marcadores genéticos serem estáveis. O clone CL B5 de *T. cruzi* é originado a partir da cepa CL Brener modificada geneticamente. A cepa possui um gene repórter, o *LacZ* de *Escherichia coli* que sintetiza uma enzima, a β -galactose que pode catalisar uma reação colorimétrica com o substrato vermelho de clorofenol β -galactopiranosideo (CPRG). A atividade enzimática é diretamente proporcional ao número de parasita. No presente trabalho propomos a introdução de uma técnica colorimétrica para caracterização de parâmetros para quantificação do parasitismo tecidual e comparação com a técnica histológica e *Real Time-PCR*. Camundongos Balb/C machos foram divididos em grupos controle (não infectado) e experimental variando a via de inoculação, a saber, intraperitoneal (IP), subcutânea (SC) e oral (OR). As curvas parasitêmicas foram realizadas por meio da coleta de sangue da cauda do animal. Após morte dos mesmos, foram estudados os tecidos cardíaco, hepático, esplênico, entérico e muscular (músculo esquelético). Os órgãos foram retirados, divididos em três porções equitativas para análise histológica, enzimática e molecular. Na atividade enzimática, comparando os tecidos em suas vias de inoculação, o fígado apresentou resultado significativo no grupo inoculado via IP. Tecido cardíaco apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) entre as vias de inoculação OR e SC, apresentando maior atividade enzimática na primeira, o que está relacionado a uma maior quantidade de parasita tecidual. Nos cortes histológicos o grupo SC mostrou-se mais infectado com grande número de ninhos de forma amastigota em praticamente todos os tecidos, enquanto nos demais grupos foram observados ninhos de amastigota em sua maioria no coração e

músculo esquelético. A presença do parasita nos demais tecidos foi confirmada pela eletroforese em gel de agarose 1,5% após técnica de *PCR* convencional. A *Real Time-PCR* não se mostrou satisfatória no trabalho devido a dificuldade na sua padronização. Concluindo, a metodologia enzimática se mostrou favorável e adequada na quantificação parasitária tecidual, podendo ser aperfeiçoada para corroborar sua eficácia.

Palavra-chave: *Trypanosoma cruzi*, CL B5, atividade enzimática, vias de inoculação, quantificação parasitária.

ABSTRACT

One hundred years after the discovery of Chagas' Disease, an illness caused by blood born protozoan *Trypanosoma cruzi*, is still consider a public health problem. It is a major cause of morbidity and mortality in Central and South Americas where more than 8 million individuals are already infected. This illness can be contracted by different forms as vector transmission, blood transfusion, tissue transplant, laboratory accidents and oral route. The parasite has a heterogeneous genotype and phenotype due to accumulating mutation in their sub-populations. CL Brener is considered as a pattern strain due to some intrinsic characteristics as low infectivity, good response to therapy drugs and a stable genetic heritage. The CL B5 clone of *T. cruzi* was originated by a genetic modification of the CL Brener strain which has a reporter gene *LacZ* of *Escherichia coli*, which induces the syntesis of β -galactosidase which is able to catalyze a colorimetric reaction using the substrat Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG). The enzymatic activity is directly related with the number of the parasites. In this study we proposed a new colorimetric assay to quantify *T. cruzi* load in different animal tissues by comparing with other methodologies such histological and molecular assay (*Real Time-PCR*). Male Balb/C mice were separated into control and experimental groups according to the route of infection (IP-intraperitoneal, SC-subcutaneous, OR-oral). Parasitemic curves were made by collecting blood samples from the tail of experimental animals. Fifteen days after, animals were euthanized and their tissues removed (heart, liver, spleen, intestine and skeletal muscles) and divided in three portions for the colorimetric analyses, histopathology and molecular assay. The enzymatic activity was performed comparing the number of parasites in different tissues according to the route of infection. Comparing them, it was observed that heart and liver displayed the highest number of parasites as compared with the other studied tissues. In the liver, IP route triggered the highest number of parasites while in the heart OR and SC routes displayed enhanced parasites. The histopathology analysis revealed that SC group presented the highest number of amastigote nests. For IP and OR groups, nests were mostly observed in heart and skeletal muscles. *T. cruzi* DNA were detected using electrophoreses 1,5 % agarose gel after conventional *PCR* technique, displaying characteristic bands of DNA. The *Real Time-PCR* was not a satisfactory

assay for this study due to difficulties on its patronization. To conclude, the enzymatic methodology was advantageous and appropriated on quantifying tissue parasites. Some further experiments will be needed to improve methodology and its efficacy.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*, CL B5, enzymatic activity, route of infection, quantifying parasites.

RESUMEN

Completados cien años desde la descubierta de la enfermedad de Chagas, causada por el agente etiológico *Trypanosoma cruzi*, la molestia todavía sigue siendo considerada un problema de salud pública en las Américas Central y Del Sur, por alcanzar hoy en día más de ocho millones de individuos. Su transmisibilidad ocurre de distintas maneras, sea por vectores, transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos, accidentes en laboratorios o aún por vía oral. El *T. cruzi* es conocido por su heterogeneidad en su genotipo y fenotipo, basado en mutaciones cumulativas en distintas subpoblaciones de este parásito. La cepa CL Brener es considerada cepa estándar para las investigaciones, por poseer distintas peculiaridades interesantes como su baja infectividad en animales, su respuesta a los tratamientos existentes, y la estabilidad de sus marcadores genéticos. El clon CL B5 de *T. cruzi* es originado a partir de una cepa CL Brener genéticamente modificada. La cepa posee un gen reportero, el *LacZ* de *Escherichia coli*, que tiene la capacidad de catalizar el sustrato rojo de clorofenol β -galactopiranosideo (CPRG) en una reacción colorimétrica. Su actividad enzimática es directamente proporcional al número del parásito. En el presente trabajo hemos propuesto la introducción de una técnica colorimétrica para la caracterización de los parámetros para proceder a la cuantificación del parasitismo tisular y la comparación con la técnica histológica *Real Time-PCR*. Ratones Balb/C machos fueron divididos en grupo control (no infectado) y experimental, cambiando su vía de inoculación en intraperitoneal (IP), subcutánea (SC) y oral (OR). Las curvas de parasitemia fueron realizadas por medio de la colección de la sangre de la cola del animal. Después de la muerte de los animales, fueron estudiados sus tejidos cardíaco, hepático, esplénico, entérico y muscular (músculo esquelético). Los órganos fueron removidos y divididos en tres partes equitativas para los análisis histológicos, enzimáticos y moleculares. En la actividad enzimática, en comparación con los tejidos en sus vías de inoculación, el hígado presentó resultado significativo en el grupo inoculado vía IP. El tejido cardíaco presentó diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre las vías de inoculación OR y SC, presentando mayor actividad enzimática en la primera, lo que lo correlaciona una mayor cantidad de formas del parásito. En los cortes histológicos, el grupo SC se mostró más infectado con un gran número de nidos de

forma amastigota en prácticamente todos los tejidos, en cuanto que en los demás grupos fueron observados los nidos de amastigotas en su mayoría en el corazón y en el músculo esquelético. La presencia del parásito en los demás tejidos ha sido confirmada por medio de electroforesis en gel de agarosa 1,5% por técnica convencional de *PCR*. La *Real Time-PCR* no se mostró satisfactoria en el trabajo debido a la dificultad de su padronización. En conclusión, la metodología enzimática se mostró favorable y adecuada en la cuantificación parasitaria tejidual, pudiendo ser perfeccionada para corroborar su eficacia.

Palabras-clave: *Trypanosoma cruzi*, CL B5, reacción colorimétrica, vía de inoculación, cuantificación del parasitismo.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

Decorridos cem anos da descoberta de *Trypanosoma cruzi* (1909-2009), agente etiológico da Doença de Chagas, a moléstia ainda é considerada nas Américas Central e do Sul um problema de saúde pública. Descoberta pelo pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (CHAGAS, 1909), a enfermidade atinge atualmente cerca de 8 milhões de indivíduos, além de uma população de 28 milhões envolvidos no risco de adquirir a infecção (WHO, 2007). O continente Americano é o mais acometido por haver situações favoráveis ao desenvolvimento do parasita como clima, vegetação (DIAS, 1994). Isso somado a uma população carente, vivendo em condições miseráveis (falta de instrução, saúde precária, habitação inadequada) contribui para a disseminação da doença (DIAS, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Ao avaliar o Brasil nesse contexto, observar-se uma situação não muito diferente à apresentada inicialmente. Com um quadro epidemiológico estimado em pouco mais de 6 milhões de indivíduos parasitados por *T. cruzi*, é possível deduzir que a situação sócio-econômica que envolve a infecção chagásica no Brasil é ainda preocupante (WHO, 2001). Medidas estão sendo tomadas na tentativa de erradicar a doença. A melhor forma utilizada é a eliminação do vetor e melhoria na qualidade de vida da população, sendo que a primeira maneira apresentou resultados satisfatórios no país (MONCAYO e SILVEIRA, 2009).

O número de insetos encontrados na região peridomiciliar vem reduzindo ao longo dos anos. Dados apontam na década de 1980 um valor próximo a 190.000 insetos capturados, enquanto no ano de 2007 esse número caiu para 205 em menos de 15 municípios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007 *apud* MONCAYO e SILVEIRA, 2009), o que mostra a efetividade da medida. No estado de São Paulo, em meados da década de 1970, a transmissão vetorial já estava erradicada.

Outra forma que preocupa na transmissão da doença, são os bancos de sangue. O controle rigoroso e adequado do material colhido se faz necessário e é indicado como forma de erradicação da moléstia (MONCAYO e SILVEIRA, 2009).

O ciclo biológico do agente etiológico da infecção envolve um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um invertebrado (vetor), podendo apresentar as seguintes formas de desenvolvimento nos hospedeiros: amastigota, encontrada no interior das células de diversos tecidos dos vertebrados ou em cultura de células; epimastigota, no tubo digestivo dos triatomíneos e em cultura axênica; tripomastigota, no sangue dos vertebrados e cultura celular (CHAGAS, 1909; VIANNA, 1911; ROMAÑA e MEYER, 1942; CAMARGO, 1964; ZINGALES e COLLI, 1985).

O hospedeiro invertebrado, (inseto triatomíneo hematófago da família Reduviidae), apresenta como principais espécies *Triatoma infestans*, *Rodnius prolixus* e *Panstrongylus megistrus*, responsáveis pela principal forma de contaminação (FURLANETO, 2006).

O ciclo biológico da doença inicia-se quando o vetor, ao fazer o repasto sanguíneo, ingere sangue de um mamífero contaminado com formas tripomastigotas do parasita (FURLANETO, 2006). No estômago do inseto ocorre a transformação de tripomastigota para formas arredondadas e epimastigota (BRENER, 1973). Ao alcançar a porção final do intestino, mais precisamente no reto, ocorre uma nova transformação de epimastigota para tripomastigota metacíclica (forma infectante encontrada nas fezes ou urina do vetor) (BRENER, 1973).

O hospedeiro vertebrado (roedores, animais domésticos, homem, dentre outros mamíferos) é contaminado quando o parasita, eliminado pelo inseto em suas fezes e urina, encontra uma quebra na integridade de sua pele ou mucosa, atingindo tecidos subcutâneos e células encontradas na região, como macrófagos. Ao penetrar na célula, a forma tripomastigota transforma-se em amastigota. No interior da célula ocorre a divisão binária da forma amastigota com alterações morfológicas e transformação desta para a forma tripomastigota. Nesse estágio, ocorre a lise celular e liberação de ambas as formas na circulação e posterior contaminação de novas células e tecidos distantes (BRENER, 1973).

Estudos mostram haver uma interação entre moléculas presentes na membrana de *T. cruzi* e a mobilização de Ca^{2+} no interior de célula não fagocíticas do hospedeiro mamífero, sendo uma das formas de explicar a infectividade do parasita neste tipo celular (RUIZ *et al.*, 1998). A associação do parasita à membrana celular (estimulado por sensores de cálcio) desencadeia sinais que recrutam e fundem lisossomos à membrana celular, formando um vacúolo parasitóforo que perdura por um curto espaço de tempo (BURLEIGH e WOOLSEY, 2002). Ocorre

liberação do parasita no citossol e sua diferenciação em forma amastigota, tendo início a replicação (BURLEIGH e WOOLSEY, 2002).

A infecção por *T. cruzi* pode ocorrer como uma fase aguda ou crônica. A fase aguda é geralmente assintomática com a presença de parasitas no sangue. Alguns sintomas como o sinal de Romaña (edema no local de inoculação - face), febre, mialgia, sudorese, hepatoesplenomegalia e alterações laboratoriais como leucocitose, são encontrados em alguns pacientes na fase aguda da doença (MARIN-NETO *et al.*, 1999). Na fase crônica, alterações digestivas e cardíacas podem ser desenvolvidas, com consequência fatal como resultado de destruição progressiva dos órgãos afetados devida a multiplicação do parasita durante a fase aguda (VERA-CRUZ *et al.*, 2003). As complicações existentes na cardiopatia advêm de insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolia encontradas em pacientes na fase crônica (MARIN-NETO *et al.*, 1999).

Em humanos, uma característica marcante da Doença de Chagas é a variedade de apresentações clínicas, que incluem a forma indeterminada da doença, cardiomiopatias e alterações digestivas (TANOWITZ *et al.*, 1992). Para isso, é sugerido que essa variabilidade clínica pode ser resultante da heterogeneidade entre cepas de *T. cruzi* e/ou a resposta imune do hospedeiro.

ANDRADE (1976) em seus estudos sugere a hipótese da existência da variabilidade clínica de tropismo do parasita por alguns tipos celulares relacionando a sua morfologia. No caso do estudo, a forma delgada da cepa, mostrou-se frequente em células do sistema fagocitário mononuclear, esplenócitos, hepatócitos e células da medula óssea com altos e precoces picos parasitêmicos e, apesar de serem mais sensíveis à ação dos anticorpos circulantes, determinam na fase aguda da infecção, uma elevada taxa de mortalidade na grande maioria dos animais experimentais infectados.

