UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Marcos Luiz Alves Andrino

Padronização e validação de dois sistemas de amplificação quantitativa para a detecção do DNA mitocondrial e nuclear de *Trypanosoma cruzi* em amostras sanguíneas e teciduais de camundongos Swiss infectados.

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Thelma Suely Okay

São Paulo

2016

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Andrino, Marcos Luiz Alves

Padronização e validação de dois sistemas de amplificação quantitativa para a detecção do DNA mitocondrial e nuclear de *Trypanosoma cruzi* em amostras sanguíneas e teciduais de camundongos Swiss infectados / Marcos Luiz Alves Andrino. – São Paulo, 2016.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Thelma Suely Okay

Descritores: 1. TRYPANOSOMA CRUZI. 2. DOENÇA DE CHAGAS. 3. BIOLOGIA MOLECULAR. 4. DNA DE CINETOPLASTO. 5. REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE. 6. MODELOS ANIMAIS.

USP/IMTSP/BIB-16/2016.

RESUMO

Andrino MLA. Padronização e validação de dois sistemas de amplificação quantitativa para a detecção do DNA mitocondrial e nuclear de *Trypanosoma cruzi* em amostras sanguíneas e teciduais de camundongos Swiss infectados (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

As técnicas sorológicas são os testes de referência para o diagnóstico da doença de Chagas, porém, são pouco efetivas para avaliar a resposta ao tratamento, uma vez que a soronegativação pode levar muitos anos. As sorologias também são usadas para identificar episódios de reativação em pacientes com algum grau de imunodeficiência, por exemplo, os co-infectados pelo HIV. Já a hemocultura e o xenodiagnóstico possuem elevada especificidade e baixa sensibilidade, requerendo de 30 a 120 dias para a liberação do resultado final, podendo gerar resultados falso-negativos especialmente na fase crônica da infecção. Diante disso, a PCR em tempo real (qPCR), técnica com elevada sensibilidade e especificidade, poderia ser utilizada para detectar e quantificar a carga parasitária, permitindo o diagnóstico de episódios de reativação e o monitoramento de pacientes em tratamento. A escolha dos alvos de amplificação e dos iniciadores da qPCR é desafiadora, já que ainda não existe consenso na literatura sobre a melhor sequência alvo de amplificação e os melhores iniciadores. No presente estudo, foram selecionados iniciadores do DNA nuclear (F2/B3) e do mitocondrial (32F/148R) de *T. cruzi*. Posteriormente, para validação dos ensaios, foram obtidas amostras de sangue, cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rim, intestino, glândulas adrenais, tecido adiposo e tecido muscular esquelético de 24 camundongos Swiss adultos, infectados intraperitonealmente com 10^3 formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Amostras foram colhidas no 13º, 26º e 61º dias pós-infecção, correspondendo a diferentes intensidades de carga parasitária (alta, média e baixa). As amostras foram analisadas por qPCR com *SYBR Green*. Os resultados mostraram que os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial detectaram *T. cruzi* de forma específica, sendo que as maiores cargas parasitárias foram detectadas pelos iniciadores do DNA nuclear, embora os iniciadores do DNA mitocondrial tenham apresentado maior sensibilidade analítica (0,002 e 0,0002 de um único parasito, respectivamente). As duas qPCR obtiveram índices adequados de reprodutibilidade e repetibilidade inferiores a 25%. Os parâmetros de eficiência, (90%- 110%) e linearidade ($R^2 \geq 0.98$) das duas qPCR apresentaram valores adequados de acordo com o estabelecido pela literatura especializada. A comparação do *threshold cycle* (C_T) das duas qPCR não apresentou diferença estatística. Em relação à carga parasitária foi possível detectar o DNA do parasito em todas as amostras de sangue e tecidos, com distribuição universal, porém heterogênea, e em todas as fases da infecção. O modelo animal utilizado neste estudo foi adequado para validar as duas qPCR voltadas à detecção e quantificação da carga parasitária. De acordo com os parâmetros estabelecidos, as duas qPCR, com iniciadores do DNA nuclear e do mitocondrial, foram padronizadas e validadas com sucesso, sendo capazes de quantificar todos os tipos de amostras (sangue e órgãos), nas fases aguda, subaguda e crônica da doença, sinalizando positivamente para a utilização dos dois ensaios moleculares no diagnóstico da infecção por *T. cruzi*.

Descritores: Modelos animais. Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Biologia Molecular. DNA de cinetoplasto. Reação em Cadeia por Polimerase.

ABSTRACT

Andrino MLA. Two quantitative amplification systems for detection of mitochondrial and nuclear DNA of *Trypanosoma cruzi*: standardization and validation in the blood and tissue samples from infected Swiss mice (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Serological techniques are the gold standards for the diagnosis of Chagas' disease, but are not very effective in evaluating the response to treatment, since seronegativation may take many years. Serology is also used to identify reactivation episodes in patients with some degree of immunodeficiency, for example those co-infected with HIV. Hemoculture and xenodiagnosis have high specificity and low sensitivity, requiring 30 to 120 days for releasing a final result, and they can generate false-negative results especially in the chronic phase of infection. Therefore, real-time PCR (qPCR), a technique with high sensitivity and specificity, could be used to detect and quantify the parasite load, allowing the diagnosis of reactivation episodes and the monitoring of patients undergoing treatment. The choice of amplification targets and qPCR primers is challenging since there is as yet no consensus in the literature about the best amplification target sequence and the best primers. In the present study, primers from the nuclear (F2/B3) and mitochondrial, kDNA (32F/148R) *T. cruzi* sequences were designed. Samples were obtained from the blood, brain, heart, lung, liver, spleen, kidney, intestine, adrenal glands, adipose tissue and skeletal muscle tissue of 24 adult Swiss mice, infected intraperitoneally with 10^3 trypomastigote forms of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. The samples were collected at the 13th, 26th and 61st post-infection days, corresponding to different parasite load levels (low, medium and high), and were analyzed by qPCR with *SYBR Green*. The results showed that the nuclear and mitochondrial DNA primers detected *T. cruzi* DNA in a specific way. The nuclear primers detected higher parasite load levels than the kDNA ones, although the kDNA primers presented higher analytical sensitivity (0.002 and 0.0002 of a single parasite, respectively). The two qPCRs showed adequate reproducibility and repeatability indexes, i.e., below 25%. The efficiency parameters, (90% - 110%) and linearity ($R^2 \geq 0.98$) of the two qPCRs showed adequate values according to the established literature. The comparison of the threshold cycle (C_T) of the two qPCRs found no statistical difference. Regarding the parasite load, it was possible to detect the parasite DNA in all blood and tissue samples, with universal distribution, however heterogeneous, and at all stages of infection. The animal model used in this study was adequate to validate the two qPCRs for the detection and quantification of the parasite load. According to established parameters, the two qPCRs, with nuclear and mitochondrial primers, were successfully standardized and validated, being able to quantify all types of samples (blood and organs), in the acute, subacute and chronic phases of the disease, signaling positively to the use of both molecular assays in the diagnosis of *T. cruzi* infections.

Keywords: Animal model. Chagas Disease. *Trypanosoma cruzi*. Molecular Biology. Fluorescence. Kinetoplast DNA. Polymerase Chain Reaction

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA	8
1.2 MORFOLOGIA DO PARASITO	8
1.3 GENOMA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	9
1.3.1 GENOMA NUCLEAR	9
1.3.2 GENOMA MITOCONDRIAL	9
1.4 CEPAS	10
1.5 VETORES	11
1.6 RESERVATÓRIOS	11
1.7 CICLO DE VIDA	11
1.8 TRANSMISSÃO	12
1.9 QUADRO CLÍNICO DA DOENÇA DE CHAGAS	13
1.10 TRATAMENTO	13
1.11 CRITÉRIO DE CURA	14
1.12 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	15
1.12.1 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	15
1.12.2 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	16
1.12.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	16
1.13 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)	17
1.14 DEFINIÇÃO DE “CURA” NA DOENÇA DE CHAGAS	17
2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	21
4.2 CEPA DE <i>T. cruzi</i>	21
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE E ÓRGÃOS E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA NAS AMOSTRAS	21
4.4 INICIADORES UTILIZADOS NO ESTUDO	21
4.5 CURVA PADRÃO	22
4.6 TESTES DE ESPECIFICIDADE	23

4.7 ANIMAIS – CAMUNDONGOS	24
4.8 TAMANHO AMOSTRAL	24
4.9 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DOS CAMUNDONGOS E COLHEITA DE AMOSTRAS	25
4.10 MICROSCOPIA ÓPTICA E CULTURA DE <i>T. cruzi</i> (TESTES DE REFERÊNCIA).....	26
4.11 CARGA PARASITÁRIA	26
4.12 VALIDAÇÃO DA qPCR	27
4.13 REPRODUTIBILIDADE E REPETIBILIDADE	27
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5 RESULTADOS.....	29
5.1 MICROSCOPIA E HEMOCULTURA – MÉTODOS DE REFERÊNCIA	29
5.2 VALIDAÇÃO DAS DUAS qPCR.....	29
5.2.1 APLICABILIDADE	29
5.2.2 ESPECIFICIDADE	30
5.2.3 LIMITE DE DETECÇÃO OU SENSIBILIDADE ANALÍTICA	32
5.2.4 EFICIÊNCIA DAS DUAS qPCR	32
5.2.5 REPETIBILIDADE.....	32
5.2.6 REPRODUTIBILIDADE E LINEARIDADE	33
5.3 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM SANGUE E ÓRGÃOS	36
5.3.1 CARGA PARASITÁRIA NO SANGUE (PARASITEMIA)	36
5.3.2 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO CARDÍACO	37
5.3.3 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO CEREBRAL	38
5.3.4 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO PULMONAR	39
5.3.5 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO HEPÁTICO.....	40
5.3.6 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO ESPLÊNICO	41
5.3.7 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO RENAL	42
5.3.8 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO INTESTINAL.....	43
5.3.9 CARGA PARASITÁRIA EM MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	44
5.3.10 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO ADIPOSE.....	45
5.3.11 CARGA PARASITÁRIA EM GLÂNDULAS ADRENAIS	46
5.4 COMPARAÇÃO DO <i>THRESHOLD CYCLE</i> (C_T) DOS INICIADORES DO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL EM SANGUE E ÓRGÃOS, NOS TRÊS TEMPOS DE COLHEITA (13º, 26º E 61º DPI).....	47

5.4.1 COMPARAÇÃO DO <i>THRESHOLD CYCLE</i> (C_T) DOS INICIADORES DO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL NAS AMOSTRAS, NO 13º DPI	47
5.4.2 COMPARAÇÃO DO <i>THRESHOLD CYCLE</i> (C_T) DOS INICIADORES DO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL EM ÓRGÃOS, NO 26º DPI	48
5.4.3 COMPARAÇÃO DO <i>THRESHOLD CYCLE</i> (C_T) DOS INICIADORES DO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL EM ÓRGÃOS, NO 61º DPI	49
6 DISCUSSÃO	50
6.1 APLICABILIDADE	50
6.2 ESPECIFICIDADE	52
6.3 SENSIBILIDADE	53
6.4 EFICIÊNCIA E LINEARIDADE	53
6.5 REPRODUTIBILIDADE/ REPETIBILIDADE	54
6.6 ANÁLISE DO C_T	54
6.7 CARGA PARASITÁRIA EM SANGUE E NOS ÓRGÃOS	55
6.8 SANGUE	55
6.9 ÓRGÃOS	56
6.10 CORAÇÃO	57
6.11 CÉREBRO	58
6.12 PULMÃO	58
6.13 FÍGADO/BAÇO	58
6.14 RINS	59
6.15 INTESTINO	59
6.16 MÚSCULO	60
6.17 TECIDO ADIPOSEO	60
6.18 GLÂNDULAS ADRENAIS	61
6.19 DNA NUCLEAR OU MITOCONDRIAL?	62
7 CONCLUSÕES	64
8 REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA

No Brasil, em 1907, Carlos Chagas, aos 28 anos, trabalhando como pesquisador assistente no Instituto Manguinhos, identificou no primata *Callitrix penicillata*, capturado no Estado de Minas Gerais, um novo parasito flagelado. Inicialmente ele o descreveu e nomeou o parasito de *Trypanosoma minasense*. Durante uma pesquisa de campo realizada na cidade de Lassance, o engenheiro chefe da construção da estrada de ferro apresentou a Carlos Chagas um inseto conhecido na região por picar o rosto dos moradores durante a noite, denominado na região de “barbeiro”. Ele observou que as condições clínicas (febre, anemia grave, aumento do baço, edema e aumento dos gânglios linfáticos) eram frequentes em crianças, e a partir do quadro clínico de uma criança de dois anos chamada Berenice, fez a completa descrição da clínica, sintomatologia e do agente etiológico da doença de Chagas ⁽¹⁾.

1.2 MORFOLOGIA DO PARASITO

Em seu ciclo, o *Trypanosoma cruzi* apresenta três formas evolutivas ⁽²⁾.

- a. Tripomastigota: observado na corrente sanguínea, tecidos de vertebrados e nas fezes do vetor;
- b. Epimastigota: forma de multiplicação do parasito no vetor ou em meio de cultura;
- c. Amastigota: estágio evolutivo que se multiplica dentro das células do hospedeiro vertebrado.

1.3 GENOMA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Uma característica do *T. cruzi* é seu conteúdo total de DNA variar entre diferentes cepas ⁽³⁾. Estima-se que o DNA total nuclear juntamente com o mitocondrial possa variar de 125 a 280 fentogramas ⁽⁴⁾.

1.3.1 GENOMA NUCLEAR

Tal como ocorre com outros eucariontes, o genoma nuclear é composto por sequências de DNA que podem ser agrupadas em três classes majoritárias:

- a. Sequências que codificam proteínas;
- b. Sequências que codificam RNA;
- c. Sequências repetitivas.

O DNA repetitivo, em sua maioria, não é codificador mas representa cerca de 44% do genoma nuclear. O tamanho dessas sequências pode variar desde alguns poucos pares de nucleotídeos até mais de 5.000 pares de bases. Organizam-se frequentemente *in tandem*, isto é, as repetições aparecem dispostas uma após a outra, de maneira regular e periódica, tal como o arranjo das contas de um colar ⁽⁵⁾.

1.3.2 GENOMA MITOCONDRIAL

Uma única e grande mitocôndria se estende por todo o comprimento da célula, albergando moléculas circulares de DNA que codificam RNA ribossômico e enzimas envolvidas na respiração celular. Porém, a mitocôndria dos tripanossomas difere dos demais eucariontes pela presença de uma rede formada por milhares de moléculas circulares de DNA denominadas de cinetoplasto (kDNA), localizadas próximo à base do flagelo. Esse kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares que diferem em tamanho e função, sendo denominadas de minicírculos e maxicírculos ⁽⁵⁾.