Entretanto existem cepas que apresentam como característica morfológica predominante a presença de formas tripomastigotas sanguíneas largas, possuindo assim, marcante tropismo para células musculares (musculatura lisa, esquelética e cardíaca) e tecido glandular (RIBEIRO *et al.*, 1982). Essa conformação morfológica confere a este tipo de cepa uma maior resistência aos anticorpos circulantes. Como consequência permanece por mais tempo na corrente circulatória determinando picos parasitêmicos tardios e infecções de duração mais prolongada.

O curso da infecção nos vertebrados suscetíveis é influenciado por fatores como a temperatura ambiental, idade, sexo, constituição genética do hospedeiro, características genéticas e morfológicas da cepa infectante e fatores externos, como por exemplo, agentes físicos e químicos (BRENER, 1979).

O polimorfismo presente em *T. cruzi* é outro fator muito estudado para elucidar características biológicas das cepas em determinadas regiões. A apresentação patológica, os zimodemas (classificação do parasita de acordo com suas características enzimáticas - MILES, 1980 *apud* MOMEN, 1999) e o comportamento da cepa estão correlacionados com as manifestações clínicas da doença em determinada área geográfica (ANDRADE e MAGALHÃES, 1997).

1.2. Transmissão, epidemiologia e tratamento da Doença de Chagas

A transmissão da doença de Chagas pode ocorrer de diversas maneiras, como por meio de vetores invertebrado (CHAGAS, 1909; SCHUMUÑIS, 1991), pela transfusão de sangue (DIAS, 1945; PELLEGRINO, 1949), pela forma congênita (SHIKANAI-YASSUDA *et al.*, 1990), por transplante de órgãos (SHIKANAI-YASSUDA *et al.*, 1990), pela via digestiva (MEDINA-LOPES, 1998), por secreções (DEANE *et al.*, 1979), via sexual, por acidente em laboratórios (REICHE e JANKEVICIUS, 1997).

Dentre essas formas, a transmissão vetorial é tida como principal meio de disseminação, causando cerca de 80% dos casos da doença de Chagas, e dela dependendo as outras formas de transmissão, como a por transfusão sanguínea, responsável por 5 a 20% dos casos e a congênita ou vertical com cerca de 1% (SILVEIRA e REZENDE, 1994; ARAS *et al.*, 2003).

Apesar de todos os esforços realizados no sentido de controlar a transmissão do parasita por suas principais vias de acesso ao organismo humano, ou seja, pela via vetorial e pela transfusão sanguínea, foi observado nos dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2003), que ainda no ano de 2000 o Brasil apresentou cerca de 6.000 casos de morte da doença notificados, sendo que deste total, boa parte se encontra na Região Nordeste do País. A FUNASA (2003) investiu em cidades nordestinas com objetivo de melhoria nas casas da população local, como forma de combate à doença.

Em 1975, devido a gravidade social da doença de Chagas, as autoridades sanitárias iniciaram o programa de controle da transmissão vetorial que visava a aplicação de inseticida de ação residual nas habitações, tendo como alvo *T. infestans*, vetor de maior importância epidemiológica devido ao seu alto grau de antropofilia e domiciliação (SILVEIRA e REZENDE, 1994). Somente a partir de 1983, os programas de controle alcançaram toda a área endêmica (SILVEIRA e VINHÃES, 1998).

Espécies como *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *Panstrongylus megistus*, que juntamente com *T. infestans* tinham participação direta na transmissão da doença de Chagas, têm sido encontrados com níveis de infestação e de colonização intradomiciliar incompatíveis para que ocorra a transmissão do parasita pela via vetorial (VINHÃES e DIAS, 2000).

Embora a transmissão vetorial da doença de Chagas pelo vetor domiciliado, seja controlada no Brasil, outras formas de contaminação podem ser responsáveis por novos casos de infecção com *T. cruzi*, como, por exemplo, a via digestiva. A contaminação de alimentos por vetores silvestres e reservatórios vertebrados do *T. cruzi*, é provavelmente um importante fator para a transmissão oral da doença de Chagas (CAMANDAROBÁ *et al.*, 2002).

A ocorrência de microepidemias de infecção por *T. cruzi* atribuídas a este tipo não vetorial de transmissão da doença de Chagas, foram identificadas em Teutonia – RS, Brasil (NERY-GUIMARÃES *et al.*, 1968; NEVES DA SILVA *et al.*, 1968) e Catolé do Rocha – PB, Brasil (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991). Mais recentemente, vários episódios tem sido identificados na Amazônia brasileira (VALENTE, S.A.S., *et al.*, 1999, 2001; VALENTE, V., 2001) e no sul do Brasil, mais especificamente no Estado de Santa Catarina. Um caso curioso ocorreu no Ceará (CAVALCANTI *et al.*, 2009) onde um grupo de pessoas que estavam a passeio contaminaram-se com o protozoário por meio da ingestão de uma sopa servida no local. Todos os pacientes notificados fizeram o tratamento e negativaram sua sorologia.

A terapêutica usada no tratamento da Doença de Chagas baseia-se no nitroderivado Benzonidazol conhecido comercialmente com Rochagan® (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) que atua na fase aguda da doença reduzindo o parasitismo e os sintomas encontrados. Outro fármaco usado no tratamento da doença é o nifurtimox (Lampit®) (5-nitrofurano (3-metil-4-(1-nitrofurfurylideneamino) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dioxido) (COURA e CASTRO, 2002).

Em ambos os tratamentos, os efeitos colaterais encontrados são motivo para o abandono do mesmo (BRENER, 1979; COURA *et al.*, 1997). No caso do Lampit[®] as principais reações relacionam-se a perda de apetite, emagrecimento, irritabilidade e alterações temporárias de comportamento e, para o Rochagan[®], ocorrem principalmente reações na pele (semelhantes à urticária), alterações digestivas, neurite e diminuição de glóbulos brancos no sangue (DIAS, 1999). Apesar destes efeitos, na fase aguda é alcançado cerca de 60% de cura no tratamento (COURA e CASTRO, 2002).

Os resultados obtidos no uso de ambas as drogas relacionam-se com a dose administrada, idade, forma de contaminação e fase da doença, sendo positivos na fase aguda, no início da fase crônica, na contaminação congênita e em acidentes laboratoriais (COURA e CASTRO, 2002). Coura *et al.*, 1997, realizaram estudo de campo comparando o uso de benzonidazol e nufurtimox em dois grupos de pacientes na fase crônica. Boa parte dos pacientes que usaram nufurtimox abandonou o tratamento devido aos efeitos colaterais apresentados.

Grupos como o DNDi (*Drugs for Neglected Disease initiative*) desenvolve pesquisas para obter novos fármacos para doenças negligenciáveis como a Doença de Chagas, que conta com estudos voltadas à formulação de Benzonidazol em dosagem pediátrica e novas formulações a base de azóis já conhecidos e utilizados como fungicidas (DNDi, 2009).

1.3. Características moleculares de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é conhecido por sua heterogeneidade no genótipo e fenótipo, talvez como resultado de seu método de propagação clonal, na qual é proposto que a mutação acumula em diferentes sub-populações do parasita (TIBAYRENC *et al.*, 1990). O parasita é diplóide e reproduz-se assexuadamente, como já citado e confirmado por Tibayrenc *et al.* (1986), entretanto há uma grande variabilidade genética na população de *T. cruzi* (MACEDO, *et al.*, 2002; SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007). De tal modo o parasita não se mostra como uma população homogênea e sim como um complexo multiclonal, havendo uma variação dentro da espécie. Esta diversidade leva a compreensão da variabilidade no decurso da patologia (ANDRADE e MAGALHÃES, 1997).

Alguns autores (BOGLIOLO *et al.*, 1996; CARRASCO *et al.*, 1996) sugerem que trocas genéticas podem contribuir para esta diversidade de *T. cruzi*. Contudo Tibayrenc *et al.* (1984, 1986), interpretando geneticamente os zimogramas de *T. cruzi*, formularam a hipótese de que este parasita é diplóide, e que a recombinação entre e dentro dos zimodemas é restrita ou ausente em populações naturais de *T. cruzi*.

O modelo clonal histotrópico da Doença de Chagas descreve a relação entre a estrutura clonal da população de *T. cruzi* e seu tropismo tissular e nos oferece uma possível explicação sobre a variabilidade determinada pelo parasita (MACEDO e PENA, 1998). Desse modo, clones presentes no sangue de paciente humano podem apresentar tropismo distinto em outros hospedeiros vertebrados (MACEDO *et al.*, 2004).

O estudo da estrutura genética do parasita e da expressão diferencial dos genes em diferentes períodos da infecção por populações naturais de *T. cruzi*, são importantes para o entendimento da patogênese da doença de Chagas. Andrade *et al.* (1999), encontraram, em modelo animal, tropismo do clone Col1.7G2 para musculatura lisa intestinal e do clone JG para músculo cardíaco. Entretanto, diversos fatores estão envolvidos para esta determinação, desde a variação genética por meio de mutações, apresentada pelo parasita, até características presentes no hospedeiro humano (MACEDO e PENA, 1998).

A complexa estrutura das populações de *T. cruzi* é inspirada em um esforço de se determinar marcadores que as correlacionem com características específicas da relação parasito/hospedeiro. O advento do estudo do DNA, baseado em marcadores multilocais como DNA *fingerprinting* (MACEDO *et al.*, 1992), *randomamplified polymorphic DNA* (TIBAYRENC *et al.*, 1990) e *simple-sequence-repeat PCR* (ZINGALES *et al.*, 1998) mostraram um grande nível de variabilidade genética intraespecífica do parasito. Amplificação das seqüências do gene do RNA ribossômico (rRNA) 24S α e do gene mini-exon não transcrito por técnica de PCR, indicam um claro dimorfismo entre os isolados de *T. cruzi* (FERNANDES *et al.*, 1998; SOUTO e ZINGALES, 1993; SOUTO *et al.*, 1996).

Recentemente, muitos autores pesquisam a divisão em que se encontram as diversas cepas de *T. cruzi*. As novas classificações de linhagens do parasita estão baseadas em diversos marcadores genéticos como o polimorfismo da região 24S α r

DNA, isoenzimas, mini-exon dentre outros marcadores que dividem evolutivamente as diferentes cepas em linhagens *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (FERNANDES *et al.*, 1998).

No entanto, há algumas cepas que não se enquadram nestas duas linhagens descritas, podendo ser classificadas como um híbrido da fusão destas linhagens e pertencendo ao zimodema 3 (Z3), segundo Souto *et al.*, 1996 e Stolf *et al.*, 2003. Pena *et al.* (2009) realizaram diversos ensaios utilizando diferentes marcadores moleculares e agruparam, com o uso de programas computacionais, as diversas cepas encontradas em *T. cruzi*. A partir do agrupamento formado, foi detectado uma grande correspondência das linhagens *T. cruzi* I e *T. cruzi* II com os zimodemas já descritos (Z1, Z2 e Z3), sendo observada ainda a existência de uma terceira linhagem, a *T. cruzi* III que corresponde a híbridos do parasita, onde algumas cepas, como CL Brener, 167, 1022, 82 Tulaci2, satisfazem a esta classificação.

Dentre os estudos relacionados a variações intraespecíficas do *T. cruzi*, a cepa CL Brener, um híbrido formado pela fusão das linhagens *T. cruzi* II e *T. cruzi* III, isolado do vetor *T. infestans* por Brener em 1963 (BRENER e CHIARI, 1963) no município de Encruzilhada, Rio Grande do Sul-Brasil, é amplamente usada em pesquisas por apresentar características favoráveis (DEGRAVE, 2008) como infectividade em animais, resposta aos tratamentos existentes e seus marcadores genéticos são estáveis (ZINGALES *et al.*, 1997). Esta cepa é conhecida pelo grande tropismo por células musculaturas esquelética e cardíaca, porém Lenzi *et al.* (1996) em seu experimento com modelos animais, evidenciaram a alta infectividade desta cepa, encontrando o parasita em diversos órgãos descendentes dos três folhetos embrionários (ectoderme, mesoderme e endoderme).

O uso de cepas geneticamente modificadas podem ser úteis em pesquisas para facilitar a compreensão do comportamento de determinados micro-organismos frente a substâncias, como realizado por Buckner *et al.* (1996) que testaram a resposta a medicamentos, *in vitro*, em um clone de CL Brener. Este clone, chamado CL B5, apresenta o gene *LacZ* isolado de *Escherichia coli* capaz de expressar a enzima β -galactosidase responsável por catalisar uma reação colorimétrica com o substrato *chlorophenol red β -galactopyranoside* (CPRG). A β -galactosidase é uma proteína estrutural (peso molecular de 540 kDa) codificada pelo gene *LacZ* produzida quando é adicionado um indutor de galactosidase para crescimento em cultura selvagem (FOWLER e ZABIN, 1970). A enzima hidrolisa a lactose e outras β -galactoses em monossacarídeos (MATTHEWS, 2005). Sua atividade enzimática

mostrou ser diretamente proporcional ao número de parasitas (BUCKNER *et al.*, 1996). Dessa forma, estes pesquisadores desenvolveram uma eficiente técnica para realizar *screening* de drogas anti-*T. cruzi*, em placa de 96 poços, diferindo das metodologias existentes como contagem manual em microscópio óptico,

Outros grupos de parasitas como a *Leishmania* e o *Toxoplasma* contendo o gene descrito, são utilizados para otimizar o trabalho de *screening* de drogas, permitindo resultados mais rápidos (comparados às técnicas manuais existentes de contagem de parasitas) e reduzem o uso de materiais radioativos (MCFADDEN *et al.*, 1997; OKUNO *et al.*, 2003). Assim como a técnica de *screening* descrita, metodologias semelhantes podem ser utilizadas para facilitar a pesquisa científica.