- a. **Minicírculos:** possuem cerca de 1.400 pares de base (pb) e estão presentes em 10.000 a 20.000 cópias por parasito. Aparecem entrelaçados entre si, tal qual ocorre entre os anéis de uma malha ⁽⁵⁾. Sua função está relacionada à edição do que se denomina em inglês de *Open Reading Frame* (ORF) ⁽⁶⁾.
- b. **Maxicírculos:** estão organizados em regiões específicas do cinetoplasto, possuem cerca de 40.000 pb de extensão, o número de cópias por parasito varia de 20 a 50, e codificam o RNA ribossomal da mitocôndria e uma variedade de enzimas da cadeia respiratória da mitocôndria ⁽⁵⁾.

1.4 CEPAS

As cepas do parasito constituem complexos de populações multiclonais que diferem em suas características genéticas, biológicas e em seu comportamento no hospedeiro vertebrado. Estudos experimentais mostram que diferentes cepas de *T. cruzi* podem determinar lesões tissulares peculiares na fase aguda, que surgem em consequência de um tropismo específico e predominante para diferentes tipos de células de mamíferos, tais como, macrófagos, células musculares cardíacas e esqueléticas, e neurônios. Variações intraespecíficas nas diferentes cepas têm sido demonstradas nos níveis morfobiológico, bioquímico e genético. Essa heterogeneidade poderia explicar a variabilidade nas manifestações clínicas da doença de Chagas e as diferenças regionais de sua morbidade ⁽⁷⁾.

Foi observado que as cepas Y e Peruana apresentam multiplicação rápida, com picos parasitêmicos precoces e elevados, alta virulência e miotropismo na infecção crônica, diferentemente da cepa Colombiana que possui multiplicação mais lenta e baixa virulência. Já as cepas isoladas do Recôncavo Baiano possuem multiplicação relativamente lenta e virulência muito variável ⁽⁵⁾.

1.5 VETORES

Com o passar dos anos, é possível que insetos hemípteros, hematófagos, da família *Reduviidae*, tenham desenvolvido uma probóscida especializada na sucção sanguínea, sendo agrupados na subfamília *Triatominae*, onde se encontram os vetores do *T. cruzi*. A principal espécie de vetor em grande parte da América do Sul é o *Triatoma infestans*. No Brasil, os nomes vulgares dos triatomíneos são: barbeiro, bicho-de-parede, bicudo, borrachudo, cafote, chupa-pinto, chupança, chupão, fincão, furão, percevejo, percevejo de cama, percevejo-do-sertão, piolho de piaçava ⁽⁵⁾.

1.6 RESERVATÓRIOS

Evolutivamente os primeiros hospedeiros de *T. cruzi* foram mamíferos das ordens *Marsupialia* (gambás) e *Xenarthra* (tatus, preguiças e tamanduás). Atualmente, esse parasito é encontrado circulando na natureza entre mais de uma centena de espécies de mamíferos (gambás, tatus, preguiças, tamanduás, roedores, sagui estrela, cães, gatos e morcegos) e algumas dezenas de espécies de vetores. As aves e os vertebrados de sangue frio são refratários ao parasito.

Os ciclos de transmissão desse parasito encontram-se em todas as regiões fitogeográficas do país, nos mais diversos nichos ecológicos, sendo necessário entendê-lo como uma teia na natureza, uma rede dinâmica de transmissão do parasito por diferentes vias ⁽⁸⁾.

1.7 CICLO DE VIDA

Ao fazer o repasto sanguíneo, o inseto infectado elimina pelas fezes os tripomastigotas, próximo ao local da picada. Estes penetram no hospedeiro através do ferimento ou por contato com a mucosa íntegra. Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem células próximas ao ponto de entrada, onde diferenciam-se nas formas intracelulares, os amastigotas. Estes multiplicam-se por divisão

binária, diferenciando-se em tripomastigotas e sendo liberadas na circulação sanguínea. Os tripomastigotas infectam células de uma grande variedade de tecidos e transformam-se em amastigotas intracelulares, num ciclo infectante contínuo. O triatomíneo infecta-se ao ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado contendo tripomastigotas circulantes, que, no intestino médio do vetor se transformam em epimastigotas. Já no intestino posterior o parasito se diferencia na forma infectante do hospedeiro vertebrado, o tripomastigota metacíclico ⁽⁹⁾.

1.8 TRANSMISSÃO

A literatura científica ⁽¹⁰⁾ elenca três categorias pelas quais pode ocorrer a transmissão da doença de Chagas, sendo:

- a. **Formas básicas:** correspondem à transmissão pelo vetor e pela transfusão de sangue;
- b. **Formas alternativas:** descritas como a oral, a acidental, a congênita e por transplante de órgãos;
- c. **Formas excepcionais ou hipotéticas:** outras possibilidades, como a contaminação por meio de outros vetores e outras práticas (uso comunitário de drogas injetáveis).

Tema atual e muito importante é a doença de Chagas em indivíduos imunodeficientes, mormente com a disseminação da prática de transplantes de órgãos e a emergência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Nestes pacientes, as manifestações clínicas costumam ser graves, e até mesmo letais, sendo fundamental como medida preventiva, confirmar o diagnóstico em pacientes com AIDS, em candidatos a transplantes ou em portadores de neoplasias, especialmente se houver antecedentes epidemiológicos ⁽¹¹⁾.

1.9 QUADRO CLÍNICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Os sinais mais característicos da fase aguda são o chagoma (inchaço na região da picada) e o sinal de Romaña, inchaço das pálpebras que ficam quase totalmente fechadas (os barbeiros têm preferência em picar a região do rosto próxima aos olhos) ⁽¹²⁾. Na fase aguda da infecção o tratamento é possível, mas em geral a infecção passa despercebida. A doença irá se manifestar muitos anos depois, na fase crônica, quando os órgãos mais atingidos serão o coração e o trato digestório. No trato digestório, lesões degenerativas dos plexos mioentéricos causarão os chamados “megas”, megaesófago, megacólon ⁽¹²⁾.

1.10 TRATAMENTO

Os fármacos disponíveis para o tratamento são o nifurtimox e o benznidazol, sendo o último, a única medicação disponível no Brasil, controlada e fornecida pelo Ministério da Saúde por intermédio do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). Outros medicamentos como a anfotericina B e o alopurinol apresentam alguma ação *in vitro* contra o *T. cruzi*, o que não ocorre em sua ação *in vivo*, não sendo por isso indicados como primeira escolha ⁽¹³⁾.

As orientações advindas do II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas de 2015 ⁽¹⁴⁾ para o tratamento são:

Na fase aguda:

- a. Deve ser realizado em todos os casos e o mais rápido possível, independentemente da via de transmissão do parasito. Estudos de séries de casos seguidos por mais de 20 anos comprovaram percentuais de cura acima de 50% nesta fase da doença.

Na fase crônica:

- a. Deve ser realizado em todas as crianças até os 12 anos;

- b. Em adolescentes entre 12 e 18 anos e adultos com infecção crônica, quando se consegue estabelecer que a fase aguda ocorreu até 12 anos antes (considerados como infecção recente), o tratamento antiparasitário é geralmente recomendado, embora faltem evidências consistentes de eficácia;
- c. Em indivíduos de 19 a 50 anos, sem infecção recente documentada, o tratamento antiparasitário deve ser considerado de forma individualizada. O tratamento de mulheres cronicamente infectadas em idade fértil, administrado antes da gravidez, tem o efeito de reduzir a transmissão congênita.
- d. Em pacientes com algum grau de imunodeficiência (transplantados, portadores de neoplasias, coinfectados pelo HIV) orienta-se pelo tratamento.
- e. Não é recomendado o tratamento antiparasitário em indivíduos com idade superior a 50 anos, sem cardiopatia avançada.
- f. Não é indicado o tratamento antiparasitário para os indivíduos com a forma cardíaca grave.

Na forma congênita:

- a. Devem receber tratamento antiparasitário nas primeiras semanas ou nove meses após o nascimento, independentemente do diagnóstico ter sido realizado por métodos parasitológicos ou por meio de testes sorológicos convencionais.

1.11 CRITÉRIO DE CURA

A soronegativação é considerada o único parâmetro de cura após o tratamento antiparasitário da doença de Chagas. O tempo necessário para que isto ocorra é variável e depende da fase e do tempo de doença. Os exames

parasitológicos não são obrigatórios como controles de cura do tratamento antiparasitário, porém, em qualquer momento da evolução do paciente, a positividade destes pacientes indica falha terapêutica. Neste sentido, a PCR é uma alternativa aos métodos indiretos (xenodiagnóstico e hemocultura) de avaliação parasitológica, e poderia ser usada como critério de falha terapêutica ⁽¹⁴⁾.

1.12 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os critérios laboratoriais para a definição da infecção chagásica na fase aguda e na fase crônica foram preconizados pelo II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas financiado pelo Ministério da Saúde do Brasil, em 2015 ⁽¹⁴⁾.

Fase aguda

- a. Critério parasitológico: é definido pela presença de parasitos circulantes demonstráveis no exame direto do sangue periférico.
- b. Critério sorológico: a presença de anticorpos anti-*T.cruzi* de classe IgM no sangue periférico é considerada indicativa da fase aguda, particularmente quando associada a alterações clínicas e dados epidemiológicos sugestivos.

Fase crônica

- a. Critério parasitológico: devido à parasitemia subpatente na fase crônica, os métodos parasitológicos convencionais possuem baixa sensibilidade, tornando sua realização desnecessária para o manejo clínico dos pacientes.
- b. Critério sorológico: considera-se indivíduo infectado na fase crônica aquele que apresenta anticorpos anti-*T. cruzi* de classe IgG, detectados por meio de dois testes sorológicos de princípios distintos ou com diferentes preparações antigênicas.

1.12.1 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Alguns dos testes parasitológicos empregados para o diagnóstico da infecção chagásica em âmbito laboratorial são:

- a. Microscopia direta e método de concentração do sangue: é feita a demonstração direta de *T. cruzi* pelo método a fresco (entre lâmina e lamínula) ou após coloração. Ou pelo método de concentração de Strout ou micro-hematócrito, que são, em geral, positivos nas primeiras semanas da doença ⁽¹⁵⁾.
- b. Xenodiagnóstico: é um dos exames parasitológicos aplicados à forma crônica ⁽¹⁶⁾. Apresenta baixa sensibilidade e um resultado negativo não afasta a possibilidade da infecção, mas um exame positivo tem valor diagnóstico absoluto ⁽¹⁴⁾.
- c. Hemocultura: é o cultivo do sangue em meio LIT ("*Liver Infusion Tryptose*") e apresenta variação entre 0% a 94% em sua positividade ⁽¹⁶⁾.

1.12.2 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Existem várias técnicas sorológicas que podem ser aplicadas ao diagnóstico da infecção chagásica, tais como a hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e detecção de antígeno ou anticorpo por ensaio imunoenzimático ⁽¹⁷⁾.

1.12.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

As limitações na sensibilidade e especificidade dos testes laboratoriais parasitológicos e sorológicos, especialmente quando se trata do diagnóstico de fase crônica, justificam o interesse e a necessidade de implantação de um método direto, específico e mais sensível que permita confirmar a etiologia da infecção e monitorar a presença do parasito ⁽¹⁸⁾. Uma alternativa mais sensível aos testes tradicionais é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ⁽¹⁹⁾ que tem sido empregada para a detecção de *T. cruzi* diretamente no sangue de pacientes em fase crônica. A PCR é baseada no emprego de iniciadores sintéticos que amplificam sequências de DNA específicas do parasito ⁽¹⁸⁾. Alguns protocolos têm sido descritos, apresentando diferentes resultados, provavelmente devido aos

diferentes volumes de sangue utilizados e aos diferentes procedimentos de extração ou à região do *T. cruzi* amplificado ⁽¹⁹⁾. Durante a realização da PCR ocorre a amplificação de fragmentos oriundos do DNA genômico ou do DNA de minicírculos do cinetoplasto do parasito (k-DNA). Para a realização de estudos de monitoramento terapêutico com testes periódicos e sistemáticos dos indivíduos recomenda-se a utilização de técnica molecular associada à sorologia ⁽²⁰⁾.

1.13 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)

Esse método combina a cinética da PCR convencional com a detecção simultânea por fluorescência do produto amplificado. Em geral, é consideravelmente mais rápida, simples de executar, sensível e específica do que os métodos convencionais. E por realizar a amplificação e detecção simultâneas, o risco de contaminação é consideravelmente menor. Esses atributos tornam a técnica muito atraente para o diagnóstico de doenças infecciosas ⁽²¹⁾.

1.14 DEFINIÇÃO DE “CURA” NA DOENÇA DE CHAGAS

A definição de cura da doença de Chagas em pacientes tratados depende de aspectos clínicos e parasitológicos, havendo ainda muita controvérsia sobre os critérios a serem adotados ⁽²²⁾. Essa falta de consenso leva a diversas interpretações. De um lado temos os defensores dos testes sorológicos, para os quais a cura fica evidenciada pela soronegativação. O tempo para tal negativação é assunto de grande divergência entre os autores, variando de um a 30 anos. De outro lado, os defensores dos testes parasitológicos (hemocultura e xenodiagnóstico) como ferramentas a serem usadas para avaliação de cura, deparam-se com a baixa sensibilidade destes testes na fase crônica, gerando resultados falso-negativos. Considerando estas controvérsias, os testes moleculares quantitativos têm sido úteis na avaliação da resposta terapêutica e da eficácia do tratamento, já que eles apresentam maior sensibilidade em relação à

hemocultura e xenodiagnóstico durante a fase aguda da infecção, nos casos congênitos e em episódios de reativação. Em comparação aos testes sorológicos, os testes moleculares permitem a detecção em curto espaço de tempo de falha terapêutica ⁽²³⁾.

Estudo multicêntrico internacional realizado com a participação ⁽²⁴⁾ de 16 laboratórios especializados em PCR realizou testes com iniciadores do DNA mitocondrial (minicírculos) e do DNA nuclear (minissatélite) de *T. cruzi*. Concluíram que o DNA nuclear minissatélite apresentou maior especificidade, porém o limiar de detecção foi da ordem de 0,05-0,5 parasitos/mL, enquanto os testes com kDNA foram mais sensíveis, detectando 0,005 parasitos/mL. Portanto ainda não há consenso sobre a superioridade dos iniciadores do DNA mitocondrial (kDNA) ou do DNA nuclear (nDNA) como alvo na detecção de *T. cruzi*.

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Pacientes com doença de Chagas em tratamento ou aqueles que apresentem algum grau de imunodeficiência precisam ser monitorados para avaliação da negatificação (cura) ou reativação da doença. As técnicas sorológicas são os testes indicados para o diagnóstico da infecção, porém são pouco efetivas para avaliar a resposta ao tratamento, pelo fato de poderem demorar vários anos para apresentar soronegativação, sendo igualmente inadequadas para avaliar episódios de reativação. A hemocultura e o xenodiagnóstico possuem elevada especificidade, porém baixa sensibilidade, requerendo de 30 a 120 dias para a liberação do resultado final, podendo gerar resultados falso-negativos sobretudo na fase crônica da infecção quando as parasitemias são muito baixas ⁽¹⁶⁾. Diante disso, testes moleculares como a PCR se apresentam como ferramentas diagnósticas extremamente sensíveis e específicas, que nos permitem utilizar vários alvos moleculares do parasito. Enquanto a PCR convencional permite a distinção entre amostras positivas e negativas, a PCR em tempo real pode ser utilizada para detectar e quantificar a carga parasitária em determinada amostra, permitindo o diagnóstico e monitoramento de pacientes em tratamento. Sendo assim, a escolha dos alvos de amplificação e dos iniciadores da qPCR é desafiadora, já que ainda não existe consenso na literatura sobre a melhor sequência alvo de amplificação e os melhores iniciadores. Desse modo, nossa proposta de padronização e validação de dois sistemas de amplificação quantitativa para a detecção do DNA mitocondrial e nuclear de *Trypanosoma cruzi* tentará responder a essa pergunta utilizando amostras sanguíneas e teciduais de camundongos Swiss infectados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar e validar duas amplificações em tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação de *T. cruzi* em amostras sanguíneas e teciduais de camundongos Swiss infectados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Padronizar duas qPCR com iniciadores do DNA nuclear (F2/ B3) e do DNA mitocondrial (32F/148R) de *T. cruzi*;
- b. Avaliar as duas qPCR utilizando amostras de sangue e tecidos de camundongos infectados e não infectados;
- c. Determinar e comparar a frequência e a magnitude de resultados positivos obtidos pelas duas qPCR, em diferentes tempos da infecção chagásica murina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) que integra a Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, em 16 de julho de 2014, com o número de processo 000280 A (anexo I).

4.2 CEPA DE *T. cruzi*

A cepa Y de *Trypanosoma cruzi* ⁽²⁵⁾ foi cedida pelo Laboratório de Parasitologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, onde é mantida em camundongos Swiss e em meio de cultura (LIT).

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE E ÓRGÃOS E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA NAS AMOSTRAS

As extrações de DNA das amostras de sangue e dos órgãos de camundongos foram feitas com o kit da QIAGEN (QIAmp® DNA Mini Kit), de acordo com as instruções do fabricante, diferindo apenas no volume inicial da amostra, para o sangue iniciou-se com um volume de 200 µL, enquanto que para os órgãos foram utilizados 25 mg do tecido.

Para quantificar o DNA utilizou-se o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific - Wilmington - Estados Unidos), em comprimento de onda de 260 nm.

4.4 INICIADORES UTILIZADOS NO ESTUDO

Inicialmente, para avaliar se as amostras continham inibidores da amplificação e se o DNA extraído apresentava qualidade suficiente para ser amplificado, foram utilizados iniciadores que amplificam um fragmento de 651 bp da subunidade 18S do DNA ribossomal de organismos eucariotos, seguindo o protocolo descrito na literatura ⁽²⁶⁾.

a. *Sense* NS31: 5' - TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC - 3'

b. *Anti-sense* NS41: 5' - CCCGTGTTGAGTCAAA TTA - 3'

A sequência TCZ (DNA nuclear) foi inicialmente utilizada por Moser et al.,⁽²⁷⁾ para o diagnóstico molecular da doença de Chagas e os iniciadores F2 e B3 desta mesma sequência foram validados por Braz et al.,⁽²⁸⁾ amplificando um fragmento de 144 pares de bases (pb).

a. *Sense* F2: 5' - TGCACTCGGCTGATCGTTTTTCGAG - 3'

b. *Anti-sense* B3: 5' - AGGGTTGTTTGGTGTCCAGTGTGTG - 3'

Já os iniciadores 32F e 148R do kDNA (DNA mitocondrial), previamente descritos na literatura^(24,29), amplificam fragmento de 118 pb do minicírculo do kDNA de *T. cruzi*.

a. *Sense* 32F: 5' - TTTGGGAGGGGCGTTCA - 3'

b. *Anti-sense* 148R: 5' - ATATTACACCAACCCCAATCGAA - 3'

4.5 CURVA PADRÃO

A padronização da qPCR foi feita no termociclador 7500 *Real-Time PCR System* da *Applied Biosystems*® do Laboratório de Protozoologia, e no termociclador *Applied Biosystems*® StepOne do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. As qPCR foram realizadas com reagente comercial contendo o marcador fluorescente *SYBR Green* (Máxima *SYBR Green*/ROX qPCR Master Mix da Thermo Scientific, K0223, Waltham MA USA). A partir da solução de DNA de *T. cruzi* contendo 10^4 parasitos/ μ L, extraída conforme metodologia citada acima, foram utilizados 2 μ L (DNA de 2×10^4 parasitos) para a realização de diluição seriada 1/10 em água deionizada. Para as qPCR utilizamos curvas de calibração com sete pontos, correspondendo a: 200 parasitos; 20; 2; 2×10^{-1} ; 2×10^{-2} ; 2×10^{-3} e 2×10^{-4} frações de um parasito. A cada uma das diluições da curva de calibração foram adicionados

50 ng de DNA extraído de sangue de camundongo Swiss livre de infecção. Nas curvas-padrão utilizadas nos testes de amostras de tecidos foram adicionados 50 ng de DNA do mesmo tecido, proveniente de camundongo livre de infecção (DNA de tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino grosso, músculo esquelético, pulmão e rins) ^(30,31).

4.6 TESTES DE ESPECIFICIDADE

Foram realizados testes de especificidade (Tabela 1) com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial utilizando amostras de DNA de outros parasitos. Cada amostra de DNA dos microrganismos citados na tabela foi testada três vezes usando diferentes concentrações de DNA.

- a. ***Crithidia fasciculata***: pertence à família Trypanosomatidae e é parasito exclusivo de insetos da ordem Diptera, Hemiptera e Himenoptera. ⁽³²⁾;
- b. ***Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis***: existe proximidade filogenética entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*, ambos pertencentes à família Trypanosomatidae ⁽³³⁾;
- c. ***Leptomonas seymouri***: é um tripanossomatídeo parasito de insetos, filogeneticamente muito próximo de *Leishmania* spp ⁽³²⁾;
- d. ***Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii***: ambos os parasitos podem causar infecções com quadro clínico semelhante aos causados pela doença de Chagas.

Tabela 1. Teste de especificidade. Parasitos testados, cepa e origem.

Microrganismo	Cepa	Origem
<i>Crithidia fasciculata</i>	TCC 039	Coleção de tripanossomatídeos do ICB- USP
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	MHO/BR/73/M2269	Dr. José Angelo L. Lindoso ¹
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2903	Dr. José Angelo L. Lindoso ¹
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147	Dr. José Angelo L. Lindoso ¹
<i>Leptomonas seymouri</i>	TC 011E	Prof. Dr. Paulo Cotrim ¹
<i>Plasmodium falciparum</i>	Palo Alto	Dra. Sandra do Lago Moraes ¹ Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade
<i>Toxoplasma gondii</i>	ME49	Jr. ²

¹ Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT-USP

² Laboratório de Protozoologia do IMT-USP

4.7 ANIMAIS – CAMUNDONGOS

O camundongo *Swiss*, linhagem não isogênica, é considerado um modelo animal adequado para a finalidade da presente pesquisa, sendo frequentemente utilizado em estudos com *T. cruzi* ^(34,35,36). Os animais utilizados foram camundongos *Swiss* adultos e do sexo feminino ⁽³⁴⁾, com peso aproximado de 20 gramas, e seis semanas de vida. Os animais foram adquiridos do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério do Instituto de Medicina Tropical – USP. A criação, manutenção e experimentação dos camundongos seguiu os protocolos preconizados, com eutanásia dos animais em câmara de CO₂ ^(37,38).

4.8 TAMANHO AMOSTRAL

O cálculo do número de animais a ser utilizado em cada grupo foi baseado em casuísticas de estudos anteriores ^(30,34,35,39), garantindo a existência de animais suficientes para o cálculo de médias e medianas, totalizando 32 camundongos.

- a. Grupo 1: 8 animais não infectados cujas amostras de sangue e de tecidos (livres de infecção) foram usadas para a construção das curvas de calibração das duas qPCR;

- b. Grupo 2: 8 animais infectados pelo *T. cruzi*, cujas amostras foram obtidas no 13º dia após a infecção experimental, correspondendo à metade da fase aguda;
- c. Grupo 3: 8 animais infectados pelo *T. cruzi*, cujas amostras foram obtidas no 26º dia após a infecção experimental, correspondendo ao final da fase aguda;
- d. Grupo 4: 8 animais infectados pelo *T. cruzi*, cujas amostras foram obtidas no 61º dia após a infecção experimental, correspondendo à fase crônica da infecção.

Os três períodos considerados representativos foram o 13º, 26º e 61º dias pós-infecção (dpi). Estes dias de coleta foram selecionados com base no projeto piloto da tese de doutorado do aluno Júlio César Rente Ferreira Filho que avaliou a carga parasitária em oito tempos de coleta após a infecção experimental, isto é, no 5º, 10º, 13º, 18º, 26º, 47º, 53º e 61º dpi. O 13º dpi foi selecionado como representante da fase aguda da infecção, sendo as cargas parasitárias encontradas neste dia semelhantes àsquelas dos dias 5º, 10º, 13º e 18º dpi, isto é, cargas parasitárias mais elevadas. O 26º dpi foi selecionado para representar o final da fase aguda (cargas parasitárias de moderada intensidade) e, finalmente, o 61º dpi foi selecionado para representar a fase crônica da infecção, com resultados semelhantes aos obtidos no 47º e 53º dpi.

4.9 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DOS CAMUNDONGOS E COLHEITA DE AMOSTRAS

A infecção experimental foi realizada em camundongos *Swiss* de seis semanas, por meio de injeção intraperitoneal contendo 10^3 formas tripomastigotas viáveis da cepa Y de *T. cruzi*, após contagem em câmara de Neubauer. Esse inóculo permite ao camundongo passar pela fase aguda, sobreviver mesmo sem tratamento, e atingir a fase crônica da infecção ⁽³⁵⁾. Para a confirmação da infecção,

a partir do 3º dpi foi realizado exame microscópico direto do sangue obtido da cauda de cada animal. Este dia foi determinado em estudo anterior de nosso grupo com a mesma cepa Y. O dia no qual a parasitemia tem início é variável e depende da cepa de *T. cruzi* e do tipo de camundongo (isogênico ou não), e ao tamanho do inóculo.

A definição dos dias de colheita, que deveriam corresponder a diferentes intensidades de carga parasitária (13º, 26º e 61º dpi) no modelo murino selecionado, o camundongo Swiss, foi feita com base nos protocolos previamente estabelecidos ^(30,34,35) e, como já citado anteriormente, em estudos prévios de uma tese de doutorado do grupo. As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca, e também foram obtidas amostras de 10 órgãos, a saber: cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rim, intestino, glândulas adrenais, tecido adiposo e tecido muscular esquelético. Os órgãos inteiros foram retirados com o uso de instrumentos cirúrgicos estéreis, lavados com solução salina 0,9%, acondicionados em microtubos e conservados em freezer a -86°C.

4.10 MICROSCOPIA ÓPTICA E CULTURA DE *T. cruzi* (TESTES DE REFERÊNCIA)

Alíquotas de sangue procedentes de cada animal, obtidas nos períodos definidos foram examinadas entre lâmina e lamínula, por microscopia óptica (Nikon, Eclipse, E200, 400X) para pesquisa do parasito. Ao mesmo tempo, as amostras de sangue foram semeadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) e examinadas no 30º e 60º dias após a semeadura para a liberação dos resultados das hemoculturas.

4.11 CARGA PARASITÁRIA

A carga parasitária foi estimada pela comparação com os valores da curva padrão contendo concentrações conhecidas e decrescentes de parasitos ⁽³⁰⁾. Os valores de carga parasitária (parasitos/ 50 ng de DNA extraído) foram obtidos pela

média dos valores das triplicatas, e, posteriormente, em cada grupo, pelo cálculo da mediana dos valores das cargas parasitárias dos animais que formaram cada grupo (n= 8 animais).

4.12 VALIDAÇÃO DA qPCR

Seguindo as orientações estabelecidas por Broeders et al ⁽⁴⁰⁾, os seguintes parâmetros foram levados em consideração para o processo de validação das duas técnicas de qPCR:

- a. Aplicabilidade: este parâmetro está relacionado ao escopo do método, ou seja, o alvo molecular, concentrações de DNA, presença de possíveis inibidores da reação e a matriz ou matrizes biológicas utilizadas;
- b. Especificidade: diz respeito à capacidade dos iniciadores de não amplificar outros alvos moleculares, pertencentes a outros microrganismos, e se refere à geração de resultados falso-positivos;
- c. Sensibilidade: pode ser expressa pelo limite de detecção da qPCR que deve ser o maior possível (detecção da menor quantidade possível do alvo), desta forma evitando que se produza resultados falso-negativos;
- d. Eficiência: a condição para validação são valores entre 90% e 110%;
- e. Linearidade (R^2): a condição para validação são valores de $R^2 \geq 0.98$;
- f. Reprodutibilidade: o coeficiente de variação do desvio-padrão deve ser $\leq 25\%$;
- g. Repetibilidade: o coeficiente de variação do desvio-padrão deve ser $\leq 25\%$.