Na parasitologia, as doenças negligenciáveis como a leishmaniose, Doença de Chagas, toxoplasmose, requerem o desenvolvimento de técnicas de fácil execução, reprodutíveis e pouco dispendiosas.

A incidência de *T. cruzi* ainda é preocupante, o que leva a diversas pesquisas científicas a focar em trabalhos que relacionem o tropismo tecidual do parasita com as variadas cepas existentes na natureza, auxiliando na compreensão do decurso e consequências existentes da Doença de Chagas.

Contudo, a existência dos parâmetros atuais para quantificação do parasitismo tecidual esbarra em técnicas obsoletas de caracterização e quantificação, como a avaliação histopatológica. Por outro lado, técnicas moleculares altamente sofisticadas, como a *Real Time Polymerase Chain Reaction* (*Real Time-PCR*), requerem recursos ainda extremamente onerosos para serem utilizadas em rotinas experimentais.

Desse modo, é preposto o desenvolvimento de uma técnica de quantificação parasitaria tecidual, utilizando a enzima repórter β -galactosidase. Em comparação a tal metodologia enzimática, serão feitas análises de quantificação utilizando técnica histológica e molecular (*PCR* quantitativo).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

É objetivo do presente trabalho:

- ✓ Caracterizar a intensidade do parasitismo tecidual após a infecção por diferentes vias de inoculação, a saber: oral, subcutânea e intraperitoneal, tanto em nível de parasitismo sangüíneo, quanto em nível tecidual.
- ✓ Avaliar comparativamente o nível de parasitismo tecidual por diferentes métodos quantitativos, como avaliação histopatológica, *Real Time-PCR* e quantificação de enzima β -galactosidase, produzida pelo clone CL B5 da cepa CL Brener, alterada geneticamente para essa finalidade.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cepa de *Trypanosoma cruzi*

A cepa utilizada no trabalho foi o clone CL B5 da cepa CL Brener, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Alicia Gómez Barrío, da Universidade Complutense de Madrid.

3.2. Obtenção das formas tripomastigotas do parasito

Para a obtenção das formas tripomastigotas foi utilizado o sangue de animais contaminado com o clone CL B5, retirado no pico parasitêmico e mantido por repiques contínuos.

3.3. Animais

Foram utilizados 20 camundongos machos albinos SPF (*Specific Pathogen Free*), da linhagem Balb/C, pesando aproximadamente de 20 a 25 gramas, provenientes de colônia do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram acondicionados em caixas plásticas dentro de estante ventilada com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e mantidos com água e ração comercial *ad libitum*, de acordo com as condições regulamentadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA (protocolo número 08.1.959.53.6) da Universidade de São Paulo Campus Ribeirão Preto/São Paulo. Os grupos foram divididos da seguinte forma:

Grupo I - controle negativo – 02 animais livres de infecção, mantidos nas mesmas condições dos infectados com *T. cruzi*, que servirão como controle nas avaliações complementares;

Grupo II – 06 animais inoculados com 20.000 formas tripomastigotas, por via intraperitoneal, para avaliação da parasitemia e avaliações quantitativas teciduais;

Grupo III – 06 animais infectados com 20.000 formas tripomastigotas por via subcutânea, para avaliação da parasitemia e avaliações quantitativas teciduais;

Grupo IV – 06 animais infectados com 50.000 formas tripomastigotas, por via oral com uso de agulha de gavagem (adaptado de CAMANDAROBÁ *et al.*, 2002), para avaliação da parasitemia e avaliações quantitativas teciduais.

3.4. Avaliação da parasitemia sanguínea

As curvas parasitêmicas serão realizadas por meio da coleta de 5 µL de sangue da extremidade da cauda de cada animal em experimentação, a cada dois dias, após o sétimo dia da infecção, sendo o número de parasitas quantificados de acordo com a técnica descrita por Brener (1962).

Todos os animais serão mortos por asfixia em câmara de CO₂ para a realização das análises descrita no trabalho.

3.5. Técnica de dissecação

Após a morte dos animais e divulsão da pele, foi realizada a perfusão dos órgãos estudados, para retirada dos parasitas presentes no sangue.

Os órgãos (coração, fígado, baço, intestino e musculatura esquelética) foram retirados, pesados e divididos em três porções equitativas para avaliação histológica, molecular e enzimática.

Um terço de cada órgão foi colocado em formol tamponado 10 % (100 mL de formol 100%, 900 mL de água destilada, 4 g fosfato sódico monofásico e 6,5 g de fosfato sódico difásico), após 48 horas, em solução de álcool etílico a 80% sendo posteriormente submetidos às técnicas histológicas.

O segundo terço foi macerado em 2 ou 4 mL de tampão de lise (100 mM Tris base) e triturado em vórtex, intercalando-se os intervalos de 30 segundos de agitação e 30 segundos em banho de gelo, para preservação das proteínas, sendo que, após este processo, o material foi submetido à avaliação quantitativa da enzima β-galactosidase.

O mesmo procedimento foi realizado com o terceiro terço para posterior processamento e avaliação por *PCR* comum e *Real Time-PCR*.

3.6. Técnica histológica

Após fixação, o material foi preparado para confecção das lâminas, sofrendo os processos de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os cortes de 6 µm de espessura, semi seriados, foram corados pela hematoxilina-eosina. As lâminas foram confeccionadas no laboratório de histologia da UNIFRAN, pelo técnico José Luis.

3.7. Determinação do índice de infecção tecidual avaliado por técnica histológica

Após a coleta dos órgãos relatados, os mesmos foram submetidos a processamento histológico para a observação qualitativa dos diferentes índices de infecção parasitária tecidual determinados pelas diferentes vias de infecção.

O parasitismo tecidual foi estimado qualitativamente a partir da determinação do número de ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* observados em 50 campos microscópicos em aumento de 400x. Para esta análise, foram utilizados cortes de 5µm dos tecidos de cada animal, obtidos em intervalos de 15 cortes para evitar a repetição de análise de um mesmo ninho. Os cortes foram focalizados ao microscópio óptico (Axioskop 40 – Zeiss) munido de câmara para captura de imagem.

3.8. Determinação quantitativa de *Trypanosoma cruzi* por caracterização de β-galactosidase

Após trituração dos tecidos, os mesmos foram deixados em repouso durante duas horas, a 4°C e então realizada duas etapas de centrifugação à 5.000 rpm por 10 minutos à 4°C, para separação dos restos teciduais. O sobrenadante, 100 µL de cada tecido triturado, foi aliquoteado em placas de microtitulação de 96 poços para a realização da reação colorimétrica. O procedimento foi realizado em triplicata. Adicionou-se 50 µL de solução de CPRG – SIGMA-ALDRICH® (400 µM em 0.3 % Triton X-100, pH 7.4) em cada poço e a placa foi incubada posteriormente a 37° C

por 6 h. A absorbância foi determinada por leitura da placa em leitor ELISA (Sunrise Tecan), em 570 nm. Os resultados foram expressos em valores relativos da atividade de β -galactosidase (AE) de acordo com a seguinte fórmula:

$$AE = [(AE-AEB)/(AC-AEB)]$$

AE = absorbância dos poços contendo material obtido dos grupos II, III ou IV;

AEB = absorbância dos poços contendo apenas tampão;

AC = absorbância dos poços contendo material obtido do grupo I (controle negativo).

3.9. Avaliação quantitativa tecidual de *T. cruzi* por meio de *Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time-PCR)*

Extração do DNA

Após a coleta e divisão dos tecidos, os mesmos foram pesados e macerados para extração de DNA, seguindo o protocolo descrito pelo Kit Invisorb® Spin Mini Kit (Invitek) a partir de 0,5 a 40 mg de tecido. O extrato de DNA obtido das amostras foi quantificado e avaliado quanto a sua pureza por meio de análise espectrofotométrica (GeneQuant pro) nas absorbâncias de 260/280 nm, em seguida estas amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C até a realização das técnicas de *PCR* (convencional e quantitativa).

Execução da Técnica – Quantificação por PCR em tempo real

Para cada fragmento de tecido avaliado, a presença de *T. cruzi* foi verificada pela *PCR* convencional usando os *primers* D75 (5'-CAGATCTTGGTTGGCGTAG-3') e D72 (5'-TTTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'). A partir da confirmação da infecção pela *PCR*, foi realizada a quantificação absoluta de DNA por meio do Real Time-PCR.

Para a reação de *PCR* convencional foram utilizados os *primers* D72 e D75 na concentração de 0,18 μ M; dNTP a 10 μ M; 0,3 μ L de Crison *Taq* DNA Polimerase (New England BioLabs®) em 0,5 μ L de tampão 5X Crison *Taq* (New England

BioLabs®), adicionando-se 10 µL de DNA tecidual na concentração de 10 ng / µL, obtendo um volume final de reação de 25 µL.

Programa *PCR* convencional:

95 C	5 min	
95 C	45 s	5 ciclos
60 C	45 s	
68 C	45 s	
95 C	45 s	5 ciclos
58 C	45 s	
68 C	45 s	
95 C	45 s	5 ciclos
56 C	45 s	
68 C	45 s	
68 C	5 min	

Os produtos de amplificação da *PCR* (*amplicon*) foram monitorados e caracterizados por eletroforese (100 V, amperagem livre por 90 min) em gel de agarose a 1,5% corados com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10.000X in water* (UNISCIENCE) – solução 1X concentrada e em seguida visualizados em fotorevelador com ultravioleta (BioRad). O peso molecular dos produtos de *PCR* e a especificidade da reação foi avaliada pela comparação com um marcador de DNA conhecido (100 pb DNA *ladder*- NEW ENGLAND BioLabs®), também submetido a eletroforese no mesmo gel.

A reação da *Real Time-PCR* foi feita utilizando ABsolute™ QPCR SYBR® Green PCR Mix (Thermo Scientific) com os *primers* D71 (5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3') e D72 (5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3') conforme metodologia descrita por Freitas *et al.*, 2005. Estes *primers* referem-se a região 24Sα rDNA (acesso no GenBank número L19411). A reação de Real Time-PCR continha os *primers* D71 e D72 na concentração final de 0,25 µM, 6 µL de DNA da amostra, 12,5 µL de SYBR® Green e água com DNase/RNase free ou Milli-Q autoclavada para volume final de 25 µL. Como branco da reação substituímos o volume de amostra de DNA pelo mesmo volume de água.

Amostras com valores conhecidos de *T. cruzi* em tecidos (contagem pelo método de Brener e quantificação em espectrofotômetro a 260 e 280 nm, adaptado de CUMMINGS e TARLETON, 2003) foram diluídas até obter a presença de 1 a 1.10^4 *T. cruzi* por reação de *PCR* em tempo real. Estas amostras foram utilizadas como padrões para formação de uma curva analítica onde foi possível correlacionar o sinal de fluorescência emitida pela amostra com concentração conhecida, com a amostra desconhecida com o desempenho do *software* do aparelho - termociclador Mini-Opticon (Bio-Rad Laboratories, EUA). Os resultados das curvas de amplificação e dos valores do Ct (do inglês “*cycle threshold*”) obtidos foram analisados através do *software* MJOpticon Monitor 3.1 (Bio-Rad Laboratories, EUA).

A programação utilizada para a reação da *Real Time-PCR* foi uma temperatura inicial de 95 °C por 15 min, seguido de 45 ciclos com 15 s à 95 °C para desnaturação, 30 s à 60 °C para anelamento e 30 s à 72 °C para extensão, finalizando com temperatura de *melting* de 60 °C à 95 °C.

3.10. Análise estatística

Para análise dos resultados deste trabalho foram utilizados as avaliações paramétricas o teste estatístico de ANOVA e para o teste de significância da diferença entre as médias foi empregado o teste de Turkey, por meio da ferramenta computacional GraphPad Prism®, versão 4.01.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da parasitemia

A figura 1 demonstra a parasitemia dos grupos IP, SC e OR. Por ela possível observar que os grupos IP e SC um elevado número parasitêmico quando comparado com o grupo OR, que apenas demonstrou nível de parasita passível de ser quantificado pelo método de Brener em microscopia óptica (400X) a partir do 12º dia pós infecção, enquanto os grupos IP e SC apresentaram parasitemia a partir do 7º dia pós infecção.

Figura 1 - Nível parasitêmico dos grupos IP (intraperitoneal), SC (subcutâneo) e OR (oral) infectado com a cepa CL B5 de *T. cruzi*.

4.2. Determinação quantitativa de *Trypanosoma cruzi* por caracterização de β -galactosidase

Por se tratar de uma metodologia nova na quantificação parasitária tecidual, alguns ensaios foram realizados com intuito de padronizar a técnica. Para obter a absorbância ideal na leitura em espectrofotômetro, foi realizada uma curva padrão contendo amostras de tecido proveniente de um animal não contaminado (controle negativo), bem como de uma concentração conhecida de formas epimastigotas do parasita em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose* com 10 % de soro bovino fetal)

adicionadas do substrato CPRG. A leitura proveniente destas amostras permitiu observar que o comprimento de onda ideal para o procedimento descrito no projeto é de 570 nm (Figura 2). Da mesma forma, observou-se que alguns tecidos (fígado, baço e músculo esquelético) obtiveram leitura próxima ao comprimento de onda estipulado, devido a presença de alguns componentes que absorvem luz em 570 nm, constituindo assim interferentes da técnica. Desta forma, foram excluídas as absorbâncias destes tecidos no momento da leitura em microplacas de 96 poços, por meio da subtração da leitura obtida do tecido do animal infectado pelo tecido do animal controle.

Figura 2 – Espectro de absorção de tecidos provenientes de um animal não contaminado (controle negativo) e de formas epimastigotas de *T. cruzi* em meio LIT adicionadas do substrato CPRG.