4.13 REPRODUTIBILIDADE E REPETIBILIDADE

A reprodutibilidade, para os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial no 13^o, 26^o e 61^o dpi, foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV) do desvio-padrão (DP) obtidos após três ensaios da curva padrão, realizados em dias e laboratórios diferentes, usando dois equipamentos distintos ⁽⁴¹⁾, o termociclador 7500 *Real-Time*

PCR System da *Applied Biosystems*® do Laboratório de Protozoologia, e o termociclador *Applied Biosystems*® StepOne do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, ambos os laboratórios pertencentes ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

A repetibilidade, para os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) do desvio-padrão (DP) de nove amostras com cargas parasitárias alta (n=3), média (n=3) e baixa (n=3) testadas no mesmo ensaio, em poços diferentes da microplaca. Estas amostras foram selecionadas mediante sorteio, de acordo com o valor de carga parasitária determinado por qPCR, e não levaram em consideração o tipo de matriz biológica, isso é, amostras de DNA provenientes de extração de sangue e amostras dos órgãos ⁽⁴¹⁾.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A carga parasitária foi analisada utilizando a média dos valores da triplicata de cada amostra, e, posteriormente, a mediana dos valores das oito médias de carga parasitária dos animais de cada grupo. As comparações entre grupos de animais foram feitas com o teste não paramétrico de Mann Whitney U (Mann-Whitney- Wilcoxon). Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes aquelas com valor de $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%. Os gráficos em barras apresentam a mediana dos valores. A comparação de C_T foi realizada com os valores das medianas e avaliadas pelo teste estatístico Mann Whitney, seguindo recomendações descritas em Belaz et al ⁽⁴²⁾. Todas as análises foram realizadas com o software Graph Pad Prism, versão 5.0, e empregaram os mesmos testes estatísticos de outros estudos ^(30,43,44).

5 RESULTADOS

5.1 MICROSCOPIA E HEMOCULTURA – MÉTODOS DE REFERÊNCIA

Conforme descrito na seção de materiais e métodos, as alíquotas de sangue de cada animal foram obtidas nos três tempos de coleta (13º, 26º e 61º dpi) e cultivadas em meio LIT.

- a. No 13º dpi, 100% (8/8) dos animais apresentaram resultados positivos por microscopia e também nas hemoculturas (com leitura no 30º e 60º dia);
- b. No 26º dpi, 87,5% (7/8) dos animais apresentaram resultados positivos por microscopia. Na hemocultura, no 30º dia, 50% dos animais (4/8) foram positivos, e na leitura do 60º dia, 50% (4/8) foram positivos;
- c. No 61º dpi, 100% (8/8) dos animais apresentaram resultados negativos por microscopia. Na leitura da hemocultura no 30º dia, 12,5% dos animais (1/8) foram positivos, e na leitura do 60º dia, 25% (2/8) foram positivos.

5.2 VALIDAÇÃO DAS DUAS qPCR

5.2.1 APLICABILIDADE

A aplicabilidade de cada uma das qPCR depende em primeiro lugar das duas técnicas terem sido adequadamente padronizadas.

Na etapa de padronização foram definidos os parâmetros finais de concentração dos reagentes e os ciclos de amplificação para as qPCR, com os iniciadores do DNA nuclear (F2/B3) e DNA mitocondrial (32F/148R), de acordo com as Tabelas 1 e 2. Ainda nesta etapa foram testadas várias concentrações de DNA genômico de camundongo que foram acrescidas de DNA de *T. cruzi* em diluições crescentes (spiked samples) para a realização das duas qPCR. A quantidade de DNA genômico de camundongo variou de 20 a 200 nanogramas (ng), tendo sido escolhida a quantidade de DNA de 50 ng pelo fato de ter sido aquela na qual as amplificações foram as mais sensíveis e específicas, nos dois sistemas.

Não foi constatado nenhum fenômeno de inibição das duas qPCR quando foram testadas amostras de sangue e órgãos. Ao executar as reações de qPCR usando DNA extraído de diferentes matrizes biológicas (sangue/órgãos), todos os tipos de material biológico puderam ser amplificados.

Tabela 2 - Concentração de reagentes das duas qPCR.

Reagentes	Volume (μL)	[] Final
Master Mix	12.50	---
H ₂ O	10.26	---
Iniciador I (40 μM)	0,12	0.2 μM
Iniciador II (40 μM)	0,12	0.2 μM
DNA genômico total	2,0	50 ng
Volume final	25	---

Tabela 3 - Ciclos de amplificação das duas qPCR.

Etapa	Temperatura/ Tempo		Nº de ciclos
	DNA nuclear (F2\B3)	DNA mitocondrial (32F\148R)	
Desnaturação inicial	95°C/10'	95°C/10'	1
Desnaturação	95°C/15"	95°C/15"	39
Anelamento	67°C/30"	60°C/30"	
Extensão	-	72°C/30"	

Tempo: (') minutos. (") segundos

5.2.2 ESPECIFICIDADE

Nenhuma das amostras de sangue ou provenientes dos diferentes órgãos dos animais não infectados foi amplificada pelas duas qPCR. Da mesma forma, nenhuma das amostras de DNA de outros parasitos (*Crithidia fasciculata*, *Leishmania* (L.) *amazonensis*, *Leishmania* (V.) *braziliensis* e *Leishmania* (V.) *guyanensis*, *Leptomonas seymouri*, *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*) apresentou amplificação, evidenciando 100% de especificidade dos iniciadores utilizados no presente estudo.

A análise da curva de *melting* que é realizada após o término dos ciclos de amplificação é uma maneira de verificar as reações de PCR em tempo real com relação à produção de amplificadores espúrios, como por exemplo, dímeros de

oligonucleotídeos iniciadores, para verificar a presença de “contaminação” e também para assegurar a especificação da reação ⁽⁴⁵⁾. Para que uma amostra fosse considerada positiva a temperatura de *melting* deveria ser de $79,8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para o DNA nuclear e de $78,1^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para o DNA mitocondrial, e os valores de C_T (*threshold cycle*) das replicatas das amostras não poderiam ter variação de mais de 1 C_T . O pico da curva de *melting* ocorreu na temperatura de $79,8^{\circ}\text{C}$ para os iniciadores do DNA nuclear (Figura 1- A) e $78,1^{\circ}\text{C}$ para os iniciadores do DNA mitocondrial (Figura 1 - B).

Figura 1 - **A** - Temperatura de $79,8^{\circ}\text{C}$ para a curva de *melting* obtida com os iniciadores do DNA nuclear. **B** - Temperatura de $78,1^{\circ}\text{C}$ para a curva de *melting* obtida com os iniciadores do DNA mitocondrial.

5.2.3 LIMITE DE DETECÇÃO OU SENSIBILIDADE ANALÍTICA

Conforme as Figuras 2 - A e 2 - B, o limite de detecção da curva padrão com os iniciadores do DNA nuclear foi de 0,002 de parasito, e com os iniciadores do DNA mitocondrial foi de 0,0002 de parasito, isto é, os dois sistemas foram capazes de detectar frações de um único parasito.

Figura 2 -

A - Curva padrão com os iniciadores do DNA nuclear. **B** - Curva padrão com os iniciadores do DNA mitocondrial de *T. cruzi*. Diluições: 2×10^2 ; 2×10^1 ; 2×10^0 ; 2×10^{-1} , 2×10^{-2} , 2×10^{-3} e 2×10^{-4} de parasito. Testes realizados em triplicata.

5.2.4 EFICIÊNCIA DAS DUAS qPCR

Todas as amplificações realizadas com ambos os pares de iniciadores, nos três tempos analisados, tiveram eficiência compreendida entre 90 -110% ^(40,46).

5.2.5 REPETIBILIDADE

Para os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, nos três tempos, todos os valores do coeficiente de variação (CV) do desvio-padrão (DP) foram inferiores a 25%, sendo que, para os iniciadores do DNA nuclear o CV variou de 0,28% a 23,35%, e para os iniciadores do DNA mitocondrial de 1,25% a 16,10%. Os valores podem ser conferidos na Tabela 3 e 4. O cálculo do valor de repetibilidade foi feito seguindo recomendações de Broeders et al ⁽⁴⁰⁾.

Tabela 4 - Repetibilidade dos iniciadores do DNA nuclear avaliada por meio de 3 repetições de nove amostras representativas da fase aguda e crônica da infecção (valores baixos, médios e elevados de carga parasitária).

Tempo	Amostra	1º poço parasitos/ 50 ng de DNA	2º poço parasitos/ 50 ng de DNA	3º poço parasitos/ 50 ng de DNA	Média	DP (+/-)	CV (%)
13º dpi	1	1678,509	1646,263	1682,042	1668,938	19,716	1,18
	2	1532,500	1513,430	1522,195	1522,708	9,545	0,63
	3	1738,191	1747,925	1742,200	1742,772	4,892	0,28
26º dpi	4	5,012	4,464	3,903	4,460	0,554	12,43
	5	5,735	5,613	5,588	5,645	0,079	1,39
	6	6,892	5,426	6,126	6,148	0,733	11,92
61º dpi	7	0,026	0,027	0,028	0,027	0,001	4,84
	8	0,031	0,037	0,032	0,033	0,003	9,42
	9	0,011	0,017	0,016	0,015	0,003	23,35

DP = desvio-padrão. CV = coeficiente de variação

Tabela 5 - Repetibilidade dos iniciadores do DNA mitocondrial avaliada por meio de 3 repetições de cada uma das nove amostras representativas da fase aguda e crônica da infecção.

Tempo	Amostra	1º poço parasitos/ 50 ng de DNA	2º poço parasitos/ 50 ng de DNA	3º poço parasitos/ 50 ng de DNA	Média	DP (+/-)	CV(%)
13º dpi	1	159,452	147,908	141,837	149,732	8,948	5,98
	2	235,580	243,352	258,296	245,743	11,545	4,70
	3	375,377	383,828	389,893	383,033	7,291	1,90
26º dpi	4	0,779	0,760	0,768	0,769	0,010	1,25
	5	0,897	0,850	0,800	0,849	0,049	5,74
	6	0,664	0,733	0,661	0,686	0,041	5,93
61º dpi	7	0,033	0,033	0,030	0,032	0,001	4,45
	8	0,055	0,053	0,041	0,050	0,008	16,10
	9	0,036	0,040	0,029	0,035	0,005	14,50

DP = desvio padrão. CV = coeficiente de variação

5.2.6 REPRODUTIBILIDADE E LINEARIDADE

Na análise da reprodutibilidade com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, nos três tempos, todos os valores do coeficiente de variação (CV) do desvio-padrão (DP) foram inferiores a 25%, sendo que, para os iniciadores do DNA nuclear a variação do CV foi de 0,16 a 14,63%, e para os iniciadores do DNA mitocondrial de 1,48% a 22,38%. Os valores podem ser conferidos nas Tabelas 5,

6, 7, 8, 9 e 10. Na análise da linearidade com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, nos três tempos, todos os valores de R^2 foram ≥ 0.98 .

O cálculo dos dois parâmetros (reprodutibilidade e linearidade) foi feito seguindo recomendações de Broeders et al ⁽⁴⁰⁾.

Tabela 6 - Avaliação da reprodutibilidade usando a curva padrão dos iniciadores do DNA nuclear, no tempo 13^o dpi.

Parasitos/ μ L	1 ^o ensaio (C _T)	2 ^o ensaio (C _T)	3 ^o ensaio (C _T)	Média	DP (+/-)	CV (%)
200	19,56	19,30	21,33	20,06	1,105	5,51
20	23,06	22,75	25,47	23,76	1,489	6,27
2	26,39	26,23	29,01	27,21	1,561	5,74
2×10^{-1}	29,27	28,84	30,98	29,70	1,132	3,81
2×10^{-2}	33,21	33,34	33,60	33,38	0,199	0,59
2×10^{-3}	35,79	35,98	36,96	36,24	0,628	1,73
2×10^{-4}	-	-	-	-	-	-
Linearidade (R^2)	0,990	0,983	0,987	0,987	0,004	

DP= desvio padrão CV = Coeficiente de variação

Tabela 7 - Avaliação da reprodutibilidade usando a curva padrão dos iniciadores do DNA nuclear, no tempo 26^o dpi.

Parasitos/ μ L	1 ^o ensaio (C _T)	2 ^o ensaio (C _T)	3 ^o ensaio (C _T)	Média	DP (+/-)	CV (%)
200	15,84	16,63	15,73	16,07	0,491	3,06
20	19,58	19,6	19,64	19,61	0,031	0,16
2	23,34	22,99	23,04	23,12	0,189	0,82
2×10^{-1}	28,43	26,29	25,54	26,75	1,500	5,61
2×10^{-2}	30,34	30,05	29,51	29,97	0,421	1,41
2×10^{-3}	32,59	32,17	32,87	32,54	0,352	1,08
2×10^{-4}	35,12	35,25	35,55	35,31	0,221	0,62
Linearidade (R^2)	0,996	0,995	0,997	0,996	0,001	

Tabela 8 - Avaliação da reprodutibilidade usando a curva padrão dos iniciadores do DNA nuclear, no tempo 61^o dpi.

Parasitos/ μ L	1 ^o ensaio (C _T)	2 ^o ensaio (C _T)	3 ^o ensaio (C _T)	Média	DP (+/-)	CV (%)
200	20,20	20,24	24,16	21,53	2,275	10,56
20	22,78	23,20	28,13	24,70	2,975	12,04
2	25,94	27,07	33,77	28,93	4,232	14,63
2×10^{-1}	30,07	30,18	30,23	30,16	0,082	0,27
2×10^{-2}	35,07	32,86	36,64	34,86	1,899	5,45
2×10^{-3}	35,64	35,11	35,34	35,36	0,266	0,75
2×10^{-4}	-	-	-	-	-	-
Linearidade (R^2)	0,988	0,988	0,990	0,9887	0,001	

DP= desvio padrão CV = Coeficiente de variação
DP= desvio padrão CV = Coeficiente de variação

Tabela 9 - Avaliação da reprodutibilidade usando a curva padrão dos iniciadores do DNA mitocondrial, no tempo 13º dpi.

Parasitos/ μ L	1ºensaio (C _T)	2ºensaio (C _T)	3ºensaio (C _T)	Média	DP(+/-)	CV(%)
200	18,83	16,63	11,914	15,79	3,533	22,38
20	22,13	20,72	16,36	19,74	3,008	15,24
2	28,35	24,19	20,19	24,24	4,080	16,83
2 x 10 ⁻¹	32,48	28,51	23,47	28,15	4,516	16,04
2 x 10 ⁻²	33,22	31,12	26,75	30,36	3,301	10,87
2 x 10 ⁻³	35,34	35,38	29,46	33,39	3,406	10,20
2 x 10 ⁻⁴	37,12	37,47	31,86	35,48	3,143	8,86
Linearidade (R ²)	0,999	0,992	0,987	0,993	0,006	

DP= desvio padrão CV = Coeficiente de variação

Tabela 10 - Avaliação da reprodutibilidade usando a curva padrão dos iniciadores do DNA mitocondrial, no tempo 26º dpi.

Parasitos/ μ L	1ºensaio (C _T)	2ºensaio (C _T)	3ºensaio (C _T)	Média	DP(+/-)	CV(%)
200	23,86	20,48	17,88	20,74	2,998	14,46
20	25,87	23,29	21,28	23,48	2,301	9,80
2	30,04	26,63	24,62	27,10	2,740	10,11
2 x 10 ⁻¹	33,38	30,15	28,00	30,51	2,708	8,88
2 x 10 ⁻²	35,25	33,05	31,37	33,22	1,946	5,86
2 x 10 ⁻³	36,45	36,38	33,33	35,39	1,781	5,03
2 x 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-
Linearidade (R ²)	0,982	0,995	0,988	0,9883	0,007	

DP= desvio padrão CV = Coeficiente de variação

Tabela 11 - Avaliação da reprodutibilidade usando a curva padrão dos iniciadores do DNA mitocondrial, no tempo 61º dpi.

Parasitos/ μ L	1ºensaio (C _T)	2ºensaio (C _T)	3ºensaio (C _T)	Média	DP(+/-)	CV(%)
200	15,10	15,23	15,81	15,38	0,378	2,46
20	18,35	17,79	18,10	18,08	0,281	1,55
2	21,69	22,05	22,34	22,03	0,326	1,48
2 x 10 ⁻¹	25,66	27,23	24,63	25,84	1,309	5,07
2 x 10 ⁻²	28,34	30,95	28,05	29,11	1,597	5,49
2 x 10 ⁻³	31,36	32,89	31,71	31,99	0,802	2,51
2 x 10 ⁻⁴	35,34	35,20	33,77	34,77	0,869	2,50
Linearidade (R ²)	0,993	0,986	0,994	0,991	0,004	

DP= desvio padrão CV = Coeficiente de variação

5.3 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM SANGUE E ÓRGÃOS

5.3.1 CARGA PARASITÁRIA NO SANGUE (PARASITEMIA)

O teste de Mann-Whitney encontrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao comparar a mediana das parasitemias obtidas com as duas qPCR (DNA nuclear e kDNA), nos três tempos de coleta (Figura 3). Os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, respectivamente, apresentaram medianas referentes às cargas parasitárias nos 3 diferentes períodos, conforme indicado abaixo.

Comparação das medianas do DNA nuclear vs *primers* do DNA mitocondrial:

13º dpi: 513937,0 vs 16035,0 ($p = 0.0003$)

26º dpi: 97,48 vs 27,28 ($p = 0.0093$)

61º dpi: 63,650 vs 11,26 ($p = 0.0207$)

Figura 3 – Sangue. Comparação das medianas (Mann-Whitney) das parasitemias dos 8 animais infectados, e analisados com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, em três diferentes tempos de coleta (13º, 26º e 61ºdpi).

5.3.2 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO CARDÍACO

O teste de Mann-Whitney encontrou diferença estatisticamente significativa em amostras de coração ao comparar a mediana das cargas parasitárias obtidas com as duas qPCR apenas no tempo 61º dpi (Figura 4). Os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, respectivamente, apresentaram medianas referentes às cargas parasitárias nos 3 diferentes períodos, conforme indicado abaixo.

Comparação DNA nuclear vs mitocondrial no coração:

13º dpi: 3.773 vs 1.714,5 ($p = 0.1807$)

26º dpi: 91,2 vs 11,6 ($p = 0.0530$)

61º dpi: 11,0 vs 0,01 ($p = 0.0012$)

Figura 4 –Tecido cardíaco.

Comparação das medianas das cargas parasitárias dos 8 animais infectados e analisados com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, em três diferentes tempos (13º, 26º e 61ºdpi).

5.3.3 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO CEREBRAL

Em amostras do tecido cerebral observou-se diferença estatisticamente significativa ao se comparar a mediana das cargas parasitárias obtidas com as duas qPCR nos tempos 26^o e 61^o dpi, o que não ocorreu no 13^o dpi. (Figura 5). Os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, respectivamente, apresentaram medianas referentes às cargas parasitárias nos 3 diferentes períodos, conforme indicado abaixo.

Comparação DNA nuclear vs mitocondrial no cérebro:

13^o dpi: 33,8 vs 45,3 (p=0.6454)

26^o dpi: 201,5 vs 17,6 (**p=0.0006**)

61^o dpi: 0,76 vs 0,03 (**p= 0.0012**)

Figura 5 – Tecido cerebral.

Comparação das medianas das cargas parasitárias dos 8 animais infectados e analisados com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, em três diferentes tempos (13^o, 26^o e 61^odpi).

5.3.4 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO PULMONAR

Em amostras do tecido pulmonar observou-se diferença estatisticamente significativa ao se comparar a mediana das cargas parasitárias obtidas com as duas qPCR nos tempos 26º e 61º dpi, o que não ocorreu no 13º dpi. (Figura 6). Os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, respectivamente, apresentaram medianas referentes às cargas parasitárias nos 3 diferentes períodos, conforme indicado abaixo.

Comparação DNA nuclear vs mitocondrial no pulmão:

13º dpi: 70,1 vs 52,6 ($p=0.9591$)

26º dpi: 12,9 vs 1,1 ($p= 0.0043$)

61º dpi: 0,9 vs 0,005 ($p=0.0003$)

Figura 6 – Tecido pulmonar.

Comparação das medianas das cargas parasitárias dos 8 animais infectados e analisados com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, em três diferentes tempos (13º, 26º e 61ºdpi)

5.3.5 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO HEPÁTICO

Observou-se diferença estatisticamente significativa em amostras do tecido hepático ao se comparar a mediana das cargas parasitárias obtidas com as duas qPCR, nos tempos 26º e 61º dpi, o que não ocorreu no 13º dpi (Figura 7). Os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, respectivamente, apresentaram medianas referentes às cargas parasitárias nos 3 diferentes períodos, conforme indicado abaixo.

Comparação DNA nuclear vs mitocondrial no fígado:

13º dpi: 142,3 vs 54,6 ($p= 0.0530$)

26º dpi: 3,3 vs 0,1 ($p= 0.0043$)

61º dpi: 0,1 vs 0,0009 ($p= 0.0002$)

Figura 7 – Tecido hepático.

Comparação das medianas das cargas parasitárias dos 8 animais infectados e analisados com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, em três diferentes tempos (13º, 26º e 61ºdpi)

5.3.6 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO ESPLÊNICO

Em amostras do baço observou-se diferença estatisticamente significativa ao se comparar a mediana das cargas parasitárias obtidas com as duas qPCR, nos tempos 26^o e 61^o dpi, o que não foi observado no 13^o dpi (Figura 8). Os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, respectivamente, apresentaram medianas de carga parasitária conforme indicado abaixo.

Comparação DNA nuclear vs mitocondrial no baço:

13^o dpi: 229,8 vs 191,2 (p= 0.6031)

26^o dpi: 209,9 vs 13,5 (**p= 0.0003**)

61^o dpi: 0,5 vs 0,003 (**p= 0.0006**)

Figura 8 – Tecido esplênico.

Comparação das medianas das cargas parasitárias dos 8 animais infectados e analisados com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, em três diferentes tempos (13^o, 26^o e 61^odpi)

5.3.7 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO RENAL

Observou-se diferença estatisticamente significativa em tecido renal ao se comparar a mediana das cargas parasitárias obtidas com as duas qPCR, nos tempos 13^o e 26^o dpi, o que não se observou no 61^o dpi. Contrariamente ao que ocorreu em outros órgãos, nos tempos de coleta 26^o e 61^o dpi houve também uma maior quantificação dada pelos iniciadores do DNA mitocondrial (Figura 9). Os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, respectivamente, apresentaram medianas referentes às cargas parasitárias nos 3 diferentes períodos, conforme indicado abaixo.

Comparação DNA nuclear vs mitocondrial:

13^o dpi: 223,5 vs 13,7 (**p=0.0003**)

26^o dpi: 0,5 vs 1,3 (**p= 0.0087**)

61^o dpi 0,03 vs 0,2 (p= 0.6216)

Figura 9 – Tecido renal.

Comparação das medianas das cargas parasitárias dos 8 animais infectados e analisados com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, em três diferentes tempos (13^o, 26^o e 61^o dpi).

5.3.8 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO INTESTINAL

Em amostras do tecido intestinal observou-se diferença estatisticamente significativa ao se comparar a mediana das cargas parasitárias obtidas com as duas qPCR nos tempos 13º dpi e 61ºdpi, o que não se observou no 26º (Figura 10). Os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, respectivamente, apresentaram medianas referentes às cargas parasitárias nos 3 diferentes períodos, conforme indicado abaixo.

Comparação DNA nuclear vs mitocondrial no intestino:

13º dpi: 4.139 vs 97.55 (**p= 0.0013**)

26º dpi: 19,42 vs 9,16 (p= 0.3939)

61º dpi: 0,10 vs 0,016 (**p= 0.0037**)

Figura 10 – Tecido intestinal.

Comparação das medianas das cargas parasitárias dos 8 animais infectados e analisados com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, em três diferentes tempos (13º, 26º e 61ºdpi)

5.3.9 CARGA PARASITÁRIA EM MÚSCULO ESQUELÉTICO

Em amostras do tecido muscular observou-se diferença estatisticamente significativa ao se comparar a mediana das cargas parasitárias obtidas com as duas qPCR no 13º dpi, o que não se observou nos tempos 26º e 61ºdpi (Figura 11). Os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, respectivamente, apresentaram medianas referentes às cargas parasitárias nos 3 diferentes períodos, conforme indicado abaixo.

Comparação DNA nuclear vs mitocondrial em musculatura esquelética:

13ºdpi: 6.976,6 vs 26,1 ($p= 0.0012$)

26º dpi: 815,3 vs 389,6 ($p= 0.4848$)

61º dpi: 0,5 vs 0,2 ($p= 0.2086$)

Figura 11 – Tecido muscular.

Comparação das medianas das cargas parasitárias dos 8 animais infectados e analisados com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, em três diferentes tempos (13º, 26º e 61ºdpi).

5.3.10 CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO ADIPOSEO

Em amostras do tecido adiposo observou-se diferença estatisticamente significativa ao se comparar a mediana das cargas parasitárias obtidas com as duas qPCR nos tempos 13^o e 26^o dpi, o que não foi observado no 61^odpi (Figura 12). Os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, respectivamente, apresentaram medianas referentes às cargas parasitárias nos 3 diferentes períodos, conforme indicado abaixo.

Comparação DNA nuclear vs mitocondrial:

13^o dpi: 77.235 vs 6.694 (**p= 0.0006**)

26^o dpi 127.8 vs 14.08 (**p= 0.0379**)

61^o dpi: 0.2 vs 0.06 (p= 0.8665)

Figura 12 – Tecido adiposo.

Comparação das medianas das cargas parasitárias dos 8 animais infectados e analisados com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, em três diferentes tempos (13^o, 26^o e 61^odpi)

5.3.11 CARGA PARASITÁRIA EM GLÂNDULAS ADRENAIS

Não foram obtidas amostras das glândulas adrenais no tempo 13º dpi. Em amostras das glândulas adrenais não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ao se comparar a mediana das cargas parasitárias obtidas com as duas qPCR nos tempos 26º e 61º dpi. (Figura 13). Os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, respectivamente, apresentaram medianas referentes às cargas parasitárias nos dois diferentes períodos, conforme indicado abaixo.

Comparação DNA nuclear vs mitocondrial nas adrenais:

26º dpi: 41,6 vs 24,2 (p= 0,3823)

61º dpi: 0,02 vs 0,02 (p= 0,4418)

Figura 13- Glândulas adrenais.

Comparação das medianas das cargas parasitárias dos 8 animais infectados e analisados com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial, em três diferentes tempos (26º e 61ºdpi).

5.4 COMPARAÇÃO DO *THRESHOLD CYCLE* (C_T) DOS INICIADORES DO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL EM SANGUE E ÓRGÃOS, NOS TRÊS TEMPOS DE COLHEITA (13º, 26º E 61º DPI)

Os valores de C_T são inversamente proporcionais ao número de cópias do alvo da amplificação presentes na amostra. Os valores mais elevados de C_T significam baixas quantidades do alvo, enquanto os menores valores indicam quantidades elevadas. A mediana do C_T obtida com os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial nas amostras dos órgãos/sangue foram comparadas usando o teste Mann-Whitney.

5.4.1 COMPARAÇÃO DO *THRESHOLD CYCLE* (C_T) DOS INICIADORES DO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL NAS AMOSTRAS, NO 13º DPI

Ao aplicar-se o teste de Mann-Whitney para se comparar o valor do *threshold cycle* (C_T) obtido nos diversos órgãos, com os iniciadores nuclear e mitocondrial, no 13º dpi, aqueles que apresentaram diferenças estatisticamente significantes foram o tecido cerebral, pulmonar e adiposo, todos os outros não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os C_T obtidos pelas duas qPCR (Tabela 12).

Tabela 12 - Mediana do *threshold cycle* obtida com iniciadores DNA nuclear (F2/B3) e mitocondrial (32F/148R), de acordo com o tipo de amostra, no tempo 13º dpi.

Amostra (n)	Mediana do C_T		Comparação
	F2/B3	32F/148R	Valor de p
Cérebro	22.22	19.68	0.0281*
Coração	15.02	13.99	0.1605
Pulmão	21.35	19.02	0.0104*
Fígado	19.84	19.54	0.5737
Baço	19.34	17.48	0.083
Rins	20.55	19.56	0.2786
Intestino	16.35	16.49	0.7209
Músculo	16.05	14.36	0.1605
Adiposo	12.21	10.74	0.0207*
Sangue	16.65	16.77	0.7209

*Valor estatisticamente significativo para $p < 0.05$ (Teste Mann-Whitney)

5.4.2 COMPARAÇÃO DO *THRESHOLD CYCLE* (C_T) DOS INICIADORES DO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL EM ÓRGÃOS, NO 26º DPI

Ao comparar-se o valor do *threshold cycle* obtido nos diversos órgãos, com os iniciadores nuclear e mitocondrial, no 26º dpi, aqueles que apresentaram diferenças estatisticamente significantes foram o tecido cerebral e esplênico, todos os outros não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os C_T obtidos pelas duas qPCR (Tabela 13).

Tabela 13 - Mediana do *threshold cycle* obtida com iniciadores DNA nuclear (F2/B3) e mitocondrial (32F/148R), de acordo com o tipo da amostra, no tempo 26º dpi.