Paralelamente, foram feitas curvas padrões (Figura 3) de quantidade de parasita para conhecer a absorbância mínima obtida na leitura do aparelho. Esta padronização foi realizada com diluições em série de um número máximo ($6,55 \cdot 10^6$ parasitas / mL) e mínimo ($1,31 \cdot 10^5$ parasita / mL) de parasita em meio de cultivo LIT diluído com amostras de tecidos (coração, fígado, baço, musculatura esquelética e intestino) preparados nas mesmas condições experimentais, obtidas de um animal não infectado

Figura 3 - Curva padrão da concentração de formas epimastigotas de *T. cruzi* em meio LIT por determinação da atividade da β -galactosidase em 570 nm.

A padronização da técnica enzimática foi realizada em animais infectados pela via IP, em diferentes dias pós infecção (10, 13, 15 e 21 dias), para determinação da quantidade ideal de parasita encontrado nos tecidos, correspondendo à máxima absorbância encontrada. Os resultados não apresentaram diferença significativa entre os dias analisados ($P < 0,05$), relacionado às leituras dos tecidos em estudo. Dessa forma, a retirada dos tecidos para análise foi padronizada no décimo quinto dia pós inoculação em todos os grupos (IP, SC e OR), visto que após este período houve uma acentuada mortalidade dos animais em cada grupo.

4.3. Comparação entre atividade enzimática, histológica e molecular (PCR convencional)

Tanto a atividade enzimática da β -galactosidase, a técnica histológica e a PCR convencional, mostraram-se satisfatórias sendo demonstrados seus resultados comparativamente.

Ao relacionar a atividade enzimática entre os tecidos no grupo IP (Figura 4) foi possível observar diferença significativa com $P < 0,05$ quando comparado o fígado

aos demais tecidos. Na análise histológica (Figura 5), observaram-se ninhos de forma amastigota no coração e músculo esquelético. Apenas um animal do grupo não apresentou ninho no tecido cardíaco, todavia nos demais animais foram encontrados uma média de três ninhos em cada corte histológico. No tecido muscular referente ao músculo estriado esquelético, dois dos seis animais não apresentaram ninho de forma amastigota, porém nos demais a quantidade de ninhos presentes variou de um a cinco, no fragmento analisado.

Por meio da técnica de *PCR* e observação dos resultados em eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 6), detectou-se a presença de DNA de *T. cruzi* em todos os tecidos de animais infectados comprovada a infecção tecidual e, nos grupos controle, não foram observadas bandas referentes à infecção pelo parasita.

Figura 4 - Comparativo da atividade enzimática em 570 nm entre os tecidos estudados no grupo inoculado via IP.

* $P < 0,05$

Figura 5: Cortes histológicos de tecidos de animais do grupo controle, não infectado e grupo inoculado pela via IP, observados em microscópio óptico no aumento de 400X. **A)** Tecido cardíaco do animal pertencente ao grupo controle; **B)** Tecido cardíaco de animal infectado contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta); **C)** Tecido muscular do animal pertencente ao grupo controle; **D)** Tecido muscular contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta).

Figura 6 – Fotografia de gel de agarose 1,5% corado com *GelRed* para detecção de DNA de *T. cruzi* por meio da visualização de bandas marcadas na posição de 125pb dos tecidos estudados (coração, fígado, baço, intestino e musculatura esquelética). Em cada gel há o marcador de peso molecular de 100pb juntamente com os grupos controle de cada tecido. (IP – intraperitoneal; CT – controle; C – coração, F – fígado; B – baço; I – intestino; M – musculatura esquelética).

Na figura 7 o grupo SC, para a atividade enzimática, não apresentou diferença estatisticamente significativa ao comparar os tecidos em análise, mesmo observando uma variação entre o fígado e os demais tecidos na figura.

Já nos cortes histológicos (Figura 8), o grupo SC mostrou-se com maior número de ninhos comparados às outras vias de inoculação. Foram observados ninhos de forma amastigota nos tecidos cardíacos (com uma média de quatro ninhos por animal, nos fragmentos analisados), hepático, esplênico e muscular, sendo encontrados no fígado e baço de um a dois ninhos. Em apenas um animal houve a presença de um ninho no tecido entérico, entretanto, esta forma parasitária estava presente na musculatura envolvendo o tecido.

Pela visualização em gel de agarose 1,5% (Figura 9) após executar a técnica da *PCR* convencional, em todos os tecidos foram observadas bandas referentes ao DNA de *T. cruzi*.

Figura 7 - Comparativo da atividade enzimática em 570 nm entre os tecidos estudados no grupo inoculado via SC.

A

B

C

D

E

F

Figura 8 - Cortes histológicos de tecidos de animais do grupo controle, não infectado e grupo inoculado pela via SC, observados em microscópio óptico no aumento de 400X. **A)** Tecido cardíaco do animal pertencente ao grupo controle; **B)** Tecido cardíaco de animal infectado contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta); **C)** Tecido hepático do animal pertencente ao grupo controle; **D)** Tecido hepático contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta); **E)** Tecido esplênico do animal pertencente ao grupo controle; **F)** Tecido esplênico contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta); **G)** Tecido entérico do animal pertencente ao grupo controle; **H)** Tecido entérico contendo ninho de forma amastigota, entretanto na musculatura esquelética que envolve tecido (representado pela seta); **I)** Tecido muscular do animal pertencente ao grupo controle; **J)** Tecido muscular contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta).

Figura 9 – Fotografia de gel de agarose 1,5% corado com *GelRed* para detecção de DNA de *T. cruzi* por meio da visualização de bandas marcadas na posição de 125pb dos tecidos estudados (coração, fígado, baço, intestino e musculatura esquelética). Em cada gel há o marcador de peso molecular de 100pb juntamente com os grupos controle de cada tecido. (SC – subcutâneo; CT – controle; C – coração, F – fígado; B – baço; I – intestino; M – musculatura esquelética).

A figura 10, representando a atividade de β -galactosidase, permite observar que não houve diferença estatística significativa entre os tecidos no grupo inoculado via oral, apesar de ser possível visualizar uma variação na atividade enzimática entre o intestino e os demais tecidos estudados.

Na análise histológica (Figura 11), o grupo inoculado pela via OR apresentou poucas formas amastigostas nos tecidos. Mesmo no coração, onde há prevailecimento de ninhos quando comparado aos demais grupos, apenas dois animais apresentaram ninhos do parasita. No fígado foram observados três animais com presença de ninhos, enquanto o baço se mostrou como sendo o tecido com maior número de ninhos de forma amastigota no grupo em questão (figura 11 F mostra três ninhos no mesmo corte histológico). A musculatura esquelética, assim como o coração, não se mostrou parasitada, sendo que apenas foi encontrado ninho em um animal.

Na avaliação molecular pela *PCR* convencional, em um animal não foi observada banda representativa quando visualizado em gel de agarose 1,5% (Figura 12), entretanto, nos demais tecidos as bandas referentes ao DNA de *T. cruzi* estavam presentes.

Figura 10 - Comparativo da atividade enzimática em 570 nm entre os tecidos estudados no grupo inoculado via OR.

A

B

C

D

Figura 11 - Cortes histológicos de tecidos de animais do grupo controle, não infectado e grupo inoculado pela via OR, observados em microscópio óptico no aumento de 400X. **A)** Tecido cardíaco do animal pertencente ao grupo controle; **B)** Tecido cardíaco de animal infectado contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta); **C)** Tecido hepático do animal pertencente ao grupo controle; **D)** Tecido hepático contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta); **E)** Tecido esplênico do animal pertencente ao grupo controle; **F)** Tecido esplênico contendo 3 ninhos de forma amastigota (representado pela seta); **G)** Tecido muscular do animal pertencente ao grupo controle; **H)** Tecido muscular contendo ninho de forma amastigota (representado pela seta).

Figura 12 – Fotografia de gel de agarose 1,5% corado com *GelRed* para detecção de DNA de *T. cruzi* por meio da visualização de bandas marcadas na posição de 125pb dos tecidos estudados (coração, fígado, baço, intestino e musculatura esquelética). Em cada gel há o marcador de peso molecular de 100pb juntamente com os grupos controle de cada tecido. (OR – oral; CT – controle; C – coração, F – fígado; B – baço; I – intestino; M – musculatura esquelética).

Na tabela 1 é possível observar, esquematicamente, o grau de parasitismo tecidual em cada grupo na técnica histológica, comparando-os.

TECIDO	GRUPO		
	IP	SC	OR
Coração	++	+++	+
Fígado	-	++	+
Baço	-	+	++
Intestino	-	-*	-
Músculo	+	++	-

Tabela 1 – Representativo da quantidade de ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* (por lâmina) encontrados nos tecidos em cada grupo (IP – intraperitoneal, SC – subcutâneo, OR – oral), sendo representado:

1 ninho = +

2-3 ninhos = ++

≥4 ninhos = +++

*Encontrado ninho de forma amastigota de *T. cruzi* na musculatura envolvendo tecido entérico.

Ao comparar as vias de inoculação em cada tecido avaliado no presente trabalho (Figura 13), o coração apresentou diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre as vias de inoculação oral e subcutânea, apresentando maior atividade enzimática na primeira, o que correlaciona uma maior quantidade formas do parasito. No tecido hepático, não houve alteração da atividade enzimática ao comparar as diferentes vias de inoculação e consequente ausência de diferença estatística, podendo observar na figura 13-B os valores de absorbância relativa semelhantes. Apesar das colunas referentes às vias de infecção no baço mostrar atividade enzimática relativa nos grupos IP e OR comparados ao SC (Figura 13-C), pela análise estatística, não houve diferença estatística significativa. O mesmo ocorreu no intestino, não havendo diferença estatística relevante, apesar de ser possível visualizar na figura 13-D variações entre as vias oral, subcutânea e intraperitoneal, sendo a primeira com leitura relativamente mais alta comparada às demais. Por fim, na musculatura esquelética não houve variações nas vias de infecção, mesmo sendo observado um aumento crescente de atividade enzimática nas vias em estudo (Figura 13-E).

Todos os valores obtidos da atividade enzimática a partir da leitura em espectrofotômetro à 570 nm, em triplicata, encontram-se no anexo 1.

Figura 13 - Comparativo entre as diferentes vias de inoculação (IP - intraperitoneal, SC - subcutânea e OR - oral) da atividade enzimática em 570 nm nos tecidos estudados. **A)** Coração; **B)** Fígado; **C)** Baço; **D)** Intestino; **E)** Musculatura esquelética.

* $P < 0,05$

4.4. Avaliação quantitativa tecidual de *T. cruzi* por meio de *Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time-PCR)*

Apesar da especificidade dos *primers* utilizados, não foi possível realizar a padronização da técnica de *Real Time-PCR*. A metodologia foi desenvolvida com diferentes kits de SYBR® Green e em diferentes aparelhos, entretanto o aparelho detectou fluorescência na amostra considerada como branco, ou seja, onde foi colocado apenas o kit e água. Cada corrida no aparelho apresentou uma característica única e não reproduzível assim não sendo possível utilizar tal técnica como resultado satisfatório no projeto. A figura 14 é representativa de uma das análises realizadas no uso da *Real Time-PCR*.

Figura 14: Resultados das análises para determinação do limite de detecção do método da *PCR* em tempo real para quantificação de *T. cruzi* utilizando os *primers* D71 e D72 e diluições de $2,2 \times 10^{11}$ parasitas por reação de *PCR*, controle positivo, controle negativo e branco, sendo obtidas: **A)** Curva de amplificação de *PCR* em tempo real; **B)** Curva de linearidade do método de *PCR* em tempo real mostrando a equação da reta e o coeficiente de correlação; **C)** Curva de dissociação (“*melting curve*”).

Variações de temperatura de anelamento, concentração de *primers*, uso de outros desenhos de *primers* para observar especificidade e qualidade do aparelho, uso de DNase para retirar possíveis contaminações dos *primers*, variações no tempo de corrida e de todos os componentes pertinentes à reação, foram testados e apresentam-se no anexo 3, onde é possível observar as curvas obtidas das diversas tentativas de padronização da técnica.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

T. cruzi e conseqüentemente a Doença de Chagas, são ainda muito estudados por acometer um número considerável de indivíduos, principalmente nas Américas com cerca de 8 a 9 milhões de pessoas (WHO, 2002; SENIOR, 2007; MORRIS, 2009). Esta enfermidade gera um grande gasto público devido a aquisição precoce da aposentadoria por trabalhadores, sendo estimados mais de 70 mil indivíduos ausentando-se de seu emprego no Brasil (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007b). Segundo HORTEZ *et al.* (2008), a Doença de Chagas é considerada como a de maior prevalência na população pobre da América Latina. Apesar do grande controle epidemiológico nas regiões endêmicas da doença, ainda são encontrados casos de infecção pela via vetorial e uma forma já existente na literatura desde o início do século, a transmissão via oral (COURA *et al.*, 2002) que se mostra como uma forma de contaminação crescente e grave no país (YOSHIDA, 2009).

Deste modo, muitas pesquisas estão voltadas no diagnóstico e tratamento da patologia baseadas nas características epidemiológicas, patológicas e comportamentais das inúmeras cepas existentes em cada hospedeiro alterando seu comportamento patogênico de acordo com as diferentes vias de transmissão, região geográfica e faixa etária da população em risco (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007a).

O uso de metodologias já conhecidas para identificação e quantificação parasitária da Doença de Chagas, como a parasitemia e a histologia, são sempre importantes como forma de referência às novas e sofisticadas técnicas como a biologia molecular.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar que as vias de inoculação e as técnicas utilizadas, enzimática colorimétrica e *PCR* convencional, mostraram-se satisfatórias.

Com relação à curva de parasitemia, observou-se aumento significativo do número de formas tripomastigotas sanguíneas por volta do décimo terceiro dia atingindo valores ascendentes até o décimo quinto dia, o qual se apresentou melhor período para que fosse realizado o experimento, pois nos dias subsequentes, os animais não resistiram à infecção parasitária (resultados não apresentados).