Amostra (n)	Mediana do C_T para:		Comparação
	F2/B3	32F/148R	Valor de p
Cérebro	20.59	22.86	0.0104*
Coração	22.87	24.82	0.1949
Pulmão	25.32	27.59	0.1049
Fígado	27.58	30.61	0.1304
Baço	20.62	24.05	0.0047*
Rins	28.01	30.99	0.1304
Intestino	24.83	27.02	0.1304
Músculo	18.34	18.62	0.7209
Adiposo	22.93	24.95	0.3823
Glândula adrenal	22.35	24.49	0.6454
Sangue	27.52	27.63	0.2345

*Valor estatisticamente significativo para $p < 0.05$ (Teste Mann-Whitney)

5.4.3 COMPARAÇÃO DO *THRESHOLD CYCLE* (C_T) DOS INICIADORES DO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL EM ÓRGÃOS, NO 61º DPI

Ao comparar-se o valor do *threshold cycle* obtido nos diversos órgãos, com os iniciadores nuclear e mitocondrial, no 61º dpi, aqueles que apresentaram diferenças estatisticamente significantes foram o tecido renal, muscular e as glândulas adrenais (Tabela 14).

Tabela 14 - Mediana do *threshold cycle* obtida com iniciadores DNA nuclear (F2/B3) e mitocondrial (32F/148R), de acordo com o tipo de amostra, no tempo 61º dpi.

Amostra (n)	Mediana do C_t para:		Comparação
	F2/B3	32F/148R	Valor de p
Cérebro	29.75	27.76	0.1605
Coração	26.99	27.73	0.9591
Pulmão	29.89	30.25	0.7209
Fígado	32.86	32.99	0.8785
Baço	30.63	30.72	0.7984
Rins	32.92	28.57	0.0379*
Intestino	31.64	30.26	0.4418
Músculo	28.96	25.86	0.0281*
Adiposo	29.63	28.63	0.065
Glândula adrenal	32.69	30.13	0.0003*
Sangue	29.32	27.89	0.1304

*Valor estatisticamente significativo – Mann-Whitney ($p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

O ressurgimento de muitos casos de infecção aguda atribuídos à ocorrência de surtos de infecção oral de *T. cruzi*^(5,10) ressaltam a importância da existência de uma técnica que reúna os atributos de sensibilidade, especificidade, rapidez, eficiência e baixo custo. A qPCR realizada com SYBR Green é uma forte candidata tendo como alvos o DNA nuclear ou o DNA do cinetoplasto de *T. cruzi* uma vez que há relatos de seu uso com sucesso na detecção do parasito em casos de infecção aguda, crônica, congênita e no acompanhamento pós-tratamento^(47,48,49). No entanto, diante da ausência de regras bem definidas para a interpretação dos ensaios moleculares e a implementação dos mesmos na rotina diagnóstica, surge um cenário de parcial desorganização e uma insatisfação crescente com a forma com que os experimentos são realizados e relatados, culminando com uma demanda cada vez maior por critérios transparentes para validação da qPCR, que permitiriam a comparação de resultados obtidos em diferentes estudos⁽⁴¹⁾.

6.1 APLICABILIDADE

Diante de tal cenário, Broeders et al⁽⁴⁰⁾ e Bustin et al⁽⁴¹⁾ propuseram parâmetros de validação para a qPCR, tais como: aplicabilidade, especificidade, sensibilidade, eficiência, linearidade, repetibilidade e reprodutibilidade. Portanto, nossa proposta de validação da qPCR pautou-se em critérios recomendados pelos citados autores.

Em relação ao primeiro critério de validação (aplicabilidade), constatamos que as duas qPCR desenvolvidas no presente estudo podem ser consideradas aplicáveis às diferentes matrizes biológicas (sangue/órgãos) testadas, já que não ocorreu inibição da qPCR em nenhuma dessas amostras. Quanto aos alvos moleculares verificamos que as regiões TCZ e kDNA, alvos dos iniciadores do DNA nuclear (F2/B3) e mitocondrial (32F/148R), respectivamente, descritos na literatura

(11,24,27,29,50,51), possuem grande número de cópias de sequências repetitivas, permitindo a detecção bastante sensível de DNA do parasito ⁽⁵²⁾, em diversos tipos de materiais biológicos (fezes, sangue, tecidos). Porém, os iniciadores do DNA mitocondrial podem produzir resultados falso-positivos por amplificarem sequências de minicírculos de kDNA integradas ao genoma do hospedeiro, ao invés do DNA do próprio *T. cruzi* ⁽⁵³⁾, como constatado por Guimarães ⁽⁵⁴⁾. Estes autores encontraram elevada frequência de resultados falso-positivos na PCR convencional, ao utilizarem iniciadores do kDNA para testar indivíduos sem processo infeccioso agudo provenientes de área considerada não endêmica da doença de Chagas. Porém, isso não foi verificado por Marques ⁽⁵⁵⁾, nem em nosso estudo, quando amostras de sangue e tecidos de camundongos não infectados foram testadas.

Por outro lado, os iniciadores do DNA nuclear amplificam regiões com repetições *in tandem* ⁽⁴⁸⁾, o que leva à possibilidade da ocorrência de resultados falso-negativos, conforme descrição de Braz ⁽¹¹⁾, já que as sequências *in tandem*, podem produzir o fenômeno do “tudo ou nada”, isto é, em amostras com baixa carga parasitária é possível que uma alíquota de DNA contenha as sequências, que são contíguas, enquanto outra alíquota não contenha as sequências. Este fenômeno foi inicialmente verificado em duas amostras (baço e músculo), do grupo de animais infectados, ambas pertencentes à fase crônica da infecção (61ºdpi) quando, inicialmente, apenas duplicatas das amostras eram testadas. Como todos os testes do presente estudo foram repetidos em triplicata, pudemos constatar que este problema foi solucionado. Neste mesmo tempo de coleta (61ºdpi), quando os valores de carga parasitária são muito baixos, geralmente de frações de um único parasito por mL de sangue ou em 50 ng de DNA dos tecidos, foi observada discordância, ou seja, resultados positivos e negativos, quando eram analisadas duplicatas, em cinco amostras (três provenientes do fígado e duas de intestino). Ao

repetirmos a qPCR dessas amostras em triplicata, a falsa negatividade e a discordância não foram mais observadas.

6.2 ESPECIFICIDADE

A qPCR mostrou-se uma ferramenta específica para ser utilizada em pesquisa e diagnóstico, já que assim como o observado em Caldas et al ⁽⁵⁶⁾ e Moreira et al ⁽⁵⁷⁾, nossos iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial geraram um único pico de amplificação na curva de *melting*, para cada par de iniciadores, aos $79,8 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para os iniciadores do DNA nuclear, e aos $78,1 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para os iniciadores do DNA mitocondrial, o que demonstra que as duas qPCR são específicas. Vieira ⁽⁵⁸⁾ descreve pico de amplificação para os iniciadores do DNA nuclear aos $78,45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e para os iniciadores do DNA ribossomal aos $79,34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Ademais, quando testamos amostras de outros patógenos, tais como, *Crithidia fasciculata*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leptomonas seymouri*, *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* obtivemos 100% de especificidade, afinal o DNA destes patógenos não produziu amplificações diante das condições estabelecidas para os iniciadores do DNA nuclear e do kDNA de *T. cruzi*. No entanto, Qvarnstrom et al ⁽²⁹⁾ e Schijman et al ⁽²⁴⁾ descreveram que os mesmos iniciadores do DNA mitocondrial para a amplificação de kDNA de *T. cruzi* geraram amplificações com DNA de *T. rangeli*. Apesar de, neste estudo, não termos testado especificamente o DNA de *T. rangeli* para confirmar os achados dos autores, estes testes foram realizados por Braz et al ⁽²⁸⁾, porém, apenas para os iniciadores do DNA nuclear do presente estudo, e é importante lembrar que este tripanossomatídeo não é patogênico para o homem. Vieira ⁽⁵⁸⁾ valendo-se dos iniciadores do DNA nuclear, avaliou a especificidade das reações de qPCR na busca de *T. cruzi* em amostras de açaí e relata que os iniciadores do DNA nuclear não amplificaram o DNA de *T. rangeli*, discordando dos

dados de Braz et al ⁽²⁸⁾. Também ressaltamos que no grupo 1 (animais livres de infecção) todas as amostras de sangue e de órgãos submetidas à qPCR foram negativas, reafirmando a inexistência de resultados falso-positivos em nosso estudo.

6.3 SENSIBILIDADE

Em relação à sensibilidade, os iniciadores do DNA nuclear deste estudo foram menos sensíveis detectando até 0,002 de parasito enquanto os iniciadores do DNA mitocondrial detectaram até 0,0002 de parasito, lembrando que o volume total de reação foi de 25 µL. Os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial foram descritos por Qvarnstrom et al ⁽²⁹⁾ como mais sensíveis em relação aos iniciadores do DNA ribossomal, descrição semelhante a de Vieira ⁽⁵⁸⁾, que atribuiu aos iniciadores do DNA nuclear maior sensibilidade em relação aos iniciadores ribossomais. Freitas ⁽⁵⁹⁾ encontrou limiar de sensibilidade dos iniciadores do DNA nuclear na qPCR de $10^{-1}/\mu\text{L}$ (10^2 parasitos/ mL), ou seja, a sensibilidade foi inferior à encontrada no presente estudo. Diferentemente dos autores consultados, nosso grupo não testou iniciadores do DNA ribossomal, e verificamos que embora os alvos dos iniciadores do DNA nuclear estejam presentes em maior número de cópias (100 mil cópias/ parasito), seu limiar de sensibilidade foi inferior à sensibilidade dos iniciadores do DNA mitocondrial (10- 20.000 cópias) ⁽⁵⁾.

6.4 EFICIÊNCIA E LINEARIDADE

Em nosso estudo, a linearidade (R^2) e a eficiência demonstraram grande estabilidade e constância, alcançando em média 99,8% de eficiência, linearidade de (R^2) de 0.990 (ideal $R^2 \geq 0,98$). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Saavedra et al ⁽⁵²⁾ ao utilizarem a qPCR para testar amostras de pacientes com doença de Chagas. Estes autores descreveram valores de eficiência de 99%,

linearidade de 0.999, valores próximos aos obtidos por Cancino-Faure et al ⁽⁶⁰⁾ que descrevem eficiência de 90% e linearidade de 0.9881. Freitas et al ⁽⁴⁴⁾ também relataram valores de eficiência de 93% e valores de linearidade de 0,996, quando analisaram amostras de pacientes com infecção crônica. A análise da eficiência e da linearidade nos permite afirmar que os parâmetros calculados para as duas qPCR do presente estudo estão totalmente alinhados aos valores sugeridos por Broederes et al ⁽⁴⁰⁾.

6.5 REPRODUTIBILIDADE/ REPETIBILIDADE

Seguindo os preceitos recomendados por Broederes et al ⁽⁴⁰⁾ para a validação da qPCR, a reprodutibilidade e a repetibilidade devem apresentar coeficientes de variação (CV) inferiores a 25%. Em nosso estudo, os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial apresentaram valores inferiores a 25%, sendo, portanto, precisos e confiáveis. Le Gal et al ⁽⁶¹⁾ relataram CV de 2,6% a 0,6% e Kiesslich et al ⁽⁶²⁾, CV de 16%, portanto, valores adequados, assim como os do presente estudo.

6.6 ANÁLISE DO C_T

A diferença entre os valores de C_T de duas amostras relaciona-se ao fato das amostras conterem diferentes quantidades do alvo molecular. Em todos os tempos estudados (13º, 26º e 61ºdpi) os valores de C_T fornecidos pelos iniciadores do DNA nuclear foram menores, ou seja, cargas parasitárias mais elevadas, o que é justificável considerando que este alvo possui maior número de cópias em cada parasito em relação ao DNA do cinetoplasto. Na fase crônica, os valores mais altos de C_T refletem a baixa carga parasitária nesta fase da infecção ^(57,63,64). Em estudo comparativo, entre o uso de amostras de sangue total e de soro para a detecção de *T. cruzi* em pacientes com infecção crônica, Melo et al ⁽⁶⁵⁾ relataram valores de C_T

de 27,90 para o sangue e de 32,48 para o soro, valores próximos aos encontrados por nosso grupo nas amostras sanguíneas de camundongos que foram de 27,90 para o DNA nuclear e 29,23 para o DNA mitocondrial.

6.7 CARGA PARASITÁRIA EM SANGUE E NOS ÓRGÃOS

Considerando a totalidade dos resultados, os iniciadores do DNA nuclear e mitocondrial foram capazes de quantificar as cargas parasitárias, tanto em sangue quanto em órgãos, em todas as fases da doença de Chagas murina, sendo elas, de baixa, média e alta magnitude. A quantificação foi condizente com a evolução natural da infecção, apresentando valores mais elevados na fase aguda e diminuição progressiva com a cronificação da infecção. Também constatamos, ao analisarmos a carga parasitária em sangue e nos diferentes órgãos que o *T. cruzi* causa uma pan-infecção no modelo animal utilizado, uma vez que DNA do parasito foi detectado no sangue e em todos os órgãos analisados.

6.8 SANGUE

Os valores de parasitemia encontrados no presente estudo se encontram em consonância com os de Cencig et al ⁽³⁰⁾, que, valendo-se de um grupo controle com animais não tratados, infectados com a cepa Tulahuen, quantificaram por qPCR, na fase aguda (14ºdpi) da infecção, o valor de 10^6 parasitos/ mL, com diminuição para 10^3 parasitos/ mL na fase crônica (31ºdpi). Nos respectivos períodos, as quantificações encontradas em nosso estudo foram de 10^5 e 10^2 , entretanto, ressaltamos que a supracitada autora realizou o tratamento a partir do 14ºdpi com anfotericina B lipossomal, os camundongos pertenciam a uma linhagem isogênica, e o inóculo e a cepa de *T. cruzi* foram diferentes das usadas no presente estudo. Castro-Sesquen et al ⁽⁶⁶⁾ detectaram 10^1 parasitos/ mL no 15º dpi, ou seja,

na fase aguda da infecção de outro modelo animal, o porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*), dificultando qualquer tipo de comparação com este estudo.

A parasitemia dos animais não tratados durante a fase aguda é debelada naturalmente pela resposta imune do camundongo, que produz anticorpos específicos contra o *T. cruzi*, promovendo a queda e o desaparecimento da parasitemia nos animais ao final do primeiro mês, após a infecção experimental ⁽⁶⁷⁾.

Já na fase crônica, Melo et al ⁽⁶⁵⁾ relataram valores de carga parasitária no sangue e soro de pacientes chagásicos de 1,23 e de 1,12 parasitos/ mL, respectivamente, não havendo diferença estatística entre os valores. Neste mesmo período, quantificamos em nosso estudo 10^1 parasitos por/ mL com ambos os iniciadores, e Castro-Sesquen et al ⁽⁶⁶⁾, 10^0 parasitos/ mL. Portanto, foi possível detectar e quantificar *T. cruzi* com ambos os iniciadores, em amostras de sangue na fase aguda e crônica da infecção, reafirmando a importância deste material biológico para o diagnóstico e monitoramento dos pacientes antes, durante e após o tratamento. Sua fácil obtenção e processamento são, sem dúvida, características atraentes no âmbito do diagnóstico laboratorial, por permitir protocolos relativamente simples de processamento, e por não exigir procedimentos extremamente dolorosos e de alto risco. Considerando-se novamente a aplicabilidade e validade dos resultados é satisfatório constatar que existem na literatura relatos de pesquisadores realizando quantificação de baixas cargas parasitárias no sangue de pacientes chagásicos ^(57,63,64). Este também foi o caso no presente estudo.

6.9 ÓRGÃOS

Diante da capacidade de migração do *T. cruzi* para os diversos compartimentos do organismo⁽⁶⁸⁾, quantificamos os parasitos em todos os órgãos estudados (cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rim, intestino, glândulas

adrenais, tecido adiposo e tecido muscular esquelético), nos três tempos de coleta, correspondendo ao pico da fase aguda, final da fase aguda e fase crônica da infecção chagásica murina, tal como Lewis ⁽⁶⁹⁾, que, utilizando camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi*, demonstraram que no pico da infecção aguda (14° dpi) foi possível detectar elevada carga parasitária em todos os tecidos examinados. Já na transição da fase aguda para a crônica (35° dpi), a média da carga parasitária diminuiu drasticamente na maioria dos tecidos.

6.10 CORAÇÃO

Sabe-se que na fase crônica da infecção chagásica podem ocorrer manifestações cardíacas, digestivas e do sistema nervoso^(70,71). Mais recentemente^(72,73), atribuiu-se ao processo inflamatório local, a responsabilidade pelas manifestações na fase crônica da doença de Chagas e considerando que vários órgãos podem ser afetados, a infecção pelo *T. cruzi* está associada a uma forte resposta inflamatória cardíaca⁽⁷⁴⁾ e não ao número de parasitos no órgão⁽⁷⁵⁾. Apesar de não termos realizado estudos histoquímicos, verificamos em nosso trabalho que foi na fase crônica da infecção que o coração foi o órgão com a maior carga parasitária, ao se quantificar utilizando os iniciadores do DNA nuclear. Na fase aguda da infecção, encontramos o coração como o segundo órgão mais parasitado, ficando atrás do tecido adiposo, ao realizarmos a quantificação com os iniciadores do DNA mitocondrial. Essa elevada carga parasitária no coração, em ambas as fases, pode ser explicada pelo tropismo conhecido ao referido órgão⁽³⁰⁾. Diferentemente, Lewis et al ⁽⁶⁹⁾, por meio de testes de bioluminescência e qPCR, não detectaram o parasito na fase crônica, ainda que tenham constatado a presença de miocardite e fibrose difusa, marcadores da infecção chagásica crônica em humanos. Os autores ainda concluíram que, embora não tenham excluído a

possibilidade da presença do *T. cruzi* no órgão, ele não foi detectado em imagens *in vivo* ou *ex vivo*, em qPCR do tecido e por análise histológica.

6.11 CÉREBRO

Por métodos histológicos, Morocoima et al ⁽⁷⁶⁾ relataram que com a cronificação da infecção há um decréscimo de parasitos no tecido cerebral, o que foi confirmado por nossos achados. Segundo Nisimura et al ⁽⁷⁷⁾, por meio da vídeo-microscopia intravital, camundongos *Swiss* infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, na fase aguda da infecção, primeiramente sofreriam um aumento do *stress* oxidativo no cérebro e na microvasculopatia cerebral, o que a longo prazo levaria a mudanças na microcirculação cerebral, sendo este *stress* responsável pelas manifestações neurológicas crônicas da doença de Chagas.

6.12 PULMÃO

Em nosso estudo verificamos a distribuição do parasito nos pulmões, assim como Oliveira et al ⁽⁷⁵⁾, que, valendo-se da PCR com os iniciadores do kDNA, registraram a distribuição do parasito nos pulmões, durante ambas as fases da infecção, para as duas cepas estudadas (cepa Y e JLP), sem tropismo preferencial por nenhum órgão em especial (coração, fígado, pulmão e rins) ou diferença entre as cepas. Melnikov et al ⁽⁷⁸⁾ estudando várias cepas mexicanas, demonstraram a presença de amastigotas nas estruturas pulmonares por métodos histológicos. Adicionalmente, Bittencourt et al ⁽⁷⁹⁾ relataram o encontro do parasito nos pulmões de recém-nascidos, por microscopia de cortes histológicos.

6.13 FÍGADO/BAÇO

Alinhados aos resultados de Cencig et al ⁽³⁰⁾, observamos uma diminuição significativa das cargas parasitárias no fígado e no baço no 61º dpi, com a cronificação da infecção dos animais não tratados. Essa diminuição da carga pode

estar relacionada ao envolvimento deste órgão no processo imunológico de eliminação do parasito.

6.14 RINS

Achados referentes ao envolvimento renal na doença de Chagas são escassos. Em nosso estudo detectamos o DNA do parasito em todas as fases, porém, as cargas parasitárias foram baixas, 10^2 (DNA nuclear) e 10^1 (DNA mitocondrial) parasitos na fase aguda, e 10^{-1} (DNA nuclear) e 10^{-2} (DNA mitocondrial) na fase crônica. Castro-Sesquen et al ⁽⁶⁶⁾, utilizando a qPCR, com os iniciadores do DNA nuclear, não descreveram queda de parasitemia no órgão, detectando 10^0 parasitos, tanto na fase aguda (15ºdpi) quanto na crônica (155ºdpi). Oliveira et al ⁽⁷⁵⁾ também detectaram por PCR convencional, tendo como alvo o DNA mitocondrial, o DNA do parasito em todas as fases da infecção renal, enquanto Lenzi et al ⁽⁶⁸⁾, em estudo da infecção aguda de *T. cruzi*, com análise de amostras realizada por cortes histológicos, afirmaram que a veia renal se encontrava altamente parasitada, tendo sido a carga parasitária no órgão avaliada por microscopia e expressa por meio de cruzeiros.

6.15 INTESTINO

Na fase aguda da infecção comungamos com os achados de Vazquez et al ⁽⁸⁰⁾, que, embora utilizando técnicas diferentes, constataram a presença do parasito no intestino por métodos de imunohistoquímica. Os autores também descreveram o aumento dos infiltrados inflamatórios, com a presença de citocinas pró-inflamatórias e ninhos de amastigotas, após inocularem inicialmente 3×10^3 parasitos da cepa Y em camundongos, valores próximos aos utilizados em nosso estudo (2×10^3). Esses achados reforçam a idéia de que a carga parasitária inicial influencia consideravelmente a indução da resposta inflamatória e contribui para o desenvolvimento da forma digestiva da doença. Já em relação à fase crônica, Lewis

et al ⁽⁶⁹⁾, por meio de testes combinados de bioluminescência e qPCR, tendo como alvo o DNA nuclear, investigaram a presença e distribuição do parasito ao longo da infecção. Os autores encontraram valores de 10^{-1} de DNA de *T. cruzi* em 50 ng de DNA murino na fase aguda (14^o dpi) da infecção em camundongos BALB/c infectados pela cepa CL Brener. Em nosso estudo, a quantificação com os iniciadores do DNA mitocondrial estabeleceu-se em 10^3 parasitos em 50 ng de DNA (no 13^odpi) e para os iniciadores do DNA mitocondrial em 10^2 parasitos em 50 ng de DNA. É importante ressaltar que Lewis et al ⁽⁶⁹⁾ concluíram que o trato digestório seria um sítio primário de persistência do parasito, ao avaliarem camundongos imunocompetentes com infecções crônicas (84^o dpi).

6.16 MÚSCULO

A elevada carga parasitária presente no tecido muscular detectada pelos iniciadores do DNA nuclear (10^3) e do DNA mitocondrial (10^2), em ambas as fases da infecção, são descritas também por Cencig et al ⁽³⁰⁾, que a atribuíram ao tropismo do parasito por esse tecido. Entretanto, Lewis et al ⁽⁶⁹⁾ relataram a detecção de 10^0 , isto é, 1 parasito em 50 ng de DNA murino, na fase aguda da infecção neste tecido, ao utilizarem a qPCR com os iniciadores do DNA nuclear. Os autores ainda relataram observação de processo inflamatório em músculo esquelético, porém, sem o desenvolvimento de fibrose, e que, juntamente com o tecido adiposo, este tecido seria um candidato ao papel de reservatório dos parasitos.

6.17 TECIDO ADIPOSEO

Diversos autores relataram seus achados no tecido adiposo, Shoemaker et al ⁽⁸¹⁾, valendo-se de cortes histológicos, e Cencig et al ⁽³⁰⁾, de métodos moleculares, descreveram o encontro do *T. cruzi* nos adipócitos; Andrade e Silva

⁽⁸²⁾, com métodos de imunohistoquímica, descreveram a presença do parasito em adipócitos *in vivo*; Nagajyothi et al ⁽⁷⁴⁾, por microscopia eletrônica, demonstraram claramente que o tecido adiposo é rapidamente invadido durante a infecção aguda pelo *T. cruzi* e por outros tripanossomatídeos. Trindade et al ⁽⁸³⁾ revelaram por imunohistoquímica que, na fase aguda da infecção, o tecido adiposo é um dos maiores nichos extravasculares do parasito, dentre os órgãos avaliados (pulmão, coração, rins). Ferreira et al. ⁽⁸⁴⁾ demonstraram por PCR convencional, com os iniciadores do kDNA, que a infecção pelo *T. cruzi* pode persistir no tecido adiposo, por um ano após a infecção inicial em modelos animais, sugerindo que o tecido adiposo e os adipócitos seriam reservatórios para a recrudescente do parasito, principalmente durante estados de imunossupressão. Nosso estudo corroborou os achados desses autores, já que encontramos cargas parasitárias elevadas em tecido adiposo durante todas as fases da infecção, colocando o tecido adiposo como mais um candidato a sítio de persistência do parasito.

6.18 GLÂNDULAS ADRENAIS

A quantificação das glândulas adrenais é tema escasso na literatura atual, muitas vezes impossibilitando encontrar estudos para comparação. Nossos resultados que detectaram carga parasitária neste órgão em todas as fases, divergiram dos de Caliari et al ⁽⁸⁵⁾, que estudando, por meio de testes imunohistoquímicos, as glândulas adrenais de 15 cães inoculados com a cepa Be-62 e Be-78 de *T. cruzi*, concluíram que, tanto na fase aguda quanto na crônica da infecção, não há ninhos ou isolados de amastigotas nesses sítios, com uma mínima resposta inflamatória. No entanto, trata-se de outro modelo animal, tendo sido tanto os inóculos quanto as cepas utilizadas diferentes, não permitindo comparações.

6.19 DNA NUCLEAR OU MITOCONDRIAL?

Os iniciadores do DNA nuclear forneceram as maiores cargas parasitárias durante todas as diferentes fases da infecção chagásica murina, porém, os iniciadores do DNA mitocondrial apresentaram melhor sensibilidade analítica (limiar de detecção). Levando em consideração os diversos critérios adotados para o processo de validação das duas qPCR, os iniciadores do DNA nuclear (F2/B3) e do DNA mitocondrial (32F/148R) atingiram os índices tecnicamente aconselhados pela literatura especializada. Portanto, as duas qPCR foram consideradas igualmente adequadas para o diagnóstico de *T. cruzi* em amostras de sangue e órgãos de camundongos, e muito provavelmente em amostras provenientes de infecções humanas. Entretanto, refletindo além do pragmatismo dos números, devemos lembrar que existiram diferenças entre os iniciadores, sendo o maior limiar de sensibilidade apresentado pelos iniciadores do DNA mitocondrial, e maior magnitude de carga parasitária fornecida pelos iniciadores do DNA nuclear. Ambos os sistemas foram igualmente capazes de detectar o DNA de *T. cruzi* em todas as amostras de sangue e órgãos na fase aguda e crônica da infecção. Com relação à especificidade, para pesquisadores que almejam implementar pesquisas de campo sobre o *T. cruzi*, a informação de que os iniciadores do kDNA e nDNA detectam igualmente *T. rangeli* pode ser importante.

O que aparentemente se mostra como um impasse é, na verdade, um grande trunfo, já que permite que a escolha do iniciador a ser utilizado seja feita de acordo com os critérios do pesquisador, a disponibilidade orçamentária do laboratório e até mesmo a finalidade da pesquisa. Vale ressaltar ainda que, a opção por um deles não exclui a possibilidade do uso do outro, em caso de falha de um dos sistemas causada por problemas técnicos no laboratório, contaminação (*carry over*), dentre outras possibilidades. A necessidade de se dispor de um segundo

teste (qPCR) para confirmar resultados que não sejam compatíveis com a clínica, também constitui um outro fator que justificaria a adoção de uma segunda qPCR.

7 CONCLUSÕES

O modelo experimental utilizado neste estudo foi adequado para padronizar e validar as duas qPCR voltadas à detecção e quantificação da carga parasitária de *T. cruzi* em vários tipos de material biológico, podendo ser empregadas em investigações de infecção aguda, subaguda e crônica causadas pelo *Trypanosoma cruzi*. A excelente combinação de alta sensibilidade e especificidade, baixo risco de contaminação e rapidez de execução, com excelente relação custo-efetividade, demonstram que a qPCR com SYBR Green é uma ferramenta útil tanto para o diagnóstico (detecção), quanto para o monitoramento da carga parasitária em sangue e tecidos, nas diferentes fases da infecção chagásica, durante e após o tratamento.

De acordo com os parâmetros estabelecidos, as duas qPCR com iniciadores do DNA nuclear (F2/ B3) e do DNA mitocondrial (32F/148R) de *T. cruzi* foram padronizadas com sucesso. Elas produziram resultados compatíveis com as expectativas, ao serem validadas em amostras de sangue e tecidos de camundongos infectados e não infectados, no 13º, 26º e 61º dias após a infecção experimental murina, correspondendo à metade da fase aguda, final da fase aguda e fase crônica da infecção.