O resultado da parasitemia está de acordo com os visualizados na literatura, como observado por Le-Senne *et al.* (2002), onde os pesquisadores ao estudarem

as características biológicas do clone CL B5, observaram *in vitro* o crescimento dos parasitas, atingindo o máximo de 14.10^5 parasitas / mL no 12º dia de incubação. Já *in vivo*, esta cepa apresenta baixa parasitemia mesmo em animais infectados com 10^5 tripomastigota sanguíneo / mL (LE-SENNE *et al.*, 2002).

Apesar da infecção pela via intraperitoneal ser mais agressiva, os resultados obtidos mostraram maior parasitismo para o grupo infectado pela via SC. A via de inoculação oral mostrou-se de acordo com o esperado na literatura, ou seja, baixa parasitemia (CAMANDAROBÁ *et al.*, 2002).

Da mesma forma, o grupo inoculado via SC obteve maior número de ninhos de amastigotas, principalmente no coração e na musculatura esquelética da pata traseira do animal. O achado predominante de ninhos nestas regiões comprovou o tropismo da cepa como descrito por Degraeve, 2008. Porém, o grupo inoculado pela via oral apresentou grande quantidade de ninhos nos tecidos esplênico e hepático.

O histotropismo da cepa CL Brener foi estudado por Melo e Brener (1978), onde notaram prevalência de formas amastigotas nos tecidos musculares, tanto na musculatura lisa quanto cardíaca. Algumas observações foram apresentadas pelos autores sobre o tropismo hepático e esplênico, relacionando a forma da cepa com receptores de membrana dos tecidos infectados, corroborado por Hall *et al.* (2000) que notaram a não indução de NF- κ B (fator de transcrição nuclear envolvido na ativação de linfócitos T e citocinas) por células musculares, podendo conferir o grande tropismo pela musculatura cardíaca.

A infecção via oral ocorre por meio da entrada do parasita na mucosa estomacal pela grande interação de glicoproteínas de adesão presente na membrana do parasita (gp82) com a mucosa estomacal (CORTEZ *et al.*, 2003; YOSHIDA, 2009; STACHICINI *et al.*, 2010). Em decorrência à grande variabilidade genética existente no parasita e as interações deste com o hospedeiro, uma cepa pode variar sua afinidade tissular de acordo com as condições apresentadas pelo hospedeiro, sendo este o modelo histotrópico-clonal (MACEDO *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2004). Assim, a entrada do parasita pela mucosa estomacal pode torná-lo mais invasivo ao organismo (CORTEZ *et al.*, 2006; COVARRUBIAS *et al.*, 2007; YOSHIDA, 2008), o que pode ter alterado seu tropismo da musculatura para o tecido hepático e esplênico, no presente estudo.

Outro fator que pode ter influenciado o encontro de ninhos de forma amastigota no fígado foi o fato da circulação porta-hepática ser uma das principais

existentes na região gástrica, permitindo a migração dos parasitas para o fígado e, consequente, formação de ninhos no local.

O uso da técnica histológica apresenta algumas dificuldades como a necessidade de um grande número de cortes seriados, além do fato de ser exaustiva (BARBOSA, 1985). Entretanto, a determinação do parasitismo por técnicas histológicas é uma ferramenta importante para observar alterações morfológicas tais como infiltrado inflamatório, alterações na arquitetura anatômica do tecido infectado, podendo ainda ser associado a outras análises como a esterológica observada no estudo de Oliveira *et al.* (2008) onde foi identificadas alterações estruturais em células do miocárdio.

Apesar das técnicas histopatológicas se tratarem de metodologias simples, no caso da Doença de Chagas, é uma ferramenta que auxilia na compreensão de mecanismos de infecção parasitária, nas patologias e alterações morfológicas por parte do hospedeiro, assim como fazer um estudo biológico de cepas (MELO e BRENER, 1978; ADAD *et al.*, 1991; CAMANDAROBA *et al.*, 2002; RAGONHA *et al.*, 2006).

A técnica enzimática por meio da avaliação da atividade da enzima β -galactosidase mostrou-se satisfatória. Foi possível a observação de variação na coloração dos tecidos em estudo quando estes entravam em contato com o substrato, confirmando a sensibilidade da reação colorimétrica.

Observando os gráficos referentes à atividade enzimática, alguns dos resultados não foram significativos estatisticamente pelos valores das leituras estarem muito abaixo do limite inferior de detecção no aparelho. Um fator que pode ter dificultado a quantificação enzimática, foi o tamanho dos fragmentos de tecidos utilizados na técnica experimental, tendo em vista que se tratou de apenas um terço de cada órgão para as análises descritas no presente trabalho. Os dados obtidos para o baço estão condizentes entre a leitura da expressão enzimática no grupo inoculado via oral com o número de ninhos encontrados na histologia.

De acordo com o protocolo GenLantis[®] (<http://www.genlantis.com>), o uso do substrato CPRG para quantificar a expressão da enzima β -galactosidase em organismos que apresentam o vetor para o gene *LacZ* mostra-se eficiente e de rápida execução, visto que a ação da enzima pode ser facilmente medida após hidrólise catalítica do substrato tendo como resultado final a visualização de coloração vermelha. MacGregor *et al.* (1990) descreveram diversas vantagens no

uso de cepas modificadas geneticamente, principalmente para analisar expressão e regulação de um determinado gene no organismo de interesse pelo uso de genes repórteres, os quais devem manter o organismo com as mesmas características biológicas anteriores à fusão e ser detectado em baixas concentrações.

No mesmo relato, MacGregor *et al.* (1990) descrevem o uso do gene *LacZ* de *E. coli* como gene repórter e quatro ensaios bioquímicos para detectar a expressão da enzima β -galactosidase.

O uso de cepas geneticamente modificadas para elucidar características biológicas de micro-organismos é uma ferramenta vantajosa na parasitologia. Kelleher e Tomley (1998), com intuito de compreender as diferentes fases de transformação do parasita *Eimeria tenella* (protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa) devido sua dificuldade no cultivo *in vitro*, inseriram o gene *LacZ* de *E. coli*. O ensaio apresentou resultados parciais ao proposto por observar apenas algumas fases do ciclo, sendo que a expressão do gene *LacZ* pode ter variado de acordo com a fase do ciclo biológico do parasita.

O gênero *Plasmodium* que apresenta um complexo ciclo de vida, semelhante ao encontrado *Eimeria*, foi estudado inserindo o gene *LacZ* para determinar suas fases do ciclo biológico e alterações encontradas tanto no vetor quanto no hospedeiro (ENGELMANN *et al.*, 2006).

Dessa forma, diversos autores testaram a viabilidade do desenvolvimento de cepas usando a β -galactosidase como uma enzima repórter para estudo de diferentes parasitas, como é o caso de *Toxoplasma gondii* (SEEBER e BOOTHROYD, 1996), *Leishmania amazonensis* (OKUNO *et al.*, 2003), *Trypanosoma cruzi* (BUCKNER *et al.*, 1996; VEGA, *et al.*, 2005).

BUCKNER *et al.* (1998), demonstraram o parasitismo e a detecção em tecido da cepa MHOM/CH/00/Tulahuen C2 de *T. cruzi* modificada geneticamente para expressar a β -galactosidase na infecção durante sua fase aguda, com animais infectados por um período de três semanas. Os autores citam a relação entre o parasitismo presente no tecido durante a fase aguda e achados patológicos na fase crônica da doença, correlacionando com a reação inflamatória local.

Diversas técnicas são empregadas na rotina laboratorial para identificação e quantificação parasitária, mas há uma grande dificuldade com relação ao custo, sensibilidade da técnica e tempo de execução (CANCRINI e IORI, 2004). O simples uso de microscopia é válido para maioria dos diagnósticos em parasitologia.

Entretanto, no caso da Doença de Chagas, a detecção sanguínea do parasita pode ser realizada apenas na fase aguda da doença que tem curta duração e muitas vezes o paciente mostra-se assintomático, impedindo esta forma de diagnóstico. Técnicas sorológicas são mais indicadas na confirmação da doença, principalmente em pacientes que se encontram na fase crônica.

Diversos trabalhos mostram a detecção e evolução da doença por meio de anticorpos na fase aguda, crônica e assintomática da doença (PRIMAVERA *et al.*, 1990; ZAURA e BORGES-PEREIRA, 2001). No entanto, a pesquisa sorológica impossibilita o conhecimento do parasitismo tecidual.

O uso da técnica enzimática colorimétrica pela caracterização da β -galactosidase tem algumas vantagens relacionadas ao tempo e facilidade na sua execução, como em seu custo, sendo de baixo valor quando comparada com metodologias mais apuradas, como técnicas imunológicas e de biologia molecular, a qual traz inúmeras vantagens, relacionadas à sensibilidade e especificidade, entretanto sua padronização e execução requer grandes investimentos.

A reação por *PCR* proporcionou um grande avanço na identificação parasitária como forma de diagnóstico da doença, visto que técnicas sorológicas como RIF (Reação de Imunofluorescência), ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), fixação de complemento, dentre outras, podem ocasionar falsos resultados por meio de reações cruzadas (GOMES, 1997).

Estes erros podem comprometer bancos de sangue, por exemplo, onde a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002) preconiza ao menos três exames sorológicos antes de liberar resultado positivo para a Doença de Chagas. Assim, com a *PCR* é possível obter resultados mais sensíveis e específicos nos diagnósticos e melhoria nas pesquisas experimentais (GOMES, 1997), onde Kirchhoff *et al.* (1996) compara a *PCR* com exame microscópico de amostras de sangue contaminado com *T. cruzi* (exame direto à fresco), obtendo alta sensibilidade, porém baixa especificidade.

Vários estudos estão voltados no uso de técnicas moleculares (*PCR*) para acompanhar o paciente ao longo de seu tratamento (BRITTO, 2009; SOLARI *et al.*, 2001), mostrando ser mais sensível às técnicas sorológicas e o xenodiagnóstico, que podem apresentar falsos resultados. O xenodiagnóstico é um exame indireto usado para detecção do parasita onde o ciclo biológico de *T. cruzi* é simulado em laboratório, utilizando ninfas de triatomíneos não infectadas (GELLER *et al.*, 2007).

As ninfas são colocadas em contato com o braço do paciente para realizarem o repasto sanguíneo e, após 60 dias, verifica-se o resultado do exame por compressão da região abdominal do inseto e pesquisa de formas tripomastigostas metacíclicas no conteúdo intestinal (GELLER *et al.*, 2007). Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda (2003) realizaram uma revisão comparando hemocultura, xenodiagnóstico e *PCR*, mostrando a eficácia e dificuldades de cada técnica, onde as duas primeiras citadas são de grande valor diagnóstico em algumas situações e limitadas quando se pensa em banco de sangue.

Avanços nas técnicas moleculares proporcionaram o monitoramento em tempo real da *PCR*, a *Real Time-PCR*, tecnologia altamente sofisticada que permite a observação da amplificação dos produtos da *PCR* no momento em que são formados (FARAH, 2007). Ela usa a detecção de sinal fluorescente que pode ser obtido de duas formas distintas, pelo uso de um corante o SYBR[®] Green o qual se liga a fita dupla de DNA, ou por meio de sondas marcadas com corante fluorescente, o TaqMan[®] (FARAH, 2007).

Dentre suas aplicações na parasitologia, a técnica é usada para quantificação do DNA e RNA parasitário em ensaios *in vivo* (BELL e RANFORD-CARTWRIGHT, 2002), expressão gênica (NISH *et al.*, 2009) e futuramente poderá ser útil no diagnóstico laboratorial.

Como forma de aprimorar as pesquisas e possivelmente uso como diagnóstico, a *Real Time-PCR* utiliza alta tecnologia para detecção e quantificação parasitária obtendo resultados confiáveis com menor índice de erros e contaminações das amostras (PIRON *et al.*, 2007). Por outro lado, esta técnica requer alguns parâmetros essenciais para sua execução e confiabilidade, relacionados a problemas encontrados na padronização da técnica (operador, espaço físico, material adequado; uso de controles bem definidos e pré estabelecidos) (KLEIN, 2002; HUGGETT *et al.*, 2000) e na qualidade dos *primers* a serem utilizados. O desenho dos *primers* deve ser específico para o objetivo a ser analisado podendo ser desenhado com auxílio de *softwares* adequados que permitam obter parâmetros fundamentais (especificidade e eficiência) (DIEFFENBACH *et al.*, 1993). Programas como o Primer3 possibilitam avaliar a probabilidade de formação de dímeros de *primers* e *hairpin*, bem como analisar a temperatura de *melting* ideal para o bom funcionamento da sequência escolhida (VALLONE e BUTLER, 2004).

A técnica de *Real Time-PCR*, como já citada, é extremamente válida e pode se tornar uma ferramenta muito útil no estudo da Doença de Chagas. Entretanto, devido a diversos interferentes, não foi possível realizar sua padronização para quantificação parasitária em ensaios biológicos *in vivo*.

Por se tratar de uma metodologia muito sensível, tanto na forma de analisar os resultados quanto sua execução, a *Real Time-PCR* requer um tempo longo para sua padronização. Diversas tentativas foram realizadas para se obter os resultados e análises desejadas no presente trabalho, contudo todas se mostraram insatisfatória.

Primeiramente, foram realizados testes avaliando kits para execução da *PCR* que se mostrassem compatíveis com a análise desejada, quantificação absoluta dos parasitas no tecido de animais infectados com o clone CL B5 e sua reprodutibilidade. Um dos kits se mostrou viável e foi realizada uma reação com diversas amostras tanto de tecido dos animais dos grupos experimentais, quanto de DNA extraído do clone obtido de meio de cultivo (LIT), com intuito de realizar uma curva de calibração obtendo-se, neste caso, resultado satisfatório. No entanto, todas as subseqüentes reações realizadas apresentaram falhas na execução devido a presença de sinal de fluorescência no branco, ou seja, controle realizado contendo apenas água, o kit para a reação e os *primers* D71 e D72. Segundo o gráfico da temperatura de *melting*, era possível supor que a leitura estava sendo ocasionada ou por contaminação de algum dos componentes da reação ou por formação de dímeros dos *primers*. Todos os possíveis interferentes foram avaliados e substituídos (água, pipetas, ponteiras, local do preparo da reação, máquinas de fabricantes distintos – BioRad e Applied Biosystems, reagente SYBR® Green, novos *primers* da mesma sequência, porém de outro fabricante). Sendo assim, uma das possibilidades seria a formação de dímeros.

Dímeros podem ser formados por diversos motivos, como altas concentrações de *primers*, o que permite erros e falsos resultados na reação de *PCR* e alguns mecanismos como a alteração da temperatura de anelamento podem auxiliar na sua eliminação (D'AQUILA *et al.*, 1991; BROWNIE, *et al.*, 1997).

O uso do SYBR® Green apresenta algumas características favoráveis como baixo custo e aplicabilidade em diversas amostras, no entanto ao se ligar a fita dupla do DNA, o fluoróforo pode ligar-se a amplificações inespecíficas e dímeros de *primers* formados na reação (BELL e RANFORD-CARTWRIGHT, 2002; NOVAIS *et*

al., 2004). Programas como o IDT (*Integrated DNA Technology* - <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) permitem fazer uma análise dos *primers* desenhados com relação a formação de homo-dímeros (formação de dímero) e hetero-dímeros. Os *primers* utilizados na reação de *PCR* convencional foram analisados e a formação desses dímeros foi descartada (segundo análise: http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer - Anexo 2).

A técnica de *Real Time-PCR* foi desenvolvida de acordo com adaptações do trabalho de Freitas *et al.* (2005), entretanto não foram obtidos resultados de acordo com o esperado. O uso da técnica de *Real Time-PCR* para quantificação parasitária tecidual já foi descrito na literatura com outros grupos de parasitas (JAUREGUI *et al.*, 2001; MORRISON, 1999), assim como com *T. cruzi* tanto em tecido (WILLIAMS *et al.*, 2009) quanto na quantificação parasitária no sangue (PIRON *et al.*, 2007).

Além da existência de interferente na reação de *Real Time-PCR* observado pela presença de emissão de fluorescência no branco, algumas leituras realizadas com amostras dos tecidos estudados em cada via de inoculação, não foram visualizadas amplificações do material na *Real Time-PCR*, visto que todas as amostras se mostraram positivas quando realizada na *PCR* convencional. Este resultado pode ser devido a presença de inibidores da *PCR*.

Rosen *et al.*, 1992, já descreviam a presença de inibidores da *PCR* convencional como gordura e proteínas, encontrados em diversos alimentos e relataram formas de se minimizar a presença desses inibidores durante todo o procedimento da técnica molecular. Apesar da existência de avançadas técnicas para realização de pesquisa na área molecular e seu aprimoramento, ainda há relatos na literatura da existência de interferentes na reação de *PCR* tanto convencional quanto quantitativo (WILSON, 1997; GUESCINI *et al.*, 2008).

Desse modo, o uso da biologia molecular, mais especificamente a *Real Time-PCR*, na área da saúde é inovador e tem resultados satisfatórios tanto na pesquisa quanto na rotina laboratorial. Contudo, no presente trabalho não foi possível realizar as padronizações sugeridas sendo necessário estudo mais aprofundado para avaliar todos os parâmetros pertinentes à execução da técnica. No entanto, a análise enzimática, histológica e padronização da *PCR* convencional, mostraram-se viáveis e reprodutíveis.

A técnica de quantificação tecidual usando o gene *LacZ* como repórter em *T. cruzi* é oportuna, mas são necessárias padronizações utilizando porções maiores de tecidos para avaliar a atividade enzimática em todo órgão, bem como empregar uma metodologia semelhante como ensaios histoquímicos usando a X-Gal (substrato usado para detecção da atividade da β -galactosidase *in situ* que ao ser hidrolisado, produz um corante índigo) (MACGREGOR *et al.*, 1990).

Analisando exclusivamente este trabalho, o método poderia ser usado para quantificar parasitas diretamente no tecido, permitindo a comparação do ensaio colorimétrico ao número de formas amastigotas encontradas na histologia, com intuito de corroborar a viabilidade da tecnologia. Assim, o uso do clone CL B5 pode auxiliar muito em estudos biológicos do parasita como intensidade de infecção e resposta ao uso de medicamentos anti-*T. cruzi* quantificando o nível de parasitismo tecidual.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados aqui apresentados, são obtidas as seguintes conclusões:

- As técnicas enzimática colorimétrica, histológica e molecular (*PCR* convencional) apresentaram resultados concordantes e confiáveis quando comparadas entre si e nas vias de inoculação usadas.
- A detecção da enzima β -galactosidase utilizada no estudo, demonstra ser uma promissora ferramenta para estudo biológico experimental da Doença de Chagas, sendo eficiente na quantificação parasitária por apresentar vantagens como baixo custo e rapidez na execução, ao comparar às demais técnicas citadas no trabalho.
- As metodologias moleculares se tornarão ferramentas proveitosas após maiores padronizações para facilitar seu uso rotineiro no laboratório.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAD, S.; ANDRADE, D. C. S.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Contribuição do estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 33, n. 6, p.443-450, 1991.

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R. S.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J.; MACEDO A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 25, n. 2., p. 163-172, 1999.

ANDRADE, S. G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strain in some types. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.18, n. 2, p.140-141, 1976.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J.B. Biodemas and zymdemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 30, p. 27-34, 1997.

ARAS, R.; GOMES, I.; VEIGA, M.; MELO, A. Transmissão vetorial da doença de Chagas em Mulungu do Morro, nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, p. 359-363, 2003.

BARBOSA, A. J. A. Método imunohistoquímico para a identificação do *Trypanosoma cruzi* em cortes histológicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 27, n. 6, p. 293-297, 1985.

BELL, A. S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. Real-time quantitative PCR in parasitology. **TRENDS in Parasitology**. v.18, n.8, p. 337-342, ago., 2002.

BOGLIOLO, A.R.; LAURIA-PIRES, L.; GIBSON, W. C. Polymorphism in *Trypanosoma cruzi*: evidences of genetic recombination. **Acta Tropica**. v. 61, n. 1, p. 31-40, 1996.

BRENER, Z. Therapeutic activity an criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 4, p. 389-96, 1962.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 5, p. 220-224, set./out. 1963.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**. v.27, p.347-382, 1973.

BRENER, Z. O parasita e as relações hospedeiro-parasita. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. ***Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1979, p.1-41.

BRENER, Z. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western Hemisphere. **Pharmacological Therapy**. v. 7, p. 71-90, 1979.

BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assay to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.104, n.1, p.122-135, mar./jun.,1909.

BROWNIE, J.; SHAWCROSS, S.; THEAKER, J.; WHITCOMBE, D.; FERRIE, R.; NEWTON, C.; LITTLE, S. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 25, n. 16, p. 3235–3241, mai./jun., 1997.

BUCKNER, F. S; VERLINDE, C. L; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996.

BUCKNER, F. S; WILSON, A. J.; VAN VOORHIS, W. C. Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissue of infected mice by using histochemical stain for β -galactosidase. **Infection and Immunity**. v. 67, n.1, p.403-409, 1998.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* Invasion. **Cellular Microbiology**. v.4, p.701–711, 2002.

CHAGAS, C. “Nova tripanozomíaze humana”. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.1, n.2, p.9-80, 1909. Reimpresso.

CAMANDAROBA, E. L. P.; PINHEIRO LIMA, C. M.; ANDRADE, S. Oral transmission of Chagas’ disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 44, n. 2, p. 97-103, 2002.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 6, n. 3, p. 93-100, mai./jun., 1964.

CANCRINI, G.; IORI, A. Traditional and innovative diagnostic tools: when and why they should be applied. **Parasitologia**. v. 46, n. 1-2, p. 173-176, 2004.

CARASCO, H. J.; FRAME, I.A.; VALENTE, A.S.; MILES, M.A. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 54, n. 4, p. 418-424, 1996.

CAVALCANTI, L. P. G.; ROLIM, D. B.; NETO, R. J. P.; VILAR, D. C. L. F.; NOGUEIRA, J. O. L.; POMPEU, M. M. L.; TEIXEIRA, M. J.; SOUSA, A. Q. Microepidemia de doença de Chagas aguda por transmissão oral no Ceará. **Caderno de Saúde Coletiva**. v. 17, n. 4, p. 911-921, 2009.

CORTEZ, M.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; ATAYDE, V. D.; YOSHIDA, N. Infection by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms Deficient in gp82 but Expressing a Related Surface Molecule, gp30. **Infection and Immunity**. v. 7, n. 11, p. 6184-6191, ago./nov., 2003.

CORTEZ, M.; SILVA, M. R.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; SASSO, G. R. S.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. **Microbes and infection**. v. 8, n. 1, p. 36-44, jan., 2006.

COURA, J. R.; ABREU, L. L.; WILLCOX, H. P. F.; PETANA, W. Estudo comparativo controlado com emprego de benzonidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da Doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. Avaliação preliminar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 30, n. 2, 1997.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A. S.; MILES, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **TRENDS in Parasitology**. v. 18, n. 4, p. 171-176, abr., 2002.

COVARRUBIAS, C.; CORTEZ, M.; FERREIRA, D.; YOSHIDA, N. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. **International Journal of Parasitology**. v. 37, n. 14, p. 1609-1616, dez., 2007.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 129, p. 53-59, jan./mar. 2003.

D'AQUILA, R. T.; BECHTEL, L. J.; VIDELER, J. A.; ERON, J. J.; GORCZYCA, P.; KAPLAN, J. C. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification Heating. **Nucleic Acids Research**. v. 19, n. 13, p. 3749, abr., 1991.

DEANE, M.P. Significance of polymorphism in *Trypanosoma cruzi*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS, Rio de Janeiro, 1979. **Anais/Abstracts**, Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, p.A6-A7, 1979.

DEGRAVE, W. O genoma. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acesso em: 21 jan. 2008.

DIAS, E.; FREITAS FILHO, L. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 38, p. 427-436, 1945.

DIAS, J. C. P. Ecological Aspects of The Vectorial Control of Chagas' Disease in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 10, n. 2, p. 352-358, 1994.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas, ambiente, participação e Estado. **Caderno de Saúde Pública**. v. 17, p. 165-169, 2001.

DIAS, J. C. P. O tratamento específico da Doença de Chagas. 10^a Conferência Nacional de Saúde, 1999. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/cns>>. Acesso em: 15 dez. 2008.

DIEFFENBACH, C. W.; LOWE, T. M.; DVEKSLER, G. S. General concepts for PCR primer design. **Genome Research**. v. 3, n. 3, p. 30-37, dez., 1993.

DNDi - *Drugs for Neglected Disease initiative*. Estratégia da DNDi – Chagas. Disponível em: <<http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas/estrategia-da-dndi.html>>. Acesso em: 18 abr. 2010.

ENGELMANNA, S.; SINNISB, P.; MATUSCHEWSKI, KAI. Transgenic *Plasmodium berghei* sporozoites expressing β -galactosidase for quantification of sporozoite transmission. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 146, n. 1, p. 30–37, mar., 2006.

FARAH, S. B. Métodos de análise dos ácidos nucléicos. **DNA: Segredos e Mistérios**. São Paulo: Sarvier, 2007. 2 ed., p. 124-127.

FERNANDES, O.; SOUTO, R.P.; CASTRO, J.A.; PEREIRA, J.B.; FERNANDES, N.C.; JUNQUEIRA, A.C.; NAIFF, R.D.; BARRETT, T.V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 58, p. 807-811, 1998.

FREITAS, J. M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **International Journal for Parasitology**. v.35, n.4, p.411-7 2005.

FOWLER, A. V.; ZABIN, I. The Amino Acid Sequence of β -Galactosidase I. Isolation and composition of tryptic peptides. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 245, n. 19, p. 5032-5041. out., 1970.

Fundação Nacional de Saúde – FUNASA. Saneamento básico controla Doença de Chagas, 2003. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em: 10 abr. 2010.

FURLANETO, L. **Transformação genética de *Trypanosoma cruzi* mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. 2006. Dissertação de doutorado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GELLER, M.; SUCHMACHER, M.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CORRÊA, A. D. diagnóstico laboratorial. In: SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CORRÊA, A. D.; GELLER, M. **Moléstia de Chagas**. Rio de Janeiro: Rubio, 2007. Ed. 2, p. 93-95.

GENLANTIS. A DIVISION OF GENE THERAPY SYSTEM, INC. Enhanced β -Galactosidase Assay Kit (CPRG). Disponível em: <<http://www.genlantis.com/objects/catalog/Product/extras/A10100K.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2010.

GOMES, Y. M. PCR and sero-diagnosis of chronic Chagas' Disease. **Biochemistry and Biotechnology**. v. 66, p.107-119, 1997.

GUESCINI, M.; SISTI, D.; ROCCHI, M. B.; STOCCHI, L.; STOCCHI, V. A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition. **BMC Bioinformatics**. v. 326, n. 9, p. 1-12, abr./jul., 2008.

HALL, B. S.; TAM, W.; SEN, R.; PEREIRA, M. E. A. Cell-specific Activation of Nuclear Factor-kB by the Parasite *Trypanosoma cruzi* Promotes Resistance to Intracellular Infection. **Molecular Biology of the Cell**. v. 11, p. 153–160, jan., 2000.

HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S. K.; PERIAGO, M. R. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 2, n. 9, p. 1-11, set. 2008.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**. v. 6, p. 279–284, abr., 2005.

IDT - *Integrated DNA Technology*. Disponível em: <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>>. Acesso em: 9 abr. 2010.

JAUREGUI, L. H.; HIGGINS, J.; ZARLENGA, D.; DUBEY, J. P.; LUNNEY, J. K.. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Toxoplasma gondii* in Pig and Mouse Tissues. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 6, p. 2065–2071, mar./jun., 2001.

KELLEHER, M.; TOMLEY, F. M. Transient expression of b-galactosidase in differentiating sporozoites of *Eimeria tenella*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 97, p. 21–31, ago., 1998.

KIRCHHOFF, L. V.; VOTAVA, J. R.; OCHS, D. E.; MOSER, D. R. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 34, n. 5, p. 1171-1175, 1996.

KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. **TRENDS in Molecular Medicine**. v.8, n. 6, jun., 2002.

LENZI, H.L.; OLIVEIRA, D.N.; LIMA, M.T.; GATTAS, C.R. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. **Experimental Parasitology**. v.84, p. 16-27, 1996.

LE-SENNE, A.; MUELAS-SERRANO, S.; FERNÁNDEZ-PORTILLO, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of a β -galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, n.8, p.1101-1105, 2002.

MACEDO, A.M.; MARTINS, M.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.55, p.147-53, 1992.

MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitology Today**. v.14, p.119-24, 1998.

MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. v. 4, p. 4-16, mar., 2002.

MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. DJ. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas Disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p.1-12, 2004.

MACGREGOR, G. R.; NOLAN, G. P.; FIERING, S.; ROEDERER, M.; HERZENBERG, L. A. Use *E. coli lacZ* (β -galactosidase) as a reporter gene. Methods in Molecular Biology. In: MURRAY, E. G. **Gene transfer and expression protocols**. Clifton: The Humana Press, 1990. cap. 17, p. 1-20.

MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M. V.; SARABANDA, Á. V. L. Cardiopatia Chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 72, n. 3, p. 247-263, 1999.

MATTHEWS, B. W. The structure of *E. coli* β -galactosidase. **Comptes Rendus Biologies**. v. 328, p. 549-556, mar., 2005.

MCFADDEN, D. C.; SEEGER, F.; BOOTHROYD, J. C. Use of *Toxoplasma gondii* expressing β -galactosidase for colorimetric assessment of drug activity *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 9, 1997.

MEDINA-LOPES, M. D. Transmissão do *Trypanosoma cruzi* em um caso, durante aleitamento, em área não endêmica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 21, p. 151-153, 1998.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strain. **Journal of Parasitology**. v. 64, n. 3, p. 475-482, 1978.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância epidemiológica. Ed. 6. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/chagas_gve.pdf>. Acessado em: 12 dez. 2008.

MOMEN, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, p. 181-184, 1999.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, n. 1, p. 17-30, mar./mai., 2009.

MORRIS, K. After 100 years, time to break silence on Chagas disease. **The Lancet**. v. 9, p. 468, ago., 2009.

MORRISON, T. B.; MA, Y.; WEIS, J. H.; WEIS, J. J. Rapid and Sensitive Quantification of *Borrelia burgdorferi*-Infected Mouse Tissues by Continuous Fluorescent Monitoring of PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 4, p. 987-992, abr., 1999.

NERY-GUIMARÃES, F.; SILVA, N. N.; CLAUSELL, D. T. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrida em Teutônia (Estrela-Rio Grande do Sul). *Hospital* (Rio de Janeiro), v. 73, p. 1767-1804, 1968.

NEVES DA SILVA, N.; CLAUSELL, D. T.; NÓLIBOS, H. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.10, p. 265-276, 1968.

NISHI, S. M.; VIERO, L. M.; SOARES, R. M.; MAIORKA, P. C.; GENNARI, S. M. Emprego da RT-PCR em tempo real para a quantificação da expressão de genes associados à resposta imune em bezerros bovinos experimentalmente infectados por *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 18, n.1, p. 8-14, jan./mar., 2009.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Brasileira de Ciência e Desenvolvimento**. v. 37, p. 226-231, ago., 2004.

OKUNO, T.; GOTO, Y.; MATSUMOTO, Y.; OTSUKA, H.; MATSUMOTO, Y. Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing egfp or the β -galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. **Experimental Animals**. v. 52, n. 2, p. 109-118, 2003.

OLIVEIRA, A. M.; BORGES, P.; PONS, A. H.; BABINSKI, M. A.; BRASIL, F. B. Análise histopatológica e esterológica do coração de camundongos na fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. **Acta Scientiae Medica**. v. 1, n. 1, p. 10-18, 2008.

PELLEGRINO, J. Transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue. Primeiras comprovações sorológicas em doadores e candidatos a doadores. **Revista Brasileira de Medicina**. v. 6, p. 297-301, 1949.

PENA, S. DJ.; MACHADO, C. R.; MACEDO, A. M. *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.104, n.1, p.108-114, 2009.

PIRON, M.; FISA, R.; CASAMITJANA, N.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; PUIG, L.; VERGÉS, M.; B, GASCÓN, J.; PRAT, J. G.; PORTÚS, M.; SAULEDA, S.

Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta Tropica**. v. 103, p. 195–200, 2007.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Revista de Saúde Pública**. v. 37, n. 1, p. 107-115, 2003.

PRIMAVERA, K. S. C.; UMEZAWA, E. S.; PERES, B. A.; CAMARGO, M. E.; HOSHINO-SHIMIZU, S. Chagas' diseases: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 32, n. 3, p. 172-180, 1990.

RAGONHA, L. H. O.; ABRAHÃO, A. A. C.; SALA, M. A.; LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; JUNIOR, J. C. P.; ALBUQUERQUE, S.; ZUCOLOTO, S. Estudo morfométrico Del hígado de ratón en La enfermedad de Chagas experimental. **International Journal of Morphology**. v. 24, n. 3, p. 383-390, set., 2006.

REICHE, E. M. V.; JANKEVICIUS, J. V. Avaliação de métodos alternativos para o diagnóstico laboratorial confirmatório da doença de Chagas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 29, p. 29-40, 1997.

RIBEIRO, R.D.; FERRIOLI FILHO, F.; BELDA NETO, F. M. Comportamento de sub-amostras do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiro vertebrado e invertebrado. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 42, p.51-4, 1982.

ROMAÑA, C.;MEYER, H. Estudo do ciclo evolutivo do “*Schizotrypanum cruzi*” em cultura de tecidos de embrião de galinha. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.37, n.1, p.19-27, 1942.

ROSSEN, L.; NORSEKOV, P.; HOIMSTROM, K.; RASMUSSEN, O. F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**. v. 17, p. 37-45, mar./jul., 1992.

RUIZ, C. R.; FAVORETO, S. J.; DORTA, M. L.; OSHIRO, M. E. M.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M.; YOSHIDA, N. infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signaling activity. **Biochemical Journal**. v. 330, p. 505-511, 1998.

SCHUMUÑIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**. v. 31, p. 547-557, 1991.

SEEBER, F.; BOOTHROYD, J. C. *Escherichia coli* β-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Gene**. v. 169, p. 39-45, 1996.

SENIOR, K. Chagas disease: moving towards global elimination. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 7, n. 9, set., 2007.

SHIKANAI-YASSUDA, M. A.; LOPES, M. H.; TOLEZANO, J. E.; UMEZAWA, E.; AMATO NETO, V.; BARRETO, A. C. P.; HIGAKI, Y.; MOREIRA, A. A. B.; FUNAYAMA, G.; BARONE, A. A.; DUARTE, A.; ODONE, V.; CERRI, G. C.; SATO, M.; POSI, D.; SHIROMA, M. Doença de chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e respostas à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.35, p. 16-27, 1991.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARCONDES, C. B.; GUEDES, L. A. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 33, p. 351-357, 1991.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 27, n. 2, p. 11-22, 1994.

SILVEIRA, A. C.; VINHÃES, M. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 31, n. 2, p. 15-60, 1998.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GELLER, M.; MARTINS, A. V.; BASTOS, M. P. B. *Trypanosoma cruzi*. In: SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CORRÊA, A. D.; GELLER, M. **Moléstia de Chagas**. Rio de Janeiro: Rubio, 2007a. 2 ed., p. 19-32.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; RUBIÃO, E. C. N.; COTTA, R. M. M.; PISINATTI, A.; SORANZ, D. R.; PINTO, L. F. S. Epidemiologia e ecologia. In: SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CORRÊA, A. D.; GELLER, M. **Moléstia de Chagas**. Rio de Janeiro: Rubio, 2007b. 2 ed., p. 147-168.

SOLARI, A.; ORTÍZ, S.; SOTO, A.; ARANCIBIA, C.; CAMPILLAY, R.; CONTRERAS, M.; SALINAS, P.; ROJAS, A.; SCHENONE, H. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 48, p. 515-119, 2001.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 83, p.141-52, 1996.

SOUTO, R.P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 62, p. 45-52, 1993.

STAQUICINI, D. I.; MARTINS, R. M.; MACEDO, S.; SASSO, G. R. S.; ATAYDE, V. D.; JULIANO, M. A.; YOSHIDA, N. Role of GP82 in the Selective Binding to Gastric Mucin during Oral Infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 4, n. 3, p. 1-9, mar. 2010.

STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; PEDROSO, A.; ZINGALES, B. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 126, p. 73–80, jul./out., 2003.

TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; TAQUINI, A. C. Electrograma en la enfermedad de Chagas experimental. **Revista Argentina de Cardiología**. v. 8, p. 115-21, 1992.

TIBAYRENC, M.; ECHALAR, L.; DUJARDIN, P.; POCH, O.; DESJEUX, P. The microdistribution of isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi* in Southern Bolivia: New isoenzyme profiles and further arguments against Mendelian sexuality. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 78, n. 4, p. 519-525, 1984.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 83, n.1, p.115-119, 1986.

TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F.J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 87, p. 2414-8, 1990.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 83, p. 115-119, jan., 1986.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; FRAIHA NETO, H. Transmissão da doença de Chagas: como estamos? Considerações sobre a epidemiologia e transmissão da doença de Chagas na Amazônia Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32, n. 2, p. 51-55, 1999.

VALENTE, S. A. S.; PIMENTEL, P. S.; VALENTE, V. C. Microepidemia familiar de doença de Chagas em Santarém, primeiro registro no oeste do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, n. 1, p. 19, 2001.

VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A. S.; PINTO, A. Y. N. Perfil parasitológico e sorológico em microepidemia familiar de doença de Chagas em Abaetetuba, Estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, p. 20-21, 2001.

VALLONE, P. M.; BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **BioTechniques**. v. 37, p. 226-231, ago., 2004.

VEGA C.; ROLÓN M; MARTINEZ-FERNANDEZ A. R.; ESCARIO J. A.; GOMEZ-BARRIO, A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi*

epimastigotes expressing b-galactosidase. **Parasitology Research**. v.95, p. 296–298, 2005.

VERA-CRUZ, J. M.; MAGALLÓN-GASTCLUM, E.; GRIJALVA, G.; RINCÓN, A. C.; RAMOS-GARCIA, C.; ARMENDÁRIZ-BORUNDA, J. Molecular diagnosis of Chagas' Disease and use of animal model to study parasite tropism. **Parasitology Research**. v. 89, p. 480-486, 2003.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas” (Esquizotripanoze humana ou tireoidite parasitária). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.3, n.2, p.276-293, 1911.

VINHÃES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.16, n. 2, p. 7-12, 2000.

WHO. Chagas disease intervention development and implementation research: transfer to the WHO regional Office for Americas. I:TDRnews, n.66, 2001. Disponível em:<www.who.int/tdr/publications/new66/chags.htm>. Acesso em: 15 jun. 2007.

WHO. Control of Chagas' Disease. Second report of the WHO Expert Committee. 2002. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf>. Acesso em: 10 out. 2009.

WHO. Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales (TDR), 2007. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas/pdf/swg_chagas.pdf>. Acesso em: 12 dez., 2008.

WILSON. I. G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. **Applied and Enviromental Microbiology**. v. 63, n. 10, p. 3741–3751, out., 1997.

WILLIAMS, J. T.; MUBIRU, J. N.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E.; RUBICZ, R. C.; VANDEBERG, J. L.; JR, E. J. D.; HUBBARD, G. B. Polymerase Chain Reaction Detection of *Trypanosoma cruzi* in *Macaca fascicularis* Using Archived Tissues. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 81, n. 2, p. 228-234, 2009.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology International**. v. 57, p. 105–109, 2008.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, n. 1, p. 101-107, 2009.

ZAUZA, P. L.; BORGES-PEREIRA, J. Níveis séricos de IgG anti-*Trypanosoma cruzi* na evolução da cardiopatia chagásica crônica, no período de 10 anos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, n. 5, p. 399-405, 2001.

ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with host cells. **Current Tropical Microbiology**. v. 117, p.129-152, 1985.

ZINGALES, B.; PEREIRA, M. E.; ALMEIDA, K. A.; UMEZAWA, E.S.; NEHME, N. S.; OLIVEIRA, R. P.; MACEDO, A.; SOUTO, R. P. Biological Parameters and Molecular Markers of Clone CL Brener - The Reference Organism of the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 92, n. 6, p.811-814, nov./dez., 1997.

ZINGALES, B.; SOUTO, R.P.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R.; JANSON, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon gene sequences. **International Journal for Parasitology.** v. 28, p.105-112, 1998.

ANEXO

ANEXO 1 - Tabelas de valores brutos da leitura em espectrofotômetro em 570 nm referente à atividade da β -galactosidase.

Em cada tabela estão representados os tecidos indicados pelas siglas: C=coração, F=fígado, B=baço, I=intestino, M=músculo. Nos tecidos cardíaco, hepático, esplênico e muscular, foram descontados os valores da leitura obtida em 150 μ L apenas do tecido triturado sem a adição do substrato CPRG (*chlorophenol red β -galactopyranoside*).

GRUPO CONTROLE

C 1	C 2	F 2	F 2'	F 1	F 1'	CPRG
0,013	0,015	0,481	0,045	0,384	0,022	0,003
0,012	0,012	0,487	0,042	0,283	0,019	0,002
0,009	0,011	0,295	0,045	0,293	0,023	0,003

B 1	B 1'	B 2	B 2'	I 1	I 2
0,011	0,007	0,018	0,014	0,013	0,005
0,007	0,006	0,015	0,015	0,008	0,006
0,01	0,008	0,018	0,018	0,009	0,005

M 1	M 1'	M 2	M 2'
0,011	0,009	0,007	0,004
0,013	0,011	0,009	0,005
0,011	0,009	0,007	0,002

GRUPO INOCULADO VIA INTRAPERITONEAL

C1	C2	C3	C4	C5	C6
0,009	0,012	0,010	0,010	0,011	0,016
0,008	0,009	0,008	0,006	0,009	0,012
0,009	0,011	0,011	0,008	0,01	0,014

F1	F1'	F2	F2'	F3	F3'	F4	F4'	F5	F5'	F6
1,345	0,066	1,206	0,049	1,155	0,056	1,482	0,071	1,511	0,111	1,563
1,148	0,064	1,067	0,042	1,021	0,054	1,516	0,072	1,453	0,104	1,444
1,158	0,065	1,085	0,046	1,010	0,058	1,56	0,085	1,396	0,108	1,320

B1	B1'	B2	B2'	B3	B3'	B4	B4'	B5	B5'	B6	B6'
0,041	0,037	0,044	0,047	0,091	0,081	0,728	0,138	0,179	0,119	0,036	0,034
0,037	0,039	0,043	0,047	0,087	0,081	0,699	0,136	0,174	0,111	0,027	0,029
0,043	0,042	0,042	0,047	0,092	0,081	0,757	0,124	0,180	0,120	0,032	0,030

I1	I2	I3	I4	I5	I6
1,270	0,101	0,261	0,169	0,182	0,103
1,225	0,093	0,244	0,163	0,169	0,092
1,271	0,093	0,249	0,162	0,171	0,089

M1	M1'	M2	M2'	M3	M3'	M4	M4'	M5	M5'	M6
0,013	0,008	0,006	0,004	0,01	0,006	0,039	0,016	0,009	0,004	0,033
0,014	0,012	0,009	0,006	0,012	0,010	0,042	0,019	0,011	0,007	0,036
0,012	0,008	0,006	0,004	0,011	0,007	0,037	0,017	0,009	0,006	0,035

GRUPO INOCULADO VIA SUBCUTÂNEA

C1	C2	C3	C4	C5	C6
0,009	0,009	0,008	0,006	0,007	0,007
0,007	0,004	0,004	0,001	0,003	0,003
0,009	0,005	0,007	0,004	0,006	0,005

F1	F1'	F2	F2'	F3	F3'	F4	F4'	F5	F5'
0,01	0,008	0,467	0,033	0,198	0,027	0,808	0,043	0,490	0,060
0,008	0,005	0,419	0,034	0,169	0,028	0,801	0,044	0,446	0,055
0,01	0,007	0,432	0,035	0,178	0,029	0,839	0,044	0,508	0,061

B1	B1'	B2	B2'	B3	B3'	B4	B4'	B5	B5'
0,009	0,006	0,010	0,006	0,042	0,034	0,015	0,006	0,013	0,009
0,011	0,008	0,011	0,008	0,035	0,033	0,007	0,013	0,011	0,007
0,011	0,005	0,009	0,006	0,035	0,031	0,017	0,012	0,013	0,009

I1	I2	I3	I4	I5	I6
0,007	0,006	0,011	0,009	0,016	0,011
0,007	0,005	0,008	0,006	0,012	0,006
0,007	0,006	0,011	0,008	0,015	0,010

M1	M1'	M2	M2'	M3	M3'	M4	M4'	M5	M5'	M6	M6'
0,008	0,003	0,007	0,004	0,005	0,001	0,006	0,002	0,005	0,000	0,005	0,001
0,010	0,005	0,009	0,005	0,007	0,002	0,007	0,004	0,006	0,001	0,006	0,001
0,009	0,004	0,008	0,004	0,005	0,000	0,007	0,001	0,005	0,000	0,004	0,000

GRUPO INOCULADO VIA ORAL

C1	C2	C3	C4	C5	C6
0,009	0,012	0,010	0,010	0,011	0,016
0,008	0,009	0,008	0,006	0,009	0,012
0,009	0,011	0,011	0,008	0,010	0,014

F1	F1'	F2	F2'	F3	F3'	F4	F4'	F5	F5'	F6	F6'
1,345	0,066	1,206	0,049	1,155	0,056	1,482	0,071	1,511	0,111	1,563	0,091
1,148	0,064	1,067	0,042	1,021	0,054	1,516	0,072	1,453	0,104	1,444	0,083
1,158	0,065	1,085	0,046	1,010	0,058	1,56	0,085	1,396	0,108	1,32	0,081

B1	B1'	B2	B2'	B3	B3'	B4	B4'	B5	B5'	B6	B6'
0,041	0,037	0,044	0,047	0,091	0,081	0,728	0,138	0,179	0,119	0,036	0,034
0,037	0,039	0,043	0,047	0,087	0,081	0,699	0,136	0,174	0,111	0,027	0,029
0,043	0,042	0,042	0,047	0,092	0,081	0,757	0,124	0,180	0,120	0,032	0,030

I1	I2	I3	I4	I5	I6
1,270	0,101	0,261	0,169	0,182	0,103
1,225	0,093	0,244	0,163	0,169	0,092
1,271	0,093	0,249	0,162	0,171	0,089

M1	M1'	M2	M2'	M3	M3'	M4	M4'	M5	M5'	M6	M6'
0,013	0,008	0,006	0,004	0,010	0,006	0,039	0,016	0,009	0,004	0,033	0,037
0,014	0,012	0,009	0,006	0,012	0,01	0,042	0,019	0,011	0,007	0,036	0,038
0,012	0,008	0,006	0,004	0,011	0,007	0,037	0,017	0,009	0,006	0,035	0,036

ANEXO 2 – Análise da formação de dímero dos *primers* D71 e D72 de *T. cruzi*.

Formação de homo-dímero no *primer* D71, de acordo com o programa IDT.

HOMO-DIMER ANALYSIS

Dimer Sequence

5'- AAGGTGCGTCGACAGTGTGG -3'

Maximum Delta G -39.32 kcal/mole

Delta G -9.45 kcal/mole
Base Pairs 6

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 |||||
3' GGTGTGACAGCTGCGTGGAA

Delta G -3.61 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 ||
3' GGTGTGACAGCTGCGTGGAA

Delta G -3.61 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 : || :: :
3' GGTGTGACAGCTGCGTGGAA

Delta G -3.3 kcal/mole
Base Pairs 3

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 : ||| :: :
3' GGTGTGACAGCTGCGTGGAA

Delta G -3.14 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 : || :
3' GGTGTGACAGCTGCGTGGAA

Delta G -1.95 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 : || :: :
3' GGTGTGACAGCTGCGTGGAA

Delta G -1.95 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 || ::
3' GGTGTGACAGCTGCGTGGAA

Delta G -1.34 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 : || :: :
3' GGTGTGACAGCTGCGTGGAA

Delta G -1.34 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 || ::
3' GGTGTGACAGCTGCGTGGAA

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

Formação de homo-dímero do *primer* D72, de acordo com o programa IDT.

HOMO-DIMER ANALYSIS

Dimer Sequence

5'- TTTTCAGAAATGGCCGAACAGT -3'

Maximum Delta G -40.55 kcal/mole

Delta G -9.28 kcal/mole
Base Pairs 4

5' TTTTCAGAAATGGCCGAACAGT
: : |||| : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -3.61 kcal/mole
Base Pairs 2

5' TTTTCAGAAATGGCCGAACAGT
: : || : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -3.52 kcal/mole
Base Pairs 3

5' TTTTCAGAAATGGCCGAACAGT
||| : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -3.52 kcal/mole
Base Pairs 3

5' TTTTCAGAAATGGCCGAACAGT
: ||| : : : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -1.95 kcal/mole
Base Pairs 2

5' TTTTCAGAAATGGCCGAACAGT
|| : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -1.94 kcal/mole
Base Pairs 2

5' TTTTCAGAAATGGCCGAACAGT
|| : : : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -1.94 kcal/mole
Base Pairs 2

5' TTTTCAGAAATGGCCGAACAGT
|| : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -1.94 kcal/mole
Base Pairs 2

5' TTTTCAGAAATGGCCGAACAGT
|| : : : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -1.94 kcal/mole
Base Pairs 2

5' TTTTCAGAAATGGCCGAACAGT
|| : : : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -1.34 kcal/mole
Base Pairs 2

5' TTTTCAGAAATGGCCGAACAGT
|| : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Formação de hereto-dímeros entre os *primers* D71 e D72, de acordo com o programa IDT.

HETERO-DIMER ANALYSIS

Primary Sequence

5'- AAGGTGCGTCGACAGTGTGG -3'

Secondary Sequence

5'- TTTCAGAAATGSCCGAACAAT -3'

Maximum Delta G

-40.55 kcal/mole

Delta G

-5.19 kcal/mole

Base Pairs

3

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
||| : : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G

-3.61 kcal/mole

Base Pairs

2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
: :: || : : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G

-3.61 kcal/mole

Base Pairs

2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
: :: || : : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G

-3.3 kcal/mole

Base Pairs

3

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
: |||
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G

-3.14 kcal/mole

Base Pairs

2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
||
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G

-3.07 kcal/mole

Base Pairs

2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
|| : : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G

-3.07 kcal/mole

Base Pairs

2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
: : : ||
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G

-1.95 kcal/mole

Base Pairs

2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
: ||
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G

-1.95 kcal/mole

Base Pairs

2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
|| : : : : :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G

-1.95 kcal/mole

Base Pairs

2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
||
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -1.94 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 ||
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -1.94 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 ||
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -1.94 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 ||
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -1.57 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 : ||
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

Delta G -1.34 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
 || :
3' TGACAAGCCGGTAAGACTTTT

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

ANEXO 3 – Curvas obtidas na técnica de *Real Time-PCR*.

A. Teste variando a temperatura de anelamento para 63 °C na análise de *PCR* em tempo real para quantificar o *T. cruzi* usando os *primers* D71 e D72. Em 1 curva de fluorescência e 2 curva de dissociação (*melting curve*). Em vermelho controle negativo e verde controle positivo.

1

2

B. Teste variando a temperatura de anelamento para 64 °C na análise de *PCR* em tempo real para quantificar o *T. cruzi* usando os *primers* D71 e D72. Em 1 curva de fluorescência e 2 curva de dissociação (*melting curve*). Em vermelho controle negativo e verde controle positivo.

1

2

C. Teste variando a temperatura de anelamento para 65 °C na análise de *PCR* em tempo real para quantificar o *T. cruzi* usando os *primers* D71 e D72. Em 1 curva de fluorescência e 2 curva de dissociação (*melting curve*). Em vermelho controle negativo, verde controle positivo e azul amostra de tecido cardíaco de um animal pertencente ao grupo inoculado via IP.

1

2

D. Teste com amostras com DNase (cores azul escuro, rosa e pardo) e sem DNase (cores laranja, azul claro e marrom) na análise de *PCR* em tempo real para quantificar o *T. cruzi* usando os *primers* D71 e D72.. Em 1 curva de fluorescência e 2 curva de dissociação (*melting curve*). Em vermelho e verde controle negativo.

E. Teste variando a concentração dos *primers* na análise de *PCR* em tempo real para quantificar o *T. cruzi* usando os *primers* D71 e D72. Em 1 curva de fluorescência e 2 curva de dissociação (*melting curve*). Em vermelho controle negativo e verde controle positivo com *primers* na concentração de 0,25 μM ; em azul escuro controle negativo e laranja controle positivo com *primers* na concentração de 0,07 μM ; em rosa controle negativo e azul claro controle positivo com *primers* na concentração de 0,05 μM .

F. Teste variando água (verde e laranja) e SYBR® (vermelho e azul) na análise de *PCR* em tempo real para quantificar o *T. cruzi* usando os *primers* D71 e D72. Em 1 curva de fluorescência e 2 curva de dissociação (*melting curve*). Em vermelho e verde controle negativo, azul e laranja controle positivo.

G. Teste com amostras de tecidos do grupo inoculado via IP na análise de *PCR* em tempo real para quantificar o *T. cruzi* usando os *primers* D71 e D72. Em 1 curva de fluorescência e 2 curva curva de dissociação (*melting curve*). Em vermelho controle negativo; verde e azul controle positivo; laranja, rosa, azul claro, pardo e marrom tecido cardíaco, hepático, esplênico, entérico e muscular, respectivamente.

H. Teste com amostras de tecidos do grupo inoculado via SC na análise de *PCR* em tempo real para quantificar o *T. cruzi* usando os *primers* D71 e D72. Em 1 curva de fluorescência e 2 curva de dissociação (*melting curve*). Em vermelho controle negativo; verde e azul controle positivo; laranja, rosa, azul claro, pardo e marrom tecido cardíaco, hepático, esplênico, entérico e muscular, respectivamente.

I. Teste com amostras de tecidos do grupo inoculado via OR na análise de *PCR* em tempo real para quantificar o *T. cruzi* usando os *primers* D71 e D72. Em 1 curva de fluorescência e 2 curva de dissociação (*melting curve*). Em vermelho, verde e azul *Royal* controle negativo; azul escuro e rosa controle positivo; pardo, marrom, azul claro, verde escuro e roxo são tecido cardíaco, hepático, esplênico, entérico e muscular, respectivamente.