Ao se determinar e comparar a frequência e a magnitude de resultados positivos obtidos pelas duas qPCR, muito embora tenhamos encontrado diferenças estatísticas entre os valores aferidos pelas duas qPCR, nos diferentes tempos da infecção chagásica murina, dependendo do órgão analisado, ambos os iniciadores foram capazes de quantificar todos os tipos de amostras nas diferentes fases da infecção, sinalizando positivamente para a utilização destes dois ensaios moleculares no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*.

8 REFERÊNCIAS

1. Moncayo A. Carlos Chagas: biographical sketch. *Acta Trop.* 2010; 115(1-2): 1 - 4.
2. Dias JCP, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997.
3. Santos MR, Cano MI, Schijman A, Lorenzi H, Vázquez M, Levin MJ, et al. The *Trypanosoma cruzi* genome project: nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brener. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997; 92(6): 821-8.
4. Henriksson J, Aslund L, Pettersson U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 1996; 12(3): 108-14.
5. Brener. Z, Andrade. Z, Barral-Netto. M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
6. Shapiro TA. Kinetoplast DNA maxicircles: networks within networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 (16): 7809-13.
7. Da Silva MA, Nai GA, Rosa JA. Caracterização biológica e molecular de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes na fase crônica, forma cardíaca da doença de Chagas. *Rev Patol Trop.* 2006; 35 (3): 213-26.
8. Roque ALR, Jasen AM. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: GALVÃO, C., org. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. 2014. 75-87.
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2015. Parasites – American Trypanosomiasis. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Acesso em: 11.07.2016.
10. Dias JCP, Neto VA, Luna EJA. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2011; 44 (3): 375-379.
11. Braz LMA. Comparação da reação em cadeia de polimerase com o exame microscópico na detecção do *Trypanosoma cruzi* em amostras procedentes do trato digestório do *Triatoma infestans* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 2006
12. Argolo AM, Felix M, Pacheco R, Costa J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio: Fundação Oswaldo Cruz: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro; 2008.
13. Coura JR, Castro SLA. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97: 3-24.

14. Dias JCP, Ramos Jr. AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura Jr, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. 2015. Epidemiol. Serv. Saúde. 2016; 25: 7-86.
15. Reiche EM, Inouye MM, Bonametti AM, Jankevicius JV. [Congenital Chaga's Disease: epidemiology, laboratorial diagnosis, prognosis and treatment]. J Pediatr (Rio J). 1996; 72 (3): 125-32.
16. Portela-Lindoso AAB, Shikanai -Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. Rev. Saúde Pública. 2003; 37(1): 107-115.
17. Costa AM, Tavares VR, Aquino VM, Moreira DB. Doença de Chagas: Uma revisão Bibliográfica. Editora. REFACER - Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres. Publicado online: v.2, n.1. 2013.
18. Marcon GEB. Detecção do DNA do *Trypanosoma cruzi* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em pacientes chagásicos crônicos [tese]. Campinas: Faculdade Ciências Médicas Universidade de Campinas; 2014.
19. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. Acta Trop. 2007; 103(3): 195-200.
20. Gilber SR. Reação em Cadeia da Polimerase em comparação ao teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) e ELISA (Enzimalmunoensaio) no diagnóstico para Doença de Chagas [tese]. Curitiba: Pós-graduação em Processos em Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná; 2007.
21. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clinical Microbiology Reviews. 2006; 19(1): 165–256.
22. Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 1:122-35.
23. Bianchi F, Cucunubá Z, Guhl F, González NL, Freilij H, Nicholls RS, et al. Follow-up of an asymptomatic Chagas disease population of children after treatment with nifurtimox (Lampit) in a sylvatic endemic transmission area of Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2015; Feb 27, 9 (2): 1-16.
24. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(1): e931.
25. Pereira da Silva LH, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin. Biol. 1953; 20: 191-202.

26. Guay JM, Dubois D, Morency MJ, Gagnon S, Mercier J, Levesque RC. Detection of the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using multiplex polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31(2): 203-7.
27. Moser DR, Cook GA, Ochs DE, Bailey CP, McKane MR, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. Parasitology. 1989; 1: 57-66.
28. Braz LM, Raiz R Jr, Neto A, Alárcon RS, Gakyia E, Okay TS. The detection of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: comparison of a PCR-based assay with microscopical examination. Ann Trop Med Parasitol 2007; 101(5): 461-5.
29. Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6 (7):1689.
30. Cencig S, Coltel N, Truyens C, Carlier Y. Parasitic loads in tissues of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with AmBisome. PLoS Negl Trop Dis. 2011; Jun 5(6):1216.
31. Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. Mol Biochem Parasitol. 2003; 129(1): 53-9.
32. Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Exp Parasitol 1966; 18(1):124-93.
33. Troncarelli MZ, Machado JG, Camargo LB, Hoffmann JL, Camossi L, Greca H, et al. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e de tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. Vet e Zootec. 2008; 15: 39-46.
34. Olivieri BP, Molina JT, de Castro SL, Pereira MC, Calvet CM, Urbina JA, Araújo-Jorge TC. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. Int J Antimicrob Agents. 2010; 36(1): 79-83.
35. Batista Dda G, Batista MM, de Oliveira GM, Britto CC, Rodrigues AC, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro Mde N. Combined treatment of heterocyclic analogues and benznidazole upon *Trypanosoma cruzi* in vivo. PLoS One. 2011; 6(7): 221-55.
36. Guedes PM, Oliveira FS, Gutierrez FR, da Silva GK, Rodrigues GJ, Bendhack LM, Franco DW. Nitric oxide donor trans-[RuCl([15]aneN)NO] as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. Br J Pharmacol 2010; 160(2): 270-82.
37. Raymundo MM. Os Deveres dos Pesquisadores para com os Animais de Experimentação: uma proposta de auto-regulamentação [dissertação]. Porto

Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.

38. Oliveira HP, Alves GES, Rezende CMF. Eutanásia em Medicina Veterinária. 2002. Disponível em: <https://www.ufmg.br/coep/eutanasia.pdf>.
39. Davies C, Marino Cardozo R, Sánchez Negrette O, Mora MC, Chung MC, Basombrío MA. Hydroxymethylnitrofurazone is active in a murine model of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; (9): 3584-9.
40. S. Broeders I. Huber L. Grohmann G. Berben I. Taverniers, M. Mazzara, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*. 2014; 37: 115-126.
41. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55(4): 611-22.
42. Belaz S, Gangneux JP, Dupretz P, Guiguen C, Robert-Gangneux F. A 10-year retrospective comparison of two target sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* detection by quantitative PCR. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(4): 1294-300.
43. Caldas S, Santos FM, de Lana M, Diniz LF, Machado-Coelho GL, Veloso VM, et al. *Trypanosoma cruzi*: acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. *Exp Parasitol*. 2008; 118(3): 315-23.
44. De Freitas VL, da Silva SC, Sartori AM, Bezerra RC, Westphalen EV, Molina TD, et al. Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4 level. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(8): e1277.
45. Brisson Marni, Tan Larissa, Park Rob, Hamby Keith. Identification of nonspecific products using melt-curve analysis on the iCycler iQ Detection System. Bio-Rad Laboratories, Inc. 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547 USA.
46. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006; 1(3):1559-82.
47. Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol*. 1993; 31(9): 2421-6.
48. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68(5): 574- 82.

49. Galvão LM, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Andrade AL. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. J Clin Microbiol. 2003; 41(11): 5066 - 70.
50. Degraive W, Fragoso SP, Britto C, van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MA, et al. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1988; 27(1): 63-70.
51. De Winne K, Büscher P, Luquetti AO, Tavares SB, Oliveira RA, Solari A, et al. The *Trypanosoma cruzi* satellite DNA OligoC-Test and *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA OligoC-Test for diagnosis of Chagas disease: a multi-cohort comparative evaluation study. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(1): e2633.
52. Saavedra M, Zulantay I, Apt W, Castillo J, Araya E, Martínez G, et al. Quantification by real-time PCR of *Trypanosoma cruzi* DNA in samples of *Triatoma infestans* used in xenodiagnosis of chronic Chagas disease patients. Parasit Vectors. 2016; 9(1): 382.
53. Hecht MM, Nitz N, Araujo PF, Sousa AO, Rosa Ade C, Gomes DA, et al. Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. PLoS One 2010; 5(2): e9181.
54. Guimarães, Adriana de Jesus Benevides de Almeida. Associação de locus das mutações de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma com manifestação clínica da Doença de Chagas. 2014. 142 f., il. Tese (Doutorado em Ciências Médicas), Universidade de Brasília, Brasília; 2014.
55. Marques, Ana Luiza Pereira. Uso da biologia molecular no diagnóstico da doença de Chagas: uma abordagem teórico-experimental com foco em qPCR. 2016. 142 f., il. Tese (Mestrado em Ciências Médicas), Universidade de Brasília, Brasília; 2016.
56. Caldas S, Caldas IS, Diniz Lde F, Lima WG, Oliveira Rde P, Cecílio AB, et al. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Acta Trop. 2012; 123(3): 170-7.
57. Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MF, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. Acta Trop. 2013; 125(1): 23-31.
58. Vieira, Anderson Rodrigues Araujo. Desenvolvimento e padronização de métodos para detecção de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) [dissertação]. Brasília: Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília, 2015.
59. Freitas, Vera Lúcia Teixeira. Avaliação dos níveis de parasitemia por PCR em tempo real em pacientes com doença de Chagas crônica e pacientes com co-infecção HIV-*Trypanosoma cruzi*, com e sem reativação da doença

de Chagas [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2015.

60. Cancino-Faure B, Fisa R, Alcover MM, Jimenez-Marco T, Riera C. Detection and Quantification of Viable and Nonviable *Trypanosoma cruzi* Parasites by a Propidium Monoazide Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. Am J Trop Med Hyg. 2016; 94(6): 1282-9.
61. Le Gal F, Gordien E, Affolabi D, Hanslik T, Alloui C, Dény P, et al. Quantification of hepatitis delta virus RNA in serum by consensus real-time PCR indicates different patterns of virological response to interferon therapy in chronically infected patients. J Clin Microbiol. 2005; 43(5): 2363-9.
62. Kiesslich D, Crispim MA, Santos C, Ferreira Fde L, Fraiji NA, Komninakis SV, et al. Influence of hepatitis B virus (HBV) genotype on the clinical course of disease in patients coinfecting with HBV and hepatitis delta virus. J Infect Dis. 2009; 199(11):1608-11.
63. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3(4): e419.
64. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(1): e2000.
65. Melo MF, Moreira OC, Tenório P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Júnior WO, et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. Parasite Vectors. 2015; 8:154.
66. Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Yauri V, Cok J, Angulo N, Escalante H, et al. Detection of soluble antigen and DNA of *Trypanosoma cruzi* in urine is independent of renal injury in the guinea pig model. PLoSOne. 2013; (3): e58480.
67. Jorge TCA., Castro SL. Doença de chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p.
68. Lenzi HL, Oliveira DN, Lima MT, Gattass CR. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. Exp Parasitol. 1996; 84(1):16-27.
69. Lewis MD, Fortes Francisco A, Taylor MC, Burrell-Saward H, McLatchie AP, Miles MA, et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. Cell Microbiol 2014; 16(9):1285-300.
70. Prata A. Classificação da infecção chagásica no homem. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1990; 23 (2):109-113.
71. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis. 2001; (2): 92-100.

72. Lemos JRD, Rodrigues WF, Miguel CB. Influence of Parasite Load on Renal Function in Mice Acutely Infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*. 2013; 8(8): e71772.
73. Borges DC, Araújo NM, Cardoso CR, Lazo Chica JE. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*. 2013; (2): 145-156.
74. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Machado FS. Response of Adipose Tissue to Early Infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil Strain). *The Journal of Infectious Diseases*. 2012; (5): 830 - 840.
75. Oliveira LRC, Picka MCM, Nicolete VC, Calvi SA, Marcondes-Machado J. Organ tropism during the acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c mice. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis*. 2012; 18(1): 34 - 43.
76. Morocoima A, Socorro G, Avila R, Hernández A, Merchán S, Ortiz D, et al. *Trypanosoma cruzi*: experimental parasitism in the central nervous system of albino mice. *Parasitol Res*. 2012; (5): 2099 - 107.
77. Nisimura LM, Estado V, de Souza EM, Reis PA, Lessa MA, Castro-Faria-Neto HC, Pereira MC, et al. Acute Chagas disease induces cerebral microvasculopathy in mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(7): e2998.
78. Melnikov VG, Velasco FF, Espinoza Gómez F, Rodríguez FG, Dobrovinskaya OR. Pathologic changes in lungs caused by Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi* in the acute phase of infection in mice. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; (2): 301-6.
79. Bittencourt AL, Rodrigues de Freitas LA, Galvão de Araujo MO, Jácomo K. Pneumonitis in congenital Chagas' disease. A study of ten cases. *Am J Trop Med Hyg*. 1981; 30(1): 38-42.
80. Vazquez BP, Vazquez TP, Miguel CB, Rodrigues WF, Mendes MT, de Oliveira CJ, Chica JE. Inflammatory responses and intestinal injury development during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load. *Parasit Vectors*. 2015; apr 3; 8: 206.
81. Shoemaker JP, Hoffman RV Jr, Huffman DG. *Trypanosoma cruzi*: preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuen strain. *Exp Parasitol*. 1970; 27(3): 403 - 7.
82. Andrade ZA, Silva HR. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995; 90(4): 521-2.
83. Trindade S, Rijo-Ferreira F, Carvalho T, Pinto-Neves D, Guegan F, Aresta-Branco F, et al. *Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. *Cell Host Microbe*. 2016; 19 (6): 837-48.
84. Ferreira AV, Segatto M, Menezes Z, Macedo AM, Gelape C, de Oliveira Andrade L, Nagajyothi F, et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose

tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect.* 2011; 13(12-13): 1002 - 5.

85. Caliari MV, Lana M, Oliveira ER, Barbosa AJ, Tafuri WL. Immunocytochemical study of tissue parasitism of dog adrenal glands in experimental Chagas' disease. *Parasite.* 1994; (4): 397- 400.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 16 de Julho de 2014

Ilmo(a)
Dr(a). Thelma Suely Okay
(aos cuidados de Marcos Luiz Alves Andrino)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **APROVOU**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/000280A 'Desenvolvimento de sistemas de amplificação quantitativa para a detecção do DNA mitocondrial e nuclear de Trypanosoma cruzi em amostras sanguíneas e teciduais de camundongos Swiss infectados com Trypanosoma cruzi, tratados e não tratados com benznidazol.'**, sob a sua responsabilidade.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP