

GLÁUCIA ELISETE BARBOSA MARCON

**ESTUDO MOLECULAR DO *Trypanosoma cruzi* EM TECIDOS
DO CORAÇÃO E TRATO GASTROINTESTINAL DE
PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS**

CAMPINAS

2007

GLÁUCIA ELISETE BARBOSA MARCON

**ESTUDO MOLECULAR DO *Trypanosoma cruzi* EM TECIDOS
DO CORAÇÃO E TRATO GASTROINTESTINAL DE
PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área de concentração em Clínica Médica.*

ORIENTADORA: PROF^a DRA. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M333e	Marcon, Gláucia Elisete Barbosa Estudo molecular do <i>Trypanosoma cruzi</i> em tecidos do coração e trato gastrointestinal de pacientes chagásicos crônicos / Gláucia Elisete Barbosa Marcon. Campinas, SP : [s.n.], 2007. Orientador : Sandra Cecília Botelho Costa Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Chagas, Doença de. 2. Reação em cadeia da Polimerase. 3. <i>Trypanosoma cruzi</i>. 4. Genotipagem. I. Costa, Sandra Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	--

Título em inglês : Molecular study of *Trypanosoma cruzi* in tissues of the heart and gastrointestinal tract in chronic chagasic patients

Keywords: • Chagas disease
• PCR
• *Trypanosoma cruzi*
• Genotyping

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Prof. Dr. Luiz Antonio Kannebley Bittencourt

Prof. Dr. José Francisco Kerr Saraiva

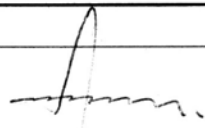
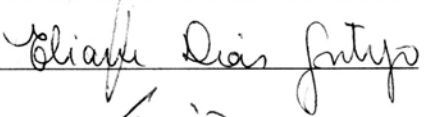
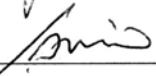
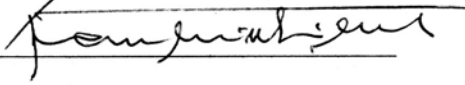
Profa. Dra. Eliane Costa Dias Macedo Gontijo

Data da defesa: 14 - 02 -2007

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador(a): *Prof^a. Dr^a. Sandra Célia Botelho Costa*

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) José Francisco Kerr Saraiva _____ 
2. Prof(a). Dr(a). Eliane Costa Dias Macedo Gontijo _____ 
3. Prof(a). Dr(a). Jamiro da Silva Wanderley _____ 
4. Prof(a). Dr(a). Luiz Antonio Kannebley Bittencourt _____ 
5. Prof(a). Dr(a). Sandra Cecília Botelho Costa *Sandra Cecília Botelho Costa*

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 14/02/2007

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe Marta, pelo incentivo e exemplo.

*Dedico esse trabalho ao meu marido Fábio e aos meus
filhos, Leandro e Gustavo, os amores da minha vida.*

Primeiramente agradeço a Deus e a Nossa Senhora por me darem a coragem para persistir nesse sonho.

Um agradecimento especial à Dra Sandra Costa pela amizade e confiança, e como toda grande mestra, sabe como ser a ponte que leva ao conhecimento.

À Natalina e Sérgio, pais de Fábio, por cuidarem com muito amor das minhas crianças enquanto eu desenvolvía esse trabalho.

Aos meus irmãos Márcia, Hélio, Denise e Roberto pelo apoio. E também a todos os meus sobrinhos.

À minha amiga e irmã Dulcinéia Martins de Albuquerque, um anjo que dedica seu tempo, conhecimento, amizade e confiança a todos ao seu redor.

A todas as “meninas” do Laboratório de Diagnóstico por Métodos de Biologia Molecular (Beatriz, Ana Carolina, Cristiane, Renata, Ana Maria, Sheila, Cláudia, Angélica, Caroline, Anali, Fernanda, Keila) principalmente à querida amiga Paula Durante que com extrema dedicação e muita paciência, conduz as pesquisas referentes ao laboratório. E também às amigas Rosana Molina e Andréa Gusmão, que apesar de estarem mais afastadas, sempre deram apoio, idéias e incentivo ao meu trabalho. Agradeço também ao Emanuel, pela presteza e alegria. E também a Ângela Assis, do Hemocentro, pelas longas conversas.

Especialmente à Dra Maria Aparecida Barone Teixeira (Dra Cidinha), da PUCCAMP, pelo apoio e por ter cedido os blocos de tecido, sem os quais não seria possível a realização desse trabalho. Também agradeço ao André Larrubia e Luísa Carolina por gentilmente separarem os blocos e todos os dados dos pacientes envolvidos nessa pesquisa.

Ao Dr Konradin por ceder equipamentos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental e também ao funcionário Sérgio pela paciência e por cortar o material que foi utilizado.

Ao Dr Fernando Ferreira Costa por ceder equipamentos e pessoal capacitado do Hemocentro a fim de viabilizar essa pesquisa.

Ao Dr. Eros Almeida e Dra Maria Elena Guariento pelas sugestões, esclarecimentos e incentivo.

Um agradecimento especial a Rose, Conceição, Daniela, Aglécio, Ester e todo o pessoal dos laboratórios pelas conversas, incentivos, conselhos que trocávamos no café.

A todos os amigos da Escola Plínio, pelo incentivo, principalmente à D. Ivone Schincariol pelo equilíbrio que transmite. E também à D. Zezé Giovanetti, Cecília Barijan e Lourdinha, pelos exemplos de dedicação e amizade. À Cristina, que através de sua luta pela vida demonstrou toda a força que existe na fé em Deus.

À Cristiane, secretária da pós-graduação, pelos esclarecimentos e paciência. Ao Dr Lício Veloso e todo o pessoal da PG/FCM/UNICAMP.

A Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, pela oportunidade e pelo apoio a eventos científicos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e a CAPES (Coordenação de Apoio ao Ensino Superior) pelo apoio financeiro.

Enfim, uma Tese de Doutorado nunca se faz sozinha e também não há como agradecer a todos os envolvidos em poucas linhas.

	PÁG.
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvii
1- INTRODUÇÃO	20
1.1- O parasito como agente causador	22
1.2- A teoria da autoimunidade	24
1.3- A fase genômica	25
1.4- A Variabilidade genética e as formas clínicas da doença	26
1.5- O kDNA - DNA do cinetoplasto	30
1.6- Aplicação da PCR em tempo real	32
2- OBJETIVOS	34
3- CASUÍSTICA	36
4- MÉTODOS	39
4.1- Extração do DNA genômico	39
4.2- Identificação do DNA satélite do <i>Trypanosoma cruzi</i> pela PCR dupla	41
4.3- Identificação do kDNA do <i>T. cruzi</i> pela PCR dupla	43
4.3.1- Sequenciamento automatizado para a região do kDNA.....	45
4.3.2- Alinhamento das seqüências.....	46
4.4- Quantificação absoluta pela PCR em tempo real	46
4.4.1- Clonagem em sequenciamento.....	47
4.4.2- Padronização da PCR em tempo real.....	48
4.4.3- Análise estatística.....	49

5- RESULTADOS.....	51
5.1- Detecção do DNA satélite em tecido.....	52
5.2- Análise do kDNA do <i>T. cruzi</i> em tecido.....	57
5.2.1- Seqüenciamento automatizado do kDNA.....	58
5.3- Quantificação absoluta pela PCR em tempo real.....	63
6- DISCUSSÃO.....	70
7- CONCLUSÕES.....	79
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

µl	Microlitros
D7	Região polimórfica do gene 24Sα rRNA (<i>T. cruzi</i>)
dH ₂ O	Água deionizada destilada estéril
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
DTUs	Discrete Typing Units
EVI	Endotélio, vasos e interstício
HCl	Ácido clorídrico
kb	kilobases
kDNA	DNA do cinetoplasto
LSSP-PCR	Low-stringency Single Specific Primers
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
ng	nanogramas
nm	nanômetros
PAP	Peroxidase ainti-peroxidase
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis

ph	potencial hidrogeniônico
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TGI	Trato gastrointestinal
Tris	Tris hidroximetil aminometano
U	Unidade
WHO	World Health Organization – “Organização Mundial da Saúde”

	PÁG.
Tabela 1- Dados dos pacientes necropsiados e resultados da PCR dupla para o DNA satélite.....	53
Tabela 2- Número de casos estudados quanto a PCR dupla da região do DNA satélite em blocos do TGI e coração.....	54
Tabela 3- Relação entre o peso do coração e o número de cópias obtidas pela PCR em tempo real.....	65
Tabela 4- Relação entre as amostras do TGI e coração com o número de cópias obtidas pela PCR em tempo real.....	68

	PÁG.
Figura 1- Fotomicrografia do <i>T. cruzi</i> em MO.....	31
Figura 2- Minicírculo, kDNA.....	32
Figura 3- Amplificação do fragmento de 149 pares de base do DNA nuclear do <i>T. cruzi</i> pela PCR dupla (oligonucleotídeos TCZ1, TCZ2, TCZ3 e TCZ4 em tecidos do coração e TGI.....	56
Figura 4- Amplificação do fragmento de 330 pares de base do kDNA (oligonucleotídeos S67, S35 e S36) do <i>T. cruzi</i> , em tecidos do coração e TGI.....	57
Figura 5- Alinhamento entre linhagens do <i>T. cruzi</i> e seqüência descrita por Gonzalez (1986) (acesso: X04680) e amostra clínica (28/88_10 coração).....	59
Figura 6- Alinhamento entre as seqüências (<i>Gene Runner</i>).....	60
Figura 7- Eletroferograma com iniciador S35 – amostra 64/04_PP/VE – coração.....	61
Figura 8- Eletroferograma com iniciador S36, 54/99_coração (picos desencontrados).....	62
Figura 9- Curva de amplificação das amostras e curva-padrão da PCR em tempo real.....	64

	PÁG.
Gráfico 1- Proporções entre os blocos estudados e índice de positividade em relação à PCR dupla (DNA satélite).....	55
Gráfico 2- Análise estatística entre peso do coração e número de cópias obtidas pela PCR em tempo real.....	66
Gráfico 3- Relação entre peso do coração e número de cópias avaliados pela PCR em tempo real.....	67
Gráfico 4- Comparação entre o número de cópias obtido no TGI e coração.....	69

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pode seguir diferentes caminhos de acordo com as circunstâncias e situações. A interação parasito-hospedeiro é dinâmica e resulta de muitos fatores relacionados com o tripanossoma (cepa, virulência, inoculação), hospedeiro humano (fatores genéticos, idade, sexo) e o meio.

As variações na forma clínica e na gravidade da doença ocorrem entre os pacientes e também de acordo com a região geográfica. A variabilidade em relação ao tropismo e patogenicidade da doença de Chagas levanta questão se as formas clínicas da doença refletem da diferenciação entre as cepas. No entanto, os vários trabalhos não têm conseguido relacionar a forma clínica da doença de Chagas com o perfil genético das cepas predominantes na região estudada. Alguns autores sugerem que a autoimunidade é um importante fator na patogenicidade em tecidos pelo *T. cruzi*.

O objetivo do presente trabalho foi identificar, pela PCR (reação em cadeia da polimerase), e quantificar pela PCR em tempo real, o DNA do *T. cruzi* diretamente em tecidos conseguidos em autópsias de pacientes chagásicos crônicos, e, a partir da amplificação do kDNA, realizar o seqüenciamento genético em cada amostra. Tais técnicas foram desenvolvidas diretamente nos tecidos afetados, não necessitando de cultura *in vitro* ou passagens das cepas por outros hospedeiros vertebrados, que poderiam selecionar os clones a serem estudados.

Primeiramente, detectamos o parasito através da PCR dupla para a região repetitiva do DNA nuclear do *T. cruzi*, onde foram analisadas necrópsias de 23 pacientes, sendo 18 com forma cardíaca da doença de Chagas e 5 com a forma cardiodigestiva. As necrópsias desses 23 pacientes somaram um total de 126 blocos, sendo 70 referentes a tecidos do coração e 56 referentes ao TGI. O índice de positividade de amplificação quanto a PCR dupla do DNA satélite foi de 86% nas amostras extraídas do coração e de 87% nas amostras de DNA extraídas do TGI. Dentre os 18 pacientes que apresentavam a forma cardíaca e os 5 pacientes com a forma cardiodigestiva da doença de Chagas, houve positividade em 84,3% e 92% respectivamente. Os 18 casos com forma cardíaca (98 blocos) demonstraram positividade tanto no coração (48/56), quanto no TGI (35/42). Nos 5 casos com forma

indeterminada (28 blocos), houve amplificação em todas as amostras do TGI (14/14) e em 85,7% das amostras extraídas do coração (12/14).

A partir do produto da PCR que amplifica a região do kDNA, as amostras foram seqüenciadas e alinhadas entre si e com dados obtidos no *Gen Bank*. Observamos grande variabilidade genética entre as amostras, não sendo possível correlacionar a forma clínica com as variáveis encontradas, sugerindo que o kDNA não é um alvo confiável para genotipagem do *T. cruzi*.

A quantificação pela PCR em tempo real foi realizada em 13 amostras de DNA obtidas do coração e em 8 obtidas do TGI. Houve comparação entre o número de cópias encontradas no coração e TGI em oito casos. Relacionando-se o peso do coração com o número de cópias obtidos nesse órgão, verificamos que corações maiores podem apresentar poucas cópias, havendo uma tendência de correlação inversa entre peso do coração e número de cópias. Comparações realizadas nos oito casos onde houve quantificação de amostras do coração e TGI concomitantemente demonstraram que o coração é o órgão onde aparece maior número de cópias, principalmente nos casos de forma cardíaca.

A quantificação pela PCR em tempo real, onde a região alvo foi o DNA satélite, nos ofereceu parâmetros quanto a infectividade relacionada ao número de cópias do *T. cruzi* no órgão afetado, demonstrando que o parasito tem importante papel na patogênese da doença de Chagas.

ABSTRACT

The Chagas' disease, caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, can take different ways in accordance with the circumstances and situations. The interaction parasite-host is dynamic and results of many factors related to trypanosoma (strain, virulence, inoculation), human host (genetic factors, age, sex) and environment.

The variations in the clinical form and the seriousness of the disease occur among the patients and also in according to the geographic region. The variability in relation to the tropism and pathogenicity of the Chagas' disease raises question if the clinical forms of the disease reflect from the differentiation among strains. However, some works have not gotten to relate the clinical form of the Chagas' disease to the genetic profile of predominant strains in the studied region. Some authors suggest that the self-immunity is an important factor in the pathogenicity in tissues by the *T. cruzi*.

The objective of the present work was to identify, by the PCR (Polymerase Chain Reaction), and to quantify by real time PCR, the DNA of the *T. cruzi* directly in tissues obtained in autopsies of chronic chagasic patients and, from the amplification of kDNA, to carry out the genetic sequencing in each sample, such techniques had been developed directly in affected tissues, with no need of culture in vitro or passages of strains for other vertebrate hosts, who could select the clones to be studied.

Firstly, we detected the parasite through the double PCR for the repetitive region of nuclear DNA of the *T. cruzi*, where were analyzed necropsies of 23 patients, being 18 with cardiac form of the Chagas' disease and 5 cardiodigestive. The 23 patients' necropsies had added up to a total of 126 blocks, being 70 referring to tissues of the heart and 56 referring to the gastrointestinal tract (GIT). The positiveness index of the amplification as regards the double PCR of satellite DNA was of 86% in the extracted samples from the heart and 87% in the samples of DNA extracted from GIT. Amongst the 18 patients who presented the cardiac form and 5 patients with cardiodigestive form of the Chagas' disease. There has been positiveness in 84,3% and 92% respectively. The 18 cases with cardiac form (98 blocks) had demonstrated positiveness as much in the heart as in the GIT (35/42). In the 5 cases with indeterminate form (28 blocks), there has been amplification in all the samples of the GIT (14/14) an 85,7% of the extracted samples from the heart (12/14).

From the product of the PCR that amplifies the region of kDNA, the samples have been sequenced and lined up among themselves and with data obtained in the Gen Bank. We observed a great genetic variability among the samples, not being possible to correlate the clinical form with the found variables, being suggested that kDNA is not a trustworthy target for genotyping of *T. cruzi*.

The quantification by the PCR in real time was carried out in DNA samples obtained from the heart and in 8 obtained from the GIT. There has been comparison between the number of copies found in the heart and the GIT in eight cases. Relating the heart weight with the number of copies gotten in this organ, we verified that dilated hearts can present few copies, there being a trend of inverse correlation between the heart weight and the number of copies. Comparisons carried out in 8 cases where there has been quantification of heart samples and GIT simultaneously had demonstrated that the heart is the organ where appears a bigger number of copies, mainly in the cases of the cardiac form.

The quantification by the real time PCR, where the target region was the satellite DNA, offered us parameters as regards the infectiveness related to the number of copies of the *T. cruzi* in the affected organ, demonstrating that the parasite has an important role in the pathogenesis of the Chagas' disease.

1- INTRODUÇÃO

A infecção chagásica, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pode seguir diferentes caminhos de acordo com as circunstâncias e situações. A transmissão da doença de Chagas pode ocorrer pelas fezes do triatomíneo (barbeiro) contaminadas com *T. cruzi*; através da transfusão de sangue contaminado; pelo transplante de órgãos de pacientes com a doença. Há ainda a transmissão congênita (vertical), casos de acidente de trabalho (laboratório) e casos de transmissão através da ingestão de parasitos.

A interação parasito-hospedeiro é dinâmica e resulta de muitos fatores relacionados com o tripanossoma (cepa, virulência, inoculação), hospedeiro humano (idade, sexo, fatores genéticos) e o meio.

A distribuição geográfica da infecção pelo *T. cruzi* estende-se do México ao sul da Argentina. A doença afeta de 8 a 11 milhões de pessoas (CDC, 2007)¹ e aproximadamente 25% da população da América Latina corre o risco de adquirir a doença de Chagas. (OMS, 2005)².

Após muitos anos de um período assintomático, 27% daqueles infectados desenvolvem sintomas cardíacos, que podem levar à morte súbita, 6% desenvolvem a forma digestiva (megacólon e megaesôfago), e 3% apresentam envolvimento do sistema nervoso central, principalmente crianças e imunossuprimidos (Prata, 1990).

Como regra, a existência de duas fases da doença é aceita: a fase aguda e a fase crônica, com apresentações clínicas e características diferentes, onde nem todas as pessoas infectadas com *T. cruzi* apresentam as diversas formas da doença. (Wanderley & Corrêa, 1995). Estudos epidemiológicos têm demonstrado a distribuição variável das formas clínicas nas diferentes regiões endêmicas do Brasil, onde há uma relativa prevalência das formas cardíaca ou digestiva. A cardiodigestiva tem sido raramente encontrada (Pinto Dias, 1992). Esta heterogeneidade geográfica sugere que a variação genética do hospedeiro, do parasito ou de ambos, é importante para estabelecer a forma clínica da doença (Vago *et al*, 2000).

¹ http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/chagasdisease/epidemiology_chagas_disease.htm

² <http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr17/chagas.pdf>

A fase aguda apresenta parasitemia, com parasitos espalhados pelo organismo, replicando no interior dos magrófagos e em uma variedade de outras células do hospedeiro, com preferência pelas células musculares do coração. É caracterizada histopatologicamente por infiltrados inflamatórios e necrose dos tecidos. (Soares & Ribeiro Dos Santos, 1999).

Segundo Koeberle (1968), da fase aguda para a fase crônica, observa-se uma diminuição dos parasitos tanto no sangue quanto nos tecidos. Este período pode durar até 20 anos, sendo chamada de forma indeterminada, quando não existem sintomas clínicos ou lesões histopatológicas, sendo a sorologia positiva. A forma crônica típica que pode afetar o coração, e ocorre em aproximadamente 25% dos casos. Leva a vários graus de hipertrofia e dilatação do órgão com ou sem aneurisma apical. Infiltrados inflamatórios, necrose e degeneração do miocárdio estão presentes, mas parasitos raramente são encontrados.

Koeberle (1968) concluiu que a patogenia, nos casos de megas é a mesma, tanto no megaesôfago chagásico quanto no megaesôfago não chagásico (acalásia idiopática), destacando que achado do parasito no órgão comprometido não era a questão principal. Demonstrou através dos seus experimentos, que as formações megálicas são seqüelas do processo infeccioso, às quais chamava de "patias" chagásicas. Na cardiopatia chagásica crônica, deu suma importância a denervação, considerando-a como o fator principal das alterações morfológicas e funcionais próprias desta cardiopatia, tais como os bloqueios do sistema de condução, as arritmias, a morte súbita por fibrilação ventricular, o aneurisma de ponta e a cardiomegalia encontrada nos casos de descompensação cardíaca.

1.1- O parasito como agente causador

A hipótese da persistência do parasito baseia-se em resultados experimentais, que associam a presença do *T. cruzi* próximo aos sítios da doença (através das técnicas de biologia molecular) e evidências observadas a partir de medicamentos que diminuem a carga parasitária, resultando no decréscimo do nível de parasitos com diminuição da gravidade da doença (Tarleton, 2001)

Na fase crônica da doença de Chagas, a pessoa infectada pode apresentar manifestações cardíacas e/ou digestivas. Estudos em microscopia óptica e eletrônica demonstram infiltrados inflamatórios, com degeneração de miócitos e neurônios nos locais afetados (Vago *et al.*, 1996). Parasitos raramente têm sido encontrados em tecidos examinados por técnicas rotineiras de coloração. Entretanto, a utilização de técnicas moleculares sensíveis, como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), tem revelado a presença do DNA do *T. cruzi* em tecidos envolvidos (Lane *et al.*, 1997), mas raramente em órgãos saudáveis dos pacientes chagásicos crônicos (Vago *et al.*, 2000, Ochs *et al.*, 1996). A doença de Chagas foi proposta por alguns autores como uma doença que leva a autoimunidade, ou seja, a autodestruição dos tecidos infectados, pela razão de não serem encontrados parasitos nos locais infectados. No entanto, admitem que a persistência do parasito é um pré-requisito para a doença, comprovados pela detecção do DNA do parasito, detecção de proteínas e até mesmo de parasitos intactos nos tecidos afetados (Tarleton, 2003).

Em 1993, Jones e colaboradores detectaram, através da PCR hibridizada, o DNA do *T. cruzi* no coração de pacientes autopsiados, indicando que a persistência do material genético do parasito é crítica para a patogênese da doença e que pode contribuir com o fenômeno da autoimunidade, devido principalmente à expressão do DNA nos locais das lesões provocadas pelo *T. cruzi*. O envolvimento de mecanismos autoimunes não é excluído, mas o processo inflamatório está associado à presença do DNA do *T. cruzi* (Vago *et al.*, 1996).

Adad e colaboradores (1991) relatam o encontro do processo inflamatório crônico no esôfago de chagásicos crônicos assintomáticos e naqueles que apresentam megaesôfago. Esses achados foram confirmados através da PCR, que amplifica o DNA do *T. cruzi* tanto em tecidos de pacientes (Vago *et al.*, 2003; Elias *et al.*, 2003) quanto nos modelos experimentais (Lane *et al.*, 2003), reforçando que o DNA do patógeno pode desencadear a evolução da doença de Chagas.

A persistência do parasito, avaliada pela PCR e PAP (peroxidase anti-peroxidase) associadas aos achados clínicos, sorológicos e histopatológicos que caracterizam a miocardite chagásica crônica, demonstram um processo inflamatório

contínuo, associado à necrose, infiltrados inflamatórios e fibrose em pacientes nos diferentes estágios da doença (Anez *et al.*, 1999). Assim como nos casos da forma cardíaca, o parasito tem um importante papel na patogênese das lesões do esôfago, sendo o *T. cruzi*, o provável responsável por estas lesões, levando à ativação da resposta imune (Lages-Silva *et al.*, 2001). No entanto, estudos experimentais realizados por Andrade e colaboradores em 2002, além de demonstrar a importância dos padrões genéticos do parasito em diferentes tecidos, também oferece indícios da participação da genética do hospedeiro no processo inflamatório da doença de Chagas.

A gravidade da doença e a persistência do parasito podem estar correlacionadas, comprovadas a partir da infecção experimental em dois modelos de camundongos para análise do kDNA. Essa molécula amplificada, através da PCR *in situ*, com hibridização, deriva provavelmente de parasitos mortos no tecido (Zhang & Tarleton 1999).

1.2- A teoria da autoimunidade

Devido às dificuldades de se encontrar parasitos intactos pelas técnicas rotineiras de coloração, Kierszenbaum (1986) em revisão, sugere que a teoria da autoimunidade na patogênese da doença de Chagas baseia-se em três itens: 1. o parasito secretaria uma proteína tóxica às células do hospedeiro; 2. a infecção pelo *T. cruzi* afetaria células do sistema nervoso autônomo, resultando no adoecimento dos órgãos; 3. a resposta imune do hospedeiro frente ao antígeno pode afetar tecidos do hospedeiro, conhecido como reatividade cruzada, ou seja, uma reação autoimune. Nesse último item, anticorpos denominados EVI (referentes a endocárdio, endotélio, vasos e interstício), produzidos a partir do contato com o *T. cruzi*, se ligariam a tecidos da musculatura esquelética e do coração em humanos, levando a uma interação específica entre anticorpos anti-*T. cruzi* e antígenos do tecido do hospedeiro, tendo estes anticorpos, um papel importante na patogênese da doença de Chagas. Além da aparente ausência de parasitos, outra hipótese que sustenta a teoria da autoimunidade é o desenvolvimento de vacinas contra a infecção pelo *T. cruzi*, que podem aumentar a gravidade na fase crônica da doença (Tarleton, 2001).

Em todas as formas clínicas da doença de Chagas, o envolvimento da imunidade mediada por células é de suma importância, onde mecanismos imunes citotóxicos estão envolvidos nas formas clínicas graves da doença de Chagas (Reis *et al.*, 1993). A observação de reações inflamatórias intensas e persistentes, a destruição dos tecidos na aparente ausência do parasito, sustentado pela detecção de resposta autoimune pelo hospedeiro infectado, também colabora com a teoria autoimune da doença (Koeberle, 1968; Kalil & Cunha-Neto, 1996).

Na doença de Chagas não está muito claro se a destruição das células do hospedeiro pelo fenômeno autoimune é iniciado por antígenos do hospedeiro, do parasito ou de ambos. As células B de ativação podem ativar células B específicas, induzindo a doença autoimune, que é característica da infecção chagásica. Nesse contexto, o *T. cruzi* produz moléculas que mimetizam àquelas das células hospedeiras, inibindo o reconhecimento imune, reforçando a teoria da autoimunidade. A intensidade de mecanismo de evasão do sistema imune que ocorre durante a infecção contribui para a cronicidade e às mudanças patológicas referentes à doença. Sugere-se que a supressão da resposta imune associada à doença de Chagas é devido ao aumento da atividade do sistema fagocítico-mononuclear, resultando no aumento da parasitemia no sangue e tecido (Zambrano-Villa, *et al.*, 2002). Achados revelam que o mecanismo de resposta envolvido no desenvolvimento da forma cardíaca da doença de Chagas pode ser significativamente diferente daquele da forma gastrointestinal (Correia-Oliveira *et al.*, 1999).

1.3- A fase genômica

Dentro dos conceitos sobre a patogênese da doença de Chagas, que associa a enfermidade à presença do parasito à patogênese da doença e a autoimunidade, que levaria à autodestruição do hospedeiro, em artigo de revisão, Macedo e colaboradores (2004) propõe uma terceira fase, a fase genômica, na qual a doença é vista como produto da interação de dois genomas: o genoma do parasito e do hospedeiro. Nessa nova fase, as ferramentas da biologia molecular darão suporte para estabelecer relações entre o perfil genético do *T. cruzi* no curso da doença de Chagas.

Em 1916, Carlos Chagas, o cientista que descobriu a doença de Chagas, escreveu: *“Dos processos patojenicos da tripanozomíase alguns correspondem a localizações específicas do parasito na intimidade dos sistemas orgânicos; outros são atribuíveis à ação de toxinas, cuja existência bem se evidencia em alterações orgânicas e funcionais que permaneceriam, de outro modo, inexplicáveis”*. Koeberle (1957) chamou essas toxinas de citotoxina ou citolisina. Podemos entender que até esta terceira fase, Carlos Chagas, de certo modo, descreveu.

1.4- A variabilidade genética e as formas clínicas da doença

Coura, em 1966, mesmo sem as atuais ferramentas moleculares, defendeu uso do termo “complexo cruzi” para designar o protozoário, baseado na variação morfológica, padrões imunológicos, virulências distintas e diferenças nos padrões regionais e individuais da doença de Chagas. Atualmente, sabe-se que o *T. cruzi* é uma espécie heterogênea, constituída por muitas subpopulações de parasitos que circulam em hospedeiros vertebrados, domésticos e selvagens, além de hospedeiros invertebrados. Variações intra-específicas do *T. cruzi* têm sido observadas através do comportamento das cepas em modelos animais, padrões bioquímicos de isolados e características moleculares de diferentes linhagens (Devera *et al.*, 2003).

Em artigos de revisão (Macedo *et al.*, 2004; Devera *et al.*, 2003; Murta & Romanha, 1999) destacam-se os vários marcadores e protocolos utilizados para a caracterização genética do *T. cruzi*. Miles e colaboradores (1977) estudaram cepas isoladas de estados brasileiros, Bahia e Pará, descrevendo, a partir da eletroforese de enzimas a presença de três zimodemos (Z1, Z2 e Z3). Os padrões Z1 e Z3 foram encontrados no ciclo silvestre e em poucos casos agudos humanos, enquanto o Z2 foi encontrado restrito ao ciclo doméstico. Houve também a caracterização de quatro distintos zimodemas (ZA, ZB, ZC e ZD), a partir de isolados de chagásicos crônicos de Minas Gerais (Carneiro *et al.*, 1990), resultando em um padrão de grupos isoenzimáticos (Z1, Z2 ou ZA, Z3, ZB, ZC e ZD). Tybayrenc (1986) e Tybayrenc & Ayala (1988) analisaram os padrões enzimáticos (15 loci) em isolados de hospedeiros de várias regiões geográficas, observando

43 genótipos definidos por padrões enzimáticos, chamados então de zimodemas ou “clonets”, o que determina uma estrutura policlonal das populações, não levando a agrupamentos definidos (Zhang *et al.*, 1988; Murta & Romanha, 1999; Macedo *et al.*, 2004)

Em 1980, Morel e colaboradores, com a técnica de RFLP (restriction fragment length polymorphism) realizada com o DNA do cinetoplasto (kDNA), demonstraram que as cepas apresentam diferentes esquizodemas, com uma heterogeneidade nos padrões quando clones de uma mesma cepa foram analisados. Melhoras nos protocolos, inclusive com amplificação do kDNA pela PCR foram realizadas (Murta & Romanha, 1999) e atualmente, vários trabalhos genotipam esta região a partir da LSSP –PCR (low-stringency single specific primers), em modelos experimentais, em isolados obtidos de pacientes chagásicos crônicos e diretamente em tecidos humanos afetados (Vago *et al.*, 1996 b, Vago *et al.*, 2000, Andrade *et al.*, 2002;), resultando em padrões diferenciados em cada cepa ou órgão infectado, que apresentam alta variabilidade do *T. cruzi* II, sendo esta variabilidade não correlacionada com manifestações clínicas (Lages-Silva *et al.*, 2006). Os padrões conseguidos através de análise por RAPD (random amplified polymorphic DNA) têm sido usados em vários estudos taxionômicos, pois apresentam correlação com os zimodemas (Tibayrenc *et al.*, 1993), além de confirmar a divisão da espécie *T. cruzi* em duas linhagens. Além disso, os padrões de RAPD são diferenciados no que diz respeito à variabilidade quando se compara o *T. cruzi* obtido de chagásicos crônicos daqueles obtidos de pacientes na forma aguda, sugerindo que o organismo humano funcionaria como filtro, selecionando as sub-populações mais adaptadas (Oliveira *et al.*, 1998; Macedo & Pena, 1998; Macedo *et al.*, 2004). Através da RAPD, D’Ávila e colaboradores (2006) puderam comprovar que os isolados de 47 pacientes com diferentes formas clínicas são correlacionados geneticamente, não sendo possível a associação entre os padrões de RAPD com a forma clínica da doença.

Marcadores nucleares com genes que codificam o RNA ribossomal 24 S α e o mini-éxon, têm dividido as cepas do *T. cruzi* em duas linhagens filogenéticas. A linhagem 1 está associada ao ciclo doméstico, e a linhagem 2, associada ao ciclo silvestre, sugerindo

que estas linhagens possuem diferentes características biológicas e epidemiológicas (Zingales *et al.*, 1999).

Considerando o espaço não transcrito do mini-éxon, produtos amplificados pela PCR que apresentam 300 pb referem-se ao grupo 1, enquanto que o produto amplificado de 350 pb designa o grupo 2 (Souto *et al.*, 1986; Zingales *et al.*, 1998, Macedo *et al.*, 2004). Em trabalho publicado em 2001, Fernandes e colaboradores desenharam novos iniciadores que amplificam a cepa Z3, inserida no grupo 2 (Fernandes *et al.*, 2001).

O domínio sete (D7) do gene RNA ribossomal 24 S α , quando amplificado pela PCR também divide o *T. cruzi* em dois grupos, sendo a amplificação de 110 pb referente à linhagem 2; e o produto de 125 pb referente à linhagem 1, além de demonstrar um terceiro grupo que apresenta características intermediárias, dependendo do algoritmo usado (grupo 1/2) (Souto & Zingales, 1993, Souto *et al.*, 1996, Fernandes *et al.*, 1998, Zingales *et al.*, 1999, Fernandes *et al.*, 1999, Stolf *et al.*, 2003) .

O desenvolvimento do PFGE (pulsed field gel electrophoresis) pode identificar dois ou três grupos, sendo coincidentemente similares ao domínio sete (D7) do gene RNA ribossomal 24 S α . Oliveira e colaboradores (1998) utilizaram o microssatélite como ferramenta para analisar as populações do *T. cruzi*, confirmando que a porcentagem de populações policlonais diminui quando há comparação entre cepas isoladas do ciclo silvestre com aquelas isoladas do ser humano, confirmando a idéia de que o organismo humano seleciona as cepas mais adaptadas (Macedo *et al.*, 2001).

Utilizando-se marcadores diferentes como mini-éxon, D7 24 r RNA, RAPD e microssatélites, foi proposta a divisão do *T. cruzi* em dois grupos I e II, padronizando a nomenclatura das duas linhagens, sendo o *T. cruzi I* relacionado ao ciclo silvestre, e o *T. cruzi II*, associado ao ciclo doméstico (Satellite Meeting, 1999). Em contrapartida, seis agrupamentos genéticos ou DTUs (Discrete Typing Units) foram descritos a partir de padrões obtidos pela RAPD, com a utilização de 20 iniciadores, e através de padrões isoenzimáticos, usando 20 locos enzimáticos, comparando cepas de *T. cruzi* e *T. marinkellei*. O DTU 1 equivale ao zimodema 1, apresentando-se heterogêneo, com distribuição do sul dos EUA até a Argentina, sendo freqüentes em casos de doença de

Chagas crônica. Os demais 5 DTUs, abrangem zimodemas 2 e 3, sendo mais associados ao ciclo silvestre, mas com alguns casos de doença crônica no Equador. No entanto, cada DTU é completamente heterogêneo, e a mistura desses genótipos nos hospedeiros vertebrados e invertebrados pode ter papel na patogenicidade da doença de Chagas (Tybayrenc, 2003).

Vários trabalhos têm observado que os isolados do *T. cruzi* utilizados para a aplicação das técnicas descritas são compostos de populações heterogêneas, sendo a cultura *in vitro* e inoculação em animais capazes de selecionar certas linhagens. Estes filtros podem selecionar populações ou clones mais adaptados. No caso da cultura de células, os nutrientes podem representar um fator limitante. O sistema imune dos hospedeiros vertebrados também tem um importante papel nesse fenômeno (Devera *et al.*, 2003).

Ainda não estão claros quais fatores determinam as diferentes formas da doença. Tanto o padrão genético do parasito quanto do hospedeiro têm importante papel na patogênese da doença de Chagas. Apesar de muitos estudos, ainda não há correlação entre variabilidade genética do parasito e forma clínica da doença (Morel *et al.*, 1980; Macedo *et al.*, 1992; Macedo *et al.*, 2004). Devemos considerar também que no interior do hospedeiro (vertebrado ou invertebrado), a mistura de clones pode alterar a sua patogenicidade, como uma cooperação clonal, que age provavelmente através de mensagens bioquímicas. A mistura de genótipos pode desempenhar um importante papel na evolução da doença de Chagas (Tibayrenc, 2003).

Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado que há modificações no perfil genético e na virulência das cepas mantidas por longos períodos de tempo em hospedeiros vertebrados (Pérez-Brandán *et al.*, 2006; Veloso *et al.*, 2005). Populações de *T. cruzi* isoladas de diferentes cães infectados com a mesma cepa (Berenice 78) e mantidas por várias passagens em camundongos demonstraram características biológicas e genéticas distintas, provavelmente devido à seleção de determinada subpopulação pelo sistema imune do hospedeiro vertebrado (Veloso *et al.*, 2005). Pérez-Brandán e colaboradores (2006) sugerem a influência de fatores genéticos do hospedeiro nas modificações das populações do *T. cruzi*, confirmando a importância dos perfis genéticos do parasito e hospedeiro na evolução da infecção chagásica.

Alguns trabalhos, utilizando a PCR em tempo real, têm encontrado correlação entre *T. cruzi* II diretamente em tecidos afetados de pacientes brasileiros (Freitas *et al.*, 2004). Através da RAPD, tendo como fragmento alvo, o microssatélite, D'Ávila e colaboradores (2006) demonstraram que não há associação entre os padrões conseguidos por RAPD e as formas clínicas observadas nos pacientes chagásicos crônicos. No entanto, os resultados confirmam o polimorfismo do DNA entre os isolados do *T. cruzi*, que apresentaram padrões complexos, mas homogêneos, demonstra um grupo genético bem correlacionado dentro da população do *T. cruzi* estudada (D'Ávila *et al.*, 2006).

Freitas e colaboradores (2006) investigaram as relações genéticas entre as cepas não classificadas em *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, utilizando-se de quatro marcadores nucleares, concluindo que na história evolucionária do *T. cruzi*, ocorre hibridização entre as cepas, sendo ocasionais e estabilizadas pela propagação clonal. Tais análises agrupam os isolados em três haplogrupos –X, Y e Z. No entanto, ainda não houve estudos correlacionando tais grupos com a forma clínica da doença de Chagas.

1.5- O kDNA - DNA do cinetoplasto

O DNA do cinetoplasto (kDNA) (figuras 1 e 2) está presente em dois tipos de organelas dentro da ordem Kinetoplastida, nos maxicírculos, que correspondem às mitocôndrias nos eucariontes, e os minicírculos, com a função de RNAs guias, que são envolvidos no processo de edição de transcritos mitocondriais (Simpson, 1987; Junqueira *et al.*, 1995).

O kDNA apresenta uma organização peculiar, com pequenas regiões conservadas e uma região variável maior (figura 2). Estas seqüências conservadas implicam em similaridade entre as diferentes classes de minicírculos dentro de uma simples espécie ou cepa. Cada minicírculo contém aproximadamente 1,4 Kb (figura 2), com quatro regiões conservadas de 118 pb, situadas em intervalos de 90° (Simpson *et al.*, 1987). Tais regiões conservadas podem estar envolvidas na replicação dessas moléculas (Degraeve *et al.*, 1991). Esta molécula tem sido amplamente utilizada como ferramenta no diagnóstico molecular da doença de Chagas, justamente por apresentar as regiões conservadas dentro da espécie

T. cruzi (Moser *et al.*, 1989, Sturn, *et al.*, 1989; Russomano *et al.*, 1992; Ávila *et al.*, 1993, Britto *et al.*, 1995; Marcon *et al.*, 2002), resultando em especificidade (Sturn *et al.*, 1989; Degraeve, 1998). Devido à variabilidade entre as regiões conservadas, tem-se estudado a genotipagem a partir do kDNA, pela RFLP, como a classificação em esquizodemos, que caracteriza o perfil de restrição de cada cepa (Morel *et al.*, 1980; Sturn *et al.*, 1989; Campos *et al.*, 1999). Vários trabalhos descrevem a genotipagem pela LSSP-PCR em fragmentos amplificados do kDNA, demonstrando ser uma técnica aplicável em modelos experimentais, nos genótipos isolados de pacientes chagásicos e diretamente em tecidos afetados (Vago *et al.*, 1996, Andrade *et al.*, 1999, Vago *et al.*, 2000, Andrade *et al.*, 2002, Lages-Silva *et al.*, 2001, Lages-Silva *et al.*, 2006). Apesar do kDNA do minicírculo ser explorado em vários trabalhos envolvendo diagnóstico e genotipagem, este marcador não distingue *T. cruzi* I do *T. cruzi* II. Mesmo apresentando uma extensa heterogeneidade, esta não é reflexo da organização e composição do kDNA. Nesse caso, os minicírculos provenientes de diferentes linhagens não parecem refletir distâncias a respeito de sua estrutura e composição, o que leva à reflexão sobre o *T. cruzi* ser considerado um “complexo cruzi” (Junqueira *et al.*, 2004).

Figura 1: Fotomicrografia do *T. cruzi* em MO, disponível em :

<http://professor-edmo.tripod.com/id19.html>

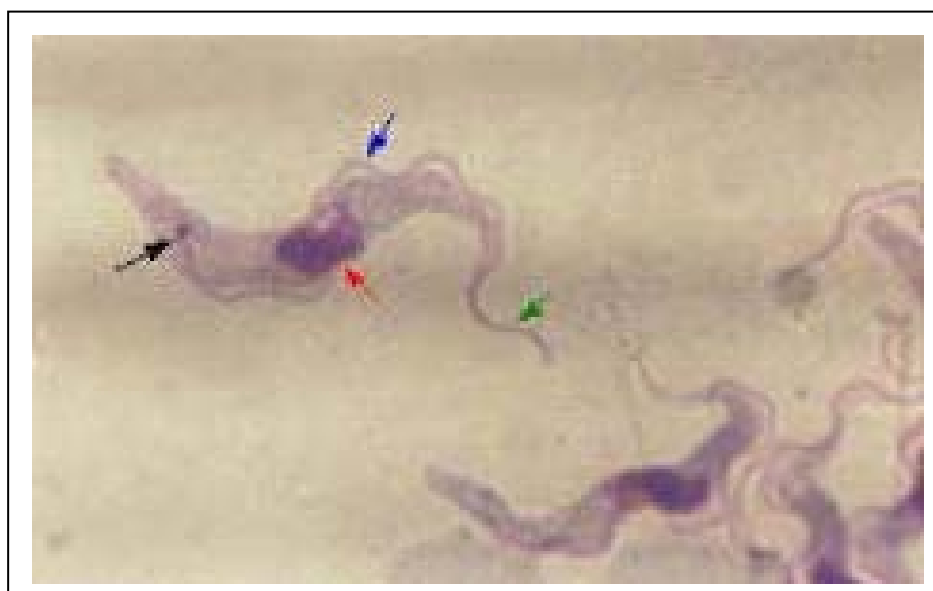


Figura 1: forma tripomastigota do *T. cruzi*. Seta preta: cinetoplasto; vermelha: núcleo; azul: membrana ondulante; verde; flagelo.

Figura 2: Minicírculo, kDNA.

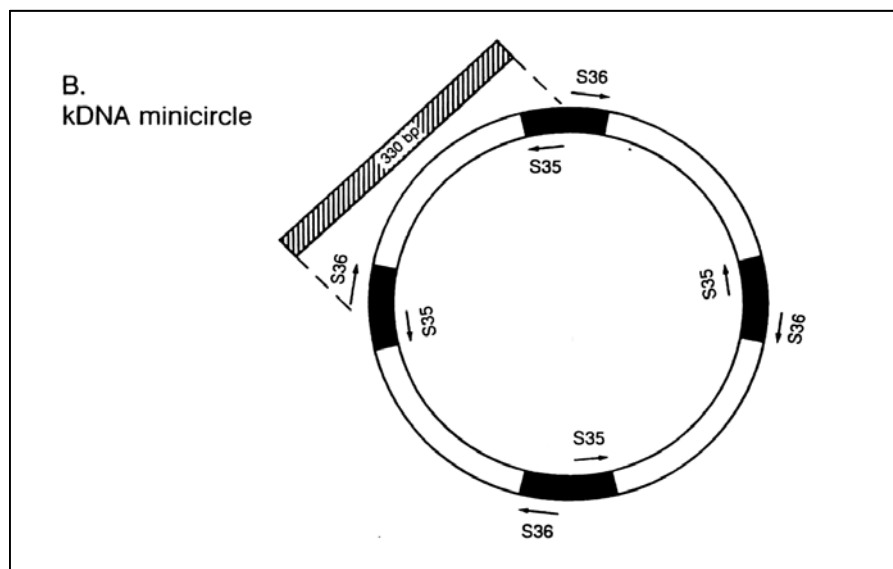


Figura 2: kDNA demonstrando as 4 regiões conservadas e repetitivas do minicírculo

1.6- Aplicação da PCR em tempo real

O método de quantificação pela PCR em tempo real é baseado no uso de uma sonda fluorescente (*Taq Man*) ou utilizando-se moléculas fluorescentes (*SYBR® green*). O *SYBR green* é um corante de ácido nucléico, verde fluorescente que demonstra uma afinidade excepcional pela dupla fita de DNA. Um sistema de lentes capta a fluorescência emitida pela reação, que teve anteriormente a excitação por uma luz halógena. A fluorescência aumenta conforme o aumento das ligações dos nucleotídeos com a fita molde, em uma reação de PCR. Esta técnica consiste em monitorar em tempo real a quantidade de DNA em estudo, obtendo-se valores numéricos com alguma unidade como número de cópias ou nanogramas de DNA, por exemplo. Por este motivo, as amostras quantificadas deverão ter como padrão, fragmentos originais quantificados anteriormente, obtidas através da inserção do DNA alvo em plasmídeos. É necessário utilizar também um controle endógeno para ter-se a certeza de que não houve inibição na reação. Os controles internos mais utilizados são a β -actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), rRNA 18s.

Além disso, apresenta vantagens como baixa emissão de fluorescência na ausência de fita dupla de DNA, representando uma técnica sensível e de fácil utilização.

A quantificação da carga parasitária pela PCR em tempo real foi descrita por Cummings e Tarleton em 2003, com o objetivo de obter uma quantificação sensível e exata dos parasitos nos tecidos do hospedeiro. Para isso, utilizou modelos experimentais infectados, tendo como fragmentos alvo o kDNA e o DNA satélite, ambas regiões repetitivas e em grande número de cópias existentes no *T. cruzi*. O conjunto de iniciadores que amplificam o fragmento repetitivo de 195 pb apresentou-se mais sensível que o kDNA. A técnica detectou baixos níveis de parasitos nos tecidos infectados e a carga parasitária varia dependendo da cepa do parasito, tipo de tecido, tempo de infecção (na fase aguda, a carga parasitária é maior) e dose de infecção, mas não é alterada pela re-infecção. Também comprovou que o DNA detectado é proveniente da persistência do parasito nos tecidos afetados e não devido à persistência do DNA por longos períodos.

A heminested PCR, utilizando como ferramenta, a PCR em tempo real, foi utilizada como estratégia para amplificar a região polimórfica do D7 do gene 24Sα rRNA, e diferenciar a linhagem à que pertence o parasito obtido de tecidos humanos e animais infectados pelo *T. cruzi*. Diferenças na quantidade de CG e conseqüentemente na temperatura de anelamento (TM) basearam esse trabalho. A partir disso, houve a primeira demonstração de que o *T. cruzi* II é o agente causador das lesões nos tecidos referentes à doença de Chagas no Brasil. A temperatura de anelamento, observada pelo pico da curva na PCR em tempo real foi de 78°C nas amostras de tecido, o que se refere ao *T. cruzi* II, anteriormente analisada pela LSSP-PCR. Na cepa padrão do *T. cruzi* I, o pico observado foi de 81,5°C (Freitas *et al.*, 2004).

Considerando que o parasito é um requisito importante para a evolução da doença de Chagas, o nosso objetivo foi detectar e quantificar o *T. cruzi* pela PCR e PCR em tempo real. E levando em conta que culturas *in vitro* e *in vivo* podem selecionar clones, analisamos as seqüências do kDNA do *T. cruzi* a partir do material genético obtido diretamente de tecidos afetados.

2- OBJETIVOS

Este trabalho teve como principais objetivos:

1. Detectar o DNA do *Trypanosoma cruzi* em amostras do coração e do TGI (Trato gastrointestinal) de pacientes chagásicos crônicos necropsiados.
2. Padronizar a PCR em tempo real como método quantitativo para a carga parasitária nos tecidos acima mencionados.
3. Relacionar o perfil genético obtido a partir do kDNA com a forma clínica da doença de Chagas.

3- CASUÍSTICA

Foram analisados 126 blocos fixados em parafina, a partir de necrópsias de 23 pacientes (tabela 1), falecidos entre 1986 a 2005, no HC/PUCCAMP. Em média, foi realizada a extração do DNA de 5 blocos por paciente, sendo que os primeiros 6 casos, tiveram vários cortes e extrações, devido às dificuldades na padronização da extração. Além das amostras citadas, extraímos o DNA de 10 casos com epidemiologia negativa para a doença de Chagas, sendo 10 blocos de coração e 10 do TGI, somando 20 blocos. Tais amostras foram submetidas às mesmas técnicas utilizadas. Em todas as amostras foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Nanodrop), para calcular a concentração total de DNA.

Estes blocos compreendem fragmentos do coração (parede lateral, parede anterior, nó sinusal, região átrio-ventricular, septo, etc) e do trato gastrointestinal - TGI (esôfago, duodeno e cólon).

Para a detecção do DNA do *T. cruzi* nos casos estudados, todas as amostras de DNA extraídas foram submetidas a PCR dupla, tendo como fragmento *alvo* o DNA satélite do *T. cruzi* e também do kDNA. Para amplificar o DNA satélite, foram utilizados os iniciadores TCZ1, TCZ2, TCZ3 e TCZ4 (Moser *et al.*, 1989; Ochs *et al.*, 1996; Marcon *et al.*, 2002), conforme descritos abaixo, gerando um produto de 149 pb, nas amostras positivas. Para o kDNA, selecionou-se os iniciadores S35, S36 e S67 (Sturn *et al.*, 1989) gerando um produto de 330 pares de base. Posteriormente, o produto de 330 pb conseguidos através da amplificação do kDNA foi purificado e seqüenciado para a comparação entre as seqüências geradas.

Como controle interno da reação, o gene da β -globina humana foi amplificado nas amostras, para verificar a qualidade do DNA extraído, onde os primers utilizados foram P3, P5 e 109, conforme o protocolo de Saiki e colaboradores (1985) com modificações, que geraram um produto de 365 pb nas amostras com boa qualidade.

Dos 23 casos estudados (126 blocos: 70 do coração e 56 do TGI), as amostras seqüenciadas consideradas no presente trabalho foram 25, sendo 13 delas referentes ao coração e 12, referentes ao TGI. Desses, seis casos foram completos (coração e TGI), seis casos seqüenciados apenas o TGI e em 7 casos, somente o coração. Foram analisadas

aquelas que apresentaram picos únicos, como descrito na figura 7. As amostras seqüenciadas que demonstraram sobreposição de seqüências foram desconsideradas (figura 8).

A quantificação absoluta pela PCR em tempo real foi realizada em 13 amostras obtidas do coração e 8 obtidas do TGI. Em oito casos, houve comparação quanto ao número de cópias existentes nos dois órgãos.

4- MÉTODOS

4.1- Extração do DNA genômico

Inicialmente, testamos vários protocolos descritos, inclusive o pré-tratamento (desparafinização), seguidos da digestão com proteinase K (20µg/ml) e extração pelo método fenol-clorofórmio, que apresentou resultado razoável. Entre outros testes, realizamos os seguintes protocolos (com modificações) descritos por Coates e colaboradores (1991) e Pardini e colaboradores (1997):

- Pré-tratamento (desparafinização sem aquecimento), com posterior fervura por 10 minutos em 100 µl de água destilada;
- Cortes de 10 µc, sem pré-tratamento, fervidos por 10 minutos em água destilada.
- Cortes pré-tratados, digeridos com proteinase K por 1 hora e fervidos por 10 minutos.
- Cortes pré tratados, adicionados a NaOH 0,05 M e tris-HCl, fervidos por 30 minutos a 96°C.

Nestes protocolos, a PCR foi realizada diretamente a partir das amostras sem extração, onde não houve resultados favoráveis.

A técnica de extração do DNA a partir de tecido fixado mais eficiente é descrita a seguir: nas amostras emblocadas em parafina, obtidas dos pacientes necropsiados, foram realizados de 12 a 15 cortes em micrótomo, com a espessura de 5 µc. Para cada bloco, foi utilizada uma navalha descartável, evitando-se assim, contaminação entre as partes de tecido a serem testadas. Estes cortes foram colocados em tubos tipo “eppendorf”, de 2ml e submetidos a extração, que subdivide-se em três partes: a) desparafinização e hidratação; b) digestão com proteinase K (digestão das proteínas); c) extração do DNA. Tanto a digestão quanto a extração, foram realizadas com *Kit Qiagen Dneasy Tissue Kit - Uniscience*.

As etapas estão descritas a seguir: a) Desparafinização – nesta etapa, adiciona-se 1ml de xilol à amostra, levando ao aquecimento em banho-maria a 65°C por trinta minutos. Agita-se no vórtex, centrifuga-se a amostra por 5 minutos a 14.000 RPM,

descarta-se o sobrenadante. Este procedimento foi repetido mais uma ou duas vezes até a total exclusão da parafina. A seguir, as amostras foram hidratadas com sucessivos banhos de etanol absoluto, 95%, 75% (duas vezes) e água destilada (duas vezes), agitando-se no vórtex e centrifugando a 14.000 RPM entre cada etapa, descartando-se o sobrenadante. b) Seguindo-se o protocolo do *Kit*, com algumas modificações, adiciona-se à amostra, 180 µl do buffer ATL e 20 µl da proteinase K (20µg/µl) – ambos incluídos no *Kit* mencionado. A amostra é então levada ao banho de 55°C a 60°C, por aproximadamente 3 dias (72 horas), até a completa digestão do tecido (que deve se apresentar como um líquido, sem nenhum grumo de tecido).c) Inicia-se, então, a extração do DNA, seguindo o protocolo do fabricante, com eluições finais de 50 µl, pois tecidos animais não resultam em grandes quantidades de DNA.

4.2- Identificação do DNA satélite do *T. cruzi* pela PCR dupla

Para esta reação, os oligonucleotídeos utilizados foram:

1ª reação:

***TCZ1: 5' CGAGCTCTTGCCCCACACGGGTGCT 3' sense**

***TCZ2: 5' CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG 3' antisense**

2ª reação:

***TCZ3: 5' TGCTGCA(G/C) TCGGCTGATCGTTTTTCGA 3' sense**

***TCZ 4: 5' CA(A/G)G(C/G)TTGTTTGGTGTCCAGTGTTGTGA 3' antisense**

***seqüências descritas por Moser *et al.*, 1989 e Ochs *et al.*, 1996**

A PCR dupla com indicadores TCZ, que flanqueiam uma região do DNA satélite (nuclear) do *T. cruzi* já estava padronizada para amostras de DNA extraídas a partir de leucócitos (MARCON *et al.*, 2002), no entanto fizemos algumas adequações no ciclo de

amplificação da segunda reação e também na quantidade de amostra utilizada em cada reação.

Para a primeira reação, em tubo tipo “eppendorf” foi adicionado 2 a 3 µl do DNA a ser estudado (extraído das amostras de tecido fixado); 50 mM de cloreto de potássio; 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 2,5 mM de cloreto de magnésio; 2,0 mM de cada oligonucleotídeo (TCZ1 e TCZ2 – 1ª reação; TCZ3 e TCZ4 – 2ª reação), mistura desoxirribonucleica (1 mM) - dNTPs (dATP, dGTP, dCTP; dTTP) e 2.0 U de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*). A esta mistura, foi adicionada água completando um volume final de reação de 30µl.

Adicionou-se então, 50 µl de óleo mineral para prevenir a evaporação dos reagentes. Para a segunda PCR (PCR dupla), houve mudança na concentração de MgCl₂ em relação à primeira para 2,8 mM. Nesta reação, uma alíquota (0,5 µl) do produto da primeira PCR foi reamplificada com um par de oligonucleotídeos (TCZ3 e TCZ4), que resulta em um fragmento de 149 pares de base, interno ao fragmento amplificado na primeira reação de 188 pb.

Foram empregados os mesmos ciclos em termociclador automático para a primeira e segunda reação. Ambas as reações foram precedidas de uma desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos e uma extensão final a 72° C por 7 minutos. Na primeira e segunda reação, foram utilizados 30 ciclos, dos quais os cinco primeiros são descritos:

- Desnaturação: 94° C por 1 minuto;
- Anelamento: 60° C por 1 minuto;
- Extensão: 72° C por 1 minuto e trinta segundos.

Nos próximos vinte e cinco ciclos foram utilizados:

- Desnaturação: 94° C por 1 minuto;
- Anelamento: 65° C por 1 minuto;
- Extensão: 72° C por 1 minuto e trinta segundos.

Após a amplificação, cerca de 6,0µl do produto da PCR dupla (DNA satélite) acrescidos de 2, 0µl do corante azul de bromofenol, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta. Nas amostras positivas, observou-se um fragmento de 149 pares de base, quando realizada a PCR dupla, em fragmento de DNA nuclear. Como controle positivo da reação, utilizamos um macerado da cepa Y do *T. cruzi*; como controle negativo, utilizaram-se amostras de tecido de pessoas com epidemiologia negativa para a doença de Chagas; e como branco da reação utilizamos água.

4.3- Identificação do kDNA do *T. cruzi* pela PCR dupla

Para região do kDNA do *T. cruzi*, foram utilizados os iniciadores descritos:

1ª reação:

***S67: 5' TGGTTTTGGGAGGGG (c/g) (g/c) (t/g)TCAA (a/c)TTT 3'**

***S35: 5' AAATAATG (t/g) ACGGGTGAGATGCA 3'**

2ª reação:

*** S35 : 5' AAATAATG(t/g)ACGGGTGAGATGCA 3'**

***S36: 5' GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT 3'**

***seqüências descritas por Sturn *et al.*, 1989 e Gonzalez, 1986.**

A PCR seguiu com algumas modificações, o método já descrito (Britto *et al.*, 1995 (a) e (b) , Gomes *et al.*, 1998, Sturn *et al.*, 1989).

Na primeira reação, em tubo tipo “eppendorf” foi adicionado 1,0 µl do DNA extraído dos tecidos, 50 mM de cloreto de potássio; 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 4,0 mM de cloreto de magnésio; 2,0 mM de cada oligonucleotídeo (S35 e S67), 1mM de cada dNTP (mistura desoxirribonucléica - dATP, dGTP, dCTP; dTTP) e 1.0 U de *Taq* DNA polimerase

(Invitrogen). A esta mistura reacional, foi adicionada água completando um volume final de reação de 30µl. Trinta e cinco ciclos foram realizados em termociclador automático, que foram precedidos de uma desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, e no final, uma extensão a 72° C por 7 minutos. Os 35 ciclos de amplificação empregados para cada amostra foram:

- Desnaturação: 94° C por 1 minuto;
- Anelamento: 56° C por 1 minuto;
- Extensão: 72° C por 1 minuto.

Após a primeira reação, diluiu-se o produto obtido na proporção 1:500 e 1:1000, para que o amplificado da segunda reação aparecesse sem bandas inespecíficas, pois o objetivo desta amplificação seria o seqüenciamento automatizado. Com estas diluições foram realizadas as segundas reações, nas seguintes condições: em tubo tipo “eppendorf” foi adicionado 1,0 µl do produto da 1ª reação (diluído), 50 mM de cloreto de potássio; 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 4,0 mM de cloreto de magnésio; 2,5 mM de cada oligonucleotídeo (S35 e S36), 1,0 mM da mistura desoxirribonucleica - dNTPs (dATP, dGTP, dCTP; dTTP) e 2.0 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). A esta mistura, foi adicionada água completando um volume final de reação de 50µl. Trinta e cinco ciclos foram realizados em termociclador automático, que foram precedidos de uma desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, e no final, uma extensão a 72° C por 7 minutos. Os 35 ciclos de amplificação empregados para cada amostra foram:

- Desnaturação: 94° C por 1 minuto;
- Anelamento: 63° C por 1 minuto;
- Extensão: 72° C por 1 minuto e 30 segundos.

4.3.1- Seqüenciamento automatizado para a região do kDNA

O *Mega BACE 1000* é um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia *Amersham Biosciences*. As reações de seqüenciamento foram realizadas segundo o protocolo do sistema, utilizando o *kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (com *Thermo KinaseTM II DNA polimerase*).

Após a PCR dupla para o kDNA, cerca de 5 µl do produto amplificado foi acrescido de 2 µl de azul de bromofenol e submetido à corrida em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. O produto da PCR onde as bandas obtidas se apresentaram limpas e com intensidade boa foram purificadas com o *Kit Life Technologies – New Rapid Purification Protocol*, para purificação, e após essa purificação, 2µl desse produto acrescido de 2µl de azul de bromofenol foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, usando como marcador o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen), para quantificar o produto a ser utilizado na reação de seqüenciamento.

No seqüenciamento, utilizamos os oligonucleotídeos sense (S35) e antisense (S36). Em uma reação de 10ul, adicionou-se: 1 µl de cada iniciador, 1 µl de Big Dye (fluoróforo), 1 µl da reação purificada (amostra) e completou-se a reação para 10 µl de água destilada estéril. Seguiu-se para o termociclador (*Gene Amp PCR System 9600 – Applied Biosystems*) para desnaturação da fita e incorporação dos nucleotídeos marcados, onde os ciclos foram os seguintes: 96 °C por 10 mim (1 ciclo); trinta e cinco (35) ciclos de 96 °C por 10 segundos, 57 °C por 5 segundos (1 ciclo) e 60 °C por 4 minutos.

A amostra foi então purificada e precipitada para o seqüenciamento, onde foi adicionado 2 µl de acetato de amônio 7,5 M e 50µl de etanol absoluto (temperatura ambiente). Agitou-se em vórtex com descanso de 15 minutos (coberto com alumínio ou no escuro). Centrifugou-se por 30 minutos na rotação máxima (13 a 14.000 RPM) a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 100 µl de etanol 70%. Centrifugou-se novamente na rotação máxima por 15 minutos. Todo o volume foi retirado com cuidado para não tocar a parede do tubo, deixando secar a 65°C por 3 a 5 minutos, até o tubo ficar bem seco. Os tubos foram mantidos cobertos com papel alumínio. A reação foi aplicada na placa de seqüenciamento, sendo o aparelho utilizado, o *Mega BACE 1000*.

Após a eletroforese em MegaBACE Long Read Matrix com poliacrilamida linear, o software MegaBACE analisou as seqüências e as amostras, podendo os eletroferogramas serem visualizados no programa Chromas (www.technelysium.com.au/chromas.html).

4.3.2- Alinhamento das seqüências

Após a análise das seqüências nucleotídicas no programa Chromas, as que apresentaram picos definidos (figura 7) foram exportadas sob o formato FASTA ao programa *Gene Runner*, onde foram alinhadas entre si. Foram realizados alinhamentos entre as seqüências do coração (13 casos); entre as seqüências do TGI (12 casos), além de serem alinhadas todas as seqüências nucleotídicas juntas.

No programa *Blast 2 Sequences*³, cada seqüência foi alinhada com aquela descrita por Gonzalez (1986), acesso X04680 do *Genbank*.

4.4- Quantificação absoluta pela PCR em tempo real

A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR (Higushi *et al.*, 1993), através da ligação de uma sonda específica ou um corante na fita recém sintetizada.

Para realizar quantificações absolutas, é preciso ter amostras padrão previamente quantificadas, ou seja, com quantidades conhecidas de cópias do fragmento alvo. Tal amostra padrão foi conseguida através da clonagem do fragmento interno da PCR dupla da região do DNA satélite do *T. cruzi* (iniciadores TCZ3 e TCZ4), para assim produzirmos a curva padrão, com 6 pontos de diluição (escala logarítmica). O produto da PCR selecionado para a clonagem foi obtido a partir da cepa Y do *T. cruzi*.

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>

Na quantificação absoluta do DNA do *T. cruzi* em tecidos fixados, utilizamos o método *Sybr Green*, uma molécula fluorescente, que se intercala na molécula de DNA, emitindo um sinal luminoso em cada ciclo.

4.4.1- Clonagem e seqüenciamento

Realizou-se a clonagem do fragmento amplificado que flanqueia a região do DNA nuclear para a construção da curva padrão. Então, o clone foi purificado e seqüenciado para confirmação do inserto. A amostra desejada foi submetida à cultura em meio SOC (10mM de cloreto de magnésio, 10mM de sulfato de magnésio, 20mM de glicose, triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio, cloreto de potássio), submetida à extração pelo *Kit Miniprep*, e logo após, digerida com a enzima de restrição ECO RI para linearização do plasmídeo. Todas essas etapas estão descritas abaixo.

Primeiramente, realizou-se a reação de ligação, onde foi utilizado o *Kit PROMEGA P GEM – T Easy Vector System I*, onde ao volume de reação de 10 µl, mistura-se 1µl do plasmídeo (50ng/µl), 250 ng do produto da PCR (dupla) para a região do DNA satélite, 5 µl da solução tampão e 1µl da T4 DNA ligase, completa-se com água para 10 µl, homogeneiza-se e deixa-se a 4°C de um dia para outro. Adiciona-se, então, cerca de 5µl dessa reação a 200 µl da cultura de células competentes (*E. coli*), levando esta mistura por 20 minutos no gelo e 1h e 30min a 42°C, e após, por 2 minutos no gelo. Insere esta reação em cerca de 800 µl de meio SOC, deixando-se incubar, sob agitação de 220 RPM, por 1 hora a 37°C em termomix (Thermomixer Comfort – Eppendorf). Após centrifugação a 3000 rpm por 1 minuto, foi descartado aproximadamente 600 µl do meio, sendo o restante ressuspendido e plaqueado. A placa foi mantida em estufa a 37°C de um dia para outro.

A partir do crescimento das colônias, coletou-se com palitos descartáveis as colônias brancas, ou seja, aquelas que não expressaram o gene *lacZ*, colocando-se cada uma em um poço da placa em meio *Circle Grow* (*Pharmacia*), deixando crescer a 37°C a 120 rpm, de um dia para outro. Realizou-se, então, a partir da cultura turva, a PCR para amplificação do inserto para posterior purificação e seqüenciamento. A PCR segue o

seguinte protocolo para uma reação de 15 µl: 2µl da cultura do plasmídeo, 1,5 µl de solução tampão, 1,5 µl de dNTP (1,25 mM), 0,5 µl de MgCl₂ (50mM), 0,35 µl do iniciador M13 sense e 0,35 µl do iniciador M13 antisense (do plasmídeo), 0,35 µl de *Taq* DNA polimerase, 8,6 µl de água estéril, submetidos ao seguinte ciclo de amplificação: desnaturação inicial: 2 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos: 94 °C por 20 segundos; 58 °C por 15 segundos; 72°C por 1 minuto.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese e visualizado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, para a confirmação do inserto.

A reação foi submetida à purificação e seqüenciamento automatizado em aparelho *ABI PRISM 377*, confirmando o inserto e o fragmento de 149 pb foi comparado à literatura (Moser *et al.*, 1989).

Após confirmação do inserto pelo seqüenciamento, realizou-se a cultura da amostra desejada em meio SOC, em seguida extraiu-se o DNA do plasmídeo com um kit *ConcertTM Rapid Plasmid Miniprep System*, seguido da linearização do produto com a enzima *ECO RI* e posterior quantificação em espectrofotômetro (Nanodrop®).

4.4.2- Padronização da PCR em tempo real

Foi padronizada a concentração ótima dos iniciadores a serem utilizados na PCR quantitativa, que deveria ser a mínima o suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias da seqüência alvo presentes na amostra. Utilizando a mesma quantidade de amostra (uma das diluições do produto clonado amplificado) foram feitas reações com concentrações finais de iniciadores com 150nM, 300nM, 600nM, 900nM. Considerando-se que foi utilizada a mesma quantidade de amostra em todas as reações, os Cts (*Cycle Threshold* – ciclo de amplificação) não deveriam variar. A concentração ótima escolhida foi a mínima, associada ao menor Ct, que no caso foi de 150 nM.

Utilizando a concentração ótima do iniciador, foi determinada a eficiência da reação. Para isso, foram utilizadas reações com o produto clonado diluídos em escala logarítmica, cujos resultados geraram uma curva padrão Ct *versus* quantidade de amostra.

A eficiência da amplificação é obtida a partir da fórmula $E = 10^{(-1/slope)}$, onde *slope* corresponde ao coeficiente de inclinação da reta (Pfaffl, 2001), dado pelo programa Gene Amp® SDS (Applied Biosystems)

Cada amostra submetida a esta técnica foi quantificada em espectrofotômetro, sendo a concentração utilizada de 2ng/μl de DNA. Na reação de 25μl, 12,5μl corresponde à molécula fluorescente *Sybr Green*, 6,25μl refere-se ao mix de iniciadores e 6,25μl ao mix de amostra, ou seja, a quantidade de DNA equivalente à concentração de 2ng/μl, completando-se com o volume de água. Por exemplo, na amostra 54/99 12 coração, a concentração de DNA total foi de 96,5 ng/μl, então, no volume final da reação utilizamos 1,12 μl de amostra e 5,13 μl de água.

Além disso, como controle interno da reação (para verificar a integridade do DNA extraído de tecido emblocado), todas as amostras foram submetidas à amplificação da β-actina humana no mesmo ciclo de amplificação. As amostras nas quais não houve amplificação da β-actina foram desconsideradas. Em todo o ciclo de amplificação, os reagentes sem DNA foram submetidos à reação para certificar-se da não contaminação.

As condições de temperatura da PCR em tempo real foram: 1ª etapa: 2 minutos a 50° C; 2ª etapa: desnaturação por 10 minutos a 95°C; 3ª etapa: 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Os resultados foram analisados através do *Gene Amp 7500 Sequence Detector System® Software (Applied Biosystems)* em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) é denominado Ct. Quanto maior o número de cópias do DNA nuclear do *T. cruzi* houver na amostra, mais precocemente ocorre a amplificação e menor é o Ct.

4.4.3- Análise estatística da quantificação pela PCR em tempo real

Nas 13 amostras de DNA provenientes do coração, verificamos a relação entre peso do coração e número de cópias. Realizamos a análise descritiva com apresentação de medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas. Para verificar a associação linear entre 2 variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de *Spearman*. Este coeficiente

varia de -1 a 1. Valores próximos dos extremos indicam correlação negativa ou positiva, respectivamente e valores próximos de zero não indicam correlação (Conover, 1971). O software utilizado foi o *SAS System for Windows (Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 *Service Pack 3*. *SAS Institute Inc*, 2002-2003, Cary, NC, USA.

A análise estatística foi realizada pela Câmara de Pesquisa da FCM/UNICAMP e aceito para compor essa dissertação.

5- RESULTADOS

5.1- Detecção do DNA satélite do *T. cruzi* em amostras de tecido

Foram analisadas necrópsias de 23 pacientes, sendo 18 com forma cardíaca da doença de Chagas e 5 com a forma cardiodigestiva (tabela 1). As necrópsias desse 23 pacientes somaram um total de 126 blocos, sendo 70 referentes a tecidos do coração e 56 referentes ao TGI (tabela 2, gráfico 1A). Obtivemos um índice de positividade (quanto a PCR dupla do DNA satélite) de 86% nas amostras extraídas do coração (gráfico 1B) e de 87% nas amostras de DNA extraídas do TGI (gráfico 1C).

Consideramos amostras positivas aquelas que apresentaram o produto de amplificação de 149 pb (figura 3), obtidos a partir da PCR dupla da região do DNA satélite do *T. cruzi*. Dos 18 pacientes com a forma cardíaca, analisamos um total de 98 amostras, onde 84,3% apresentaram positividade. Dessas 98 amostras, 42 correspondem aos fragmentos do TGI e 56 correspondem aos fragmentos do coração. Dentre as 42 amostras extraídas do TGI, 35 foram positivas, e das 56 analisadas do coração, 48 demonstraram positividade (tabela 2). Considerando os cinco casos da forma cardiodigestiva, 26 das 28 amostras analisadas foram positivas, o que equivale a 92,8%. Nesses casos, todas as amostras do TGI submetidas a PCR dupla foram positivas, e das 14 amostras extraídas do coração, 12 resultaram em positividade (85,7%).

Tabela 1- Dados dos pacientes necropsiados e resultados da PCR dupla para o DNA satélite

Necrópsia	Idade	Sexo	Procedência	Sorologia	Forma clínica	Achados anátomo-patológicos	Coração: blocos/ N PCR positiva	TGI: blocos/ N PCR positiva
N 136/86	67	M	ND	Positiva	Cardiopatia	Coração=420g, rosário chagásico	2/2	2/2
N188/86	58	M	ND	Negativa	Cardiopatia	Coração=375g, lesão de ponta	4/2	3/1
N60/87	50	M	Salto-SP	Negativa	Cardiopatia	Coração=350g, lesão de ponta, miocardite	2/2	2/2
N 147/87	22	M	Bahia	Positiva	Cardiodigestiva	Coração=600g, ninhos de amastigotas, megacólon e megaesôfago	3/3	2/2
N08/87	65	M	Monteiro-PB	Negativa	Cardiopatia	Coração=400g, ninhos de amastigotas	1/1	2/2
N262/87	85	F	Grananda-Esp	Positiva	Cardiodigestiva	Coração=280g, mancha Láctea, megaesôfago	3/2	3/3
N 13/88	66		ND	Positiva	Cardiopatia	Coração =470g, lesão apical	2/1	2/1
N209/88	47	M	Nova Granada - SP	Positiva	Cardiopatia	Coração= 670 g, lesão de ponta, ganglionite	1/1	3/2
N140/88		M	Santa Rosa Viterbo – SP	Positiva	Cardiopatia	Coração=450g, miocardite	2/2	2/2
N208/88	76	F	Leme - SP	Positiva	Cardiopatia	Coração=620g, miocardite, miosite	2/2	1/1
N 28/88	17	M	ND	Positiva	Cardiodigestiva	Megacólon	2/2	2/2
N238/88	50	F	ND	ND	Cardiopatia	Coração=490g, ganglionite no cólon e esôfago	2/2	2/2
N159/98	71	F	Interior SP	Positiva	Cardiopatia	Coração=640 g	6/6	3/1
N54/99	28	F	Sul MG	Positiva	Cardiopatia	Coração=340 g, mancha Láctea, lesão de ponta	7/4	3/3
N157/99	35	F	Riacho de Aurélio-BA	ND	Cardiodigestiva	Coração=540 g	4/4	5/5
N74/01	39	F	Guanambi-BA	Positiva	Cardiopatia	Coração =540 g, mancha láctea, lesão de ponta	9/7	5/4
N 08/01	80	M	Água Comprida/MG	Positiva	Cardiodigestiva	Acometimento neurovegetativo (esôfago e cólon), coração=560g, lesão de ponta	2/1	2/2
N 64/01	27	M	Guanambi-BA	Positiva	Cardiopatia	Coração=990g, lesão de ponta, ninhos de amastigotas	6/6	2/2
N 138/03	85	F	Sumaré-SP	Positiva	Cardiopatia	Coração=390g, hipertrofia VD, dilatação VE/VD	2/2	2/2
N 64/04	72	M	ND	Positiva	Cardiopatia	Coração=610g, mancha Láctea, rosário chagásico	2/2	2/2
N 106/04	70	F	Motuca -SP	Positiva	Cardiopatia	Coração=580g; câmaras dilatadas; esôfago com ganglionite	2/2	2/2
N 72/04	65	M	Barra São Francisco – BA	Positiva	Cardiopatia	Coração=565g, dilatação das câmaras, lesão de ponta	2/2	2/2
N 35/05	56	M	Flórida Paulista-SP	Positiva	Cardiopatia	Coração=440g	2/2	2/2

Tabela 2- Número de casos estudados quanto a PCR dupla da região do DNA satélite em blocos do TGI e coração.

Forma clínica	Nº casos	Total de blocos	Pos. TGI	Pos. coração
Cardíaca	18	98/83 (84,6%)	42/35 (83,3%)	56/48 (85,7%)
Cardiodigestiva	5	28/26 (92,8%)	14/14 (100%)	14/12 (85,7%)
Total	23	126/109 (86,5%)	56/49(87,5%)	70/60(85,7%)
Controles negativos	10	20/0 (0%)	10/0 (0%)	10/0 (0%)

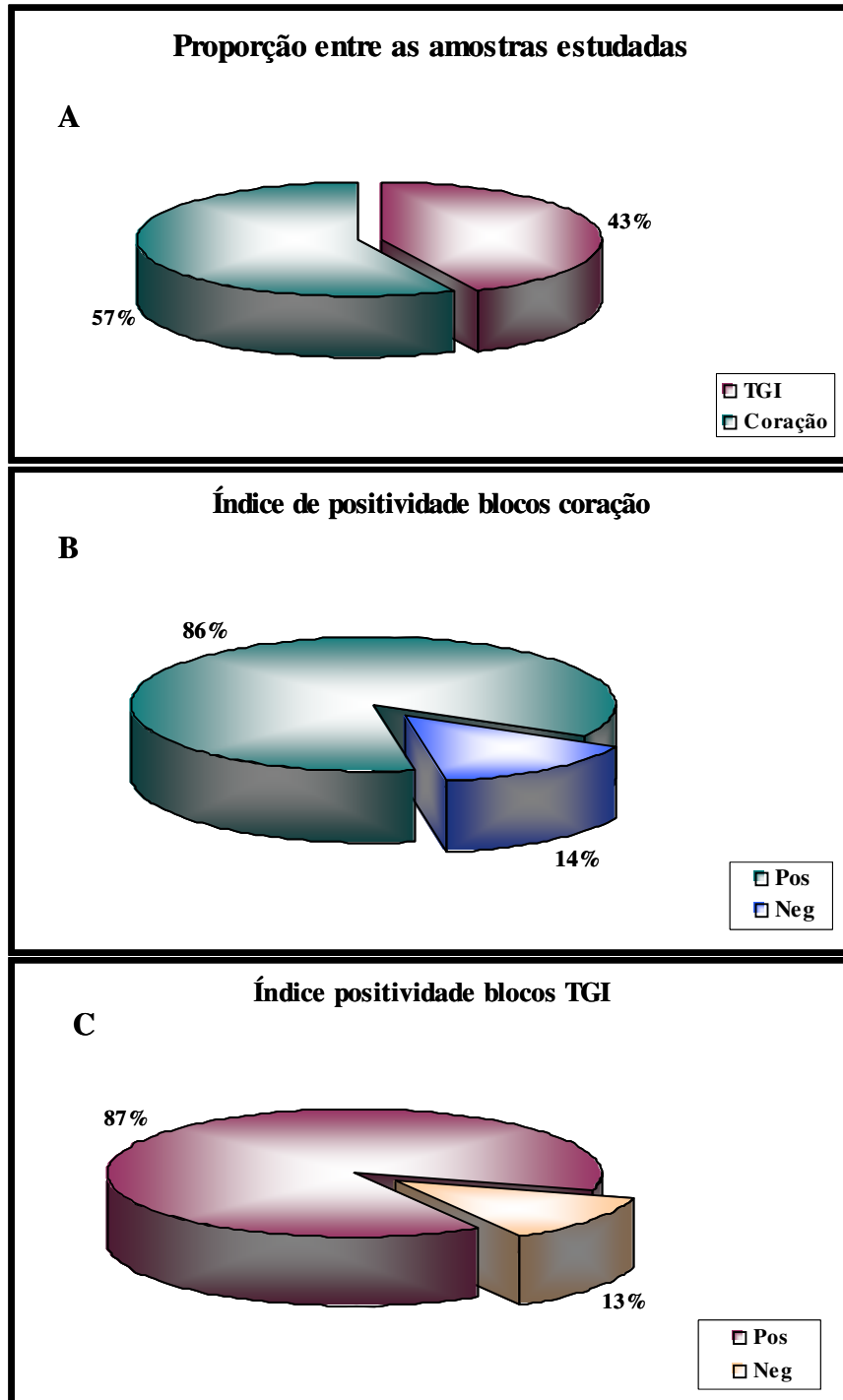


Gráfico 1- Proporções entre os blocos estudados e índice de positividade em relação à PCR dupla (DNA satélite).

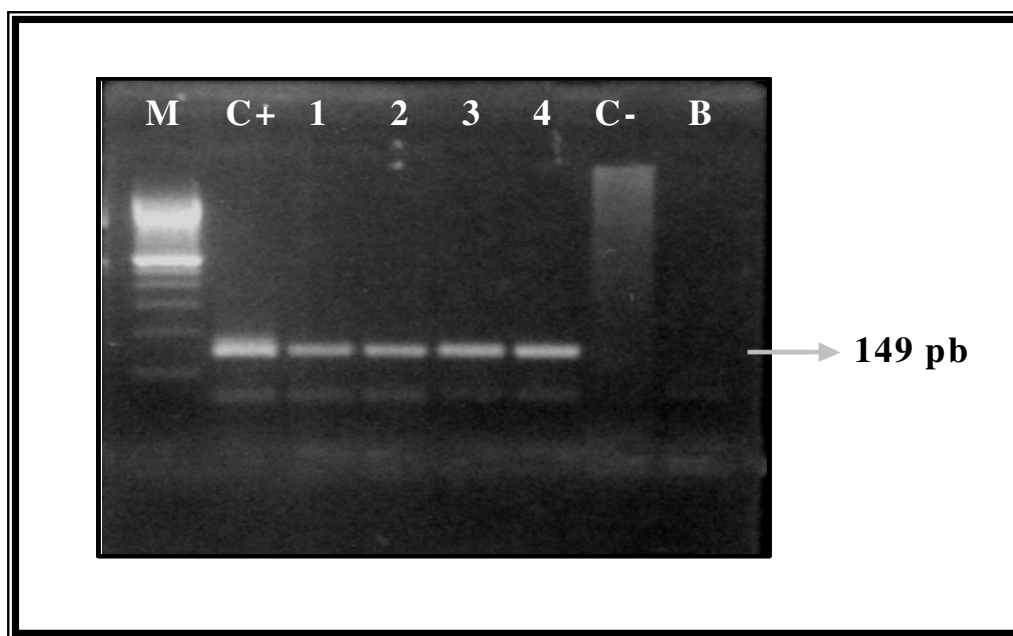


Figura 3- Amplificação pela PCR dupla da região satélite do *T. cruzi*, com um produto de 149 pb.

M: marcador Ladder 100 pb (*Invitrogen*);

C+: controle positivo, cepa Y do *T. cruzi*;

1 a 4: amostras de DNA extraídas de tecido positivas para o *T. cruzi*;

C - : controle negativo, amostra de tecido de paciente com epidemiologia negativa para a doença de Chagas;

B: branco da reação, sem DNA

5.2- Análise do kDNA do *T. cruzi* em amostras de tecido

A amplificação do kDNA em amostra de tecido pela PCR dupla teve como objetivo selecionar produtos amplificados para o seqüenciamento automatizado. A padronização da PCR dupla para esta região permitiu a obtenção de bandas limpas e fortes, apropriadas ao seqüenciamento. As amostras positivas apresentaram um fragmento de 330pb, após a PCR dupla (figura 4).

Dos 23 casos onde analisamos, através da PCR dupla para a região do kDNA, houve amplificação em pelo menos um dos tipos de tecido, coração ou TGI. Não foram realizadas análises quanto à porcentagem de positividade primeiramente porque este não era o objetivo do trabalho e também devido às repetições a fim de conseguirmos bandas únicas para o seqüenciamento.

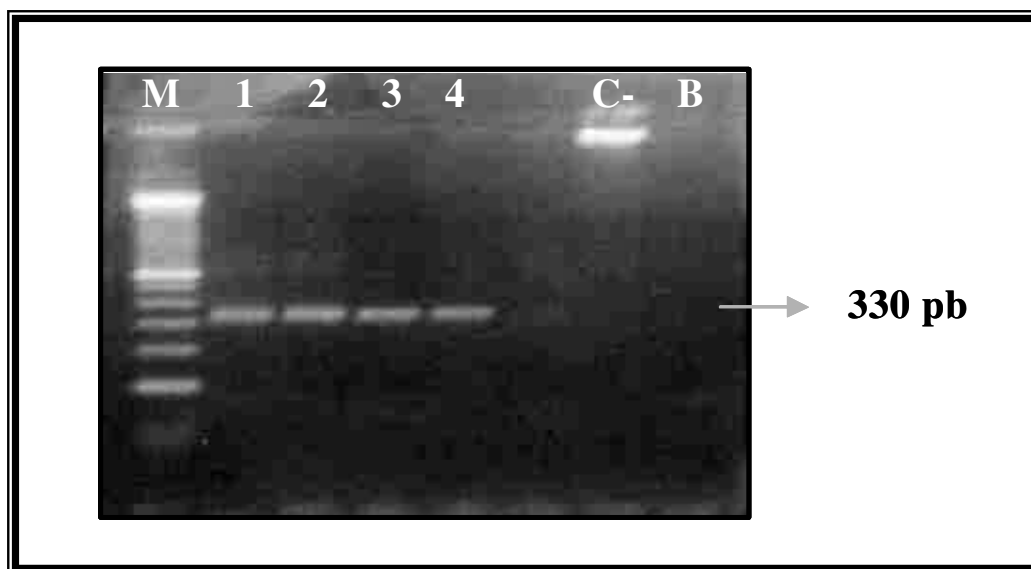


Figura 4- Amplificação pela PCR dupla do kDNA, demonstrando um produto de 330 pb.

M: marcador Ladder 100pb (*Invitrogen*);

C+: controle positivo cepa Y do *T. cruzi*;

1 a 4: amostras positivas (tecido);

C-: controle negativo;

B: branco da reação (sem DNA)

5.2.1- Seqüenciamento automatizado do kDNA

Após o alinhamento, observou-se que houve similaridade entre os blocos conservados do minicírculo do kDNA (figura 5). No entanto, o alinhamento entre as amostras e a seqüência do minicírculo descrita por Gonzalez (1986) reflete uma grande variabilidade genética entre as amostras seqüenciadas. Dentre as 23 amostras onde houve seqüenciamento do fragmento do kDNA extraído do coração e/ou TGI, observamos que cada seqüência é única, não havendo similaridade significativa entre elas (figura 6). Comparando-se as amostras do coração entre si (13 amostras), também observamos grande variabilidade, assim como entre as amostras do TGI (12 amostras).

Figura 5- Alinhamento entre linhagens do *T. cruzi* e seqüência descrita por Gonzalez (1986) (acesso: X04680) e amostra clínica (28/88_10 coração).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>

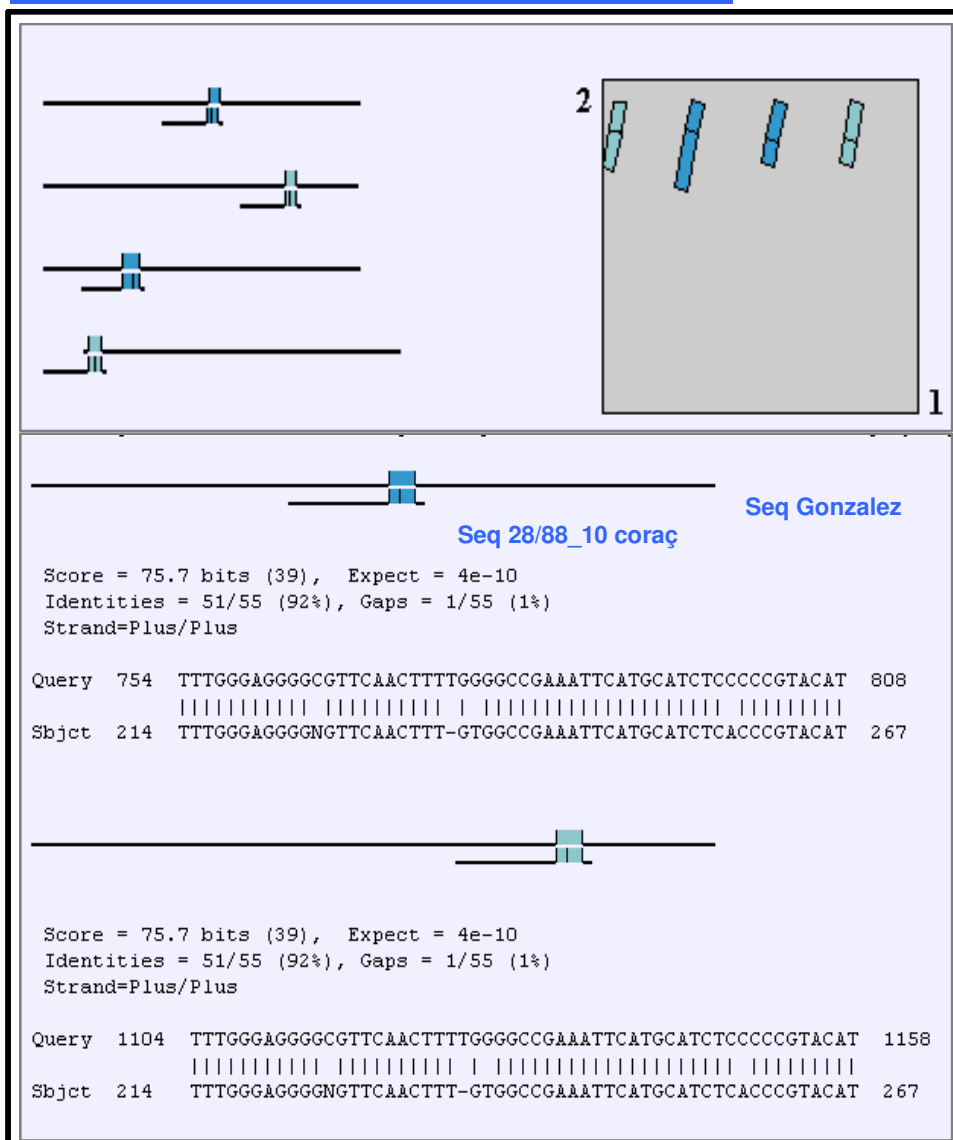


Figura 5- Alinhamento realizado entre uma amostra testada (28/88_10 coração) com a seqüência nucleotídica descrita por Gonzalez (1986) disponível no *Gen Bank*. Os quadros em azul e verde demonstram nos trechos do minicírculo do kDNA. Na seqüência nucleotídica, “*query*” significa o que está disponível no banco de dados e “*subject*” a seqüência obtida por seqüenciamento e enviada para alinhamento. Essa figura demonstra a variabilidade genética existente entre as amostras.

Figura 6- Alinhamento entre as seqüências (*Gene Runner*).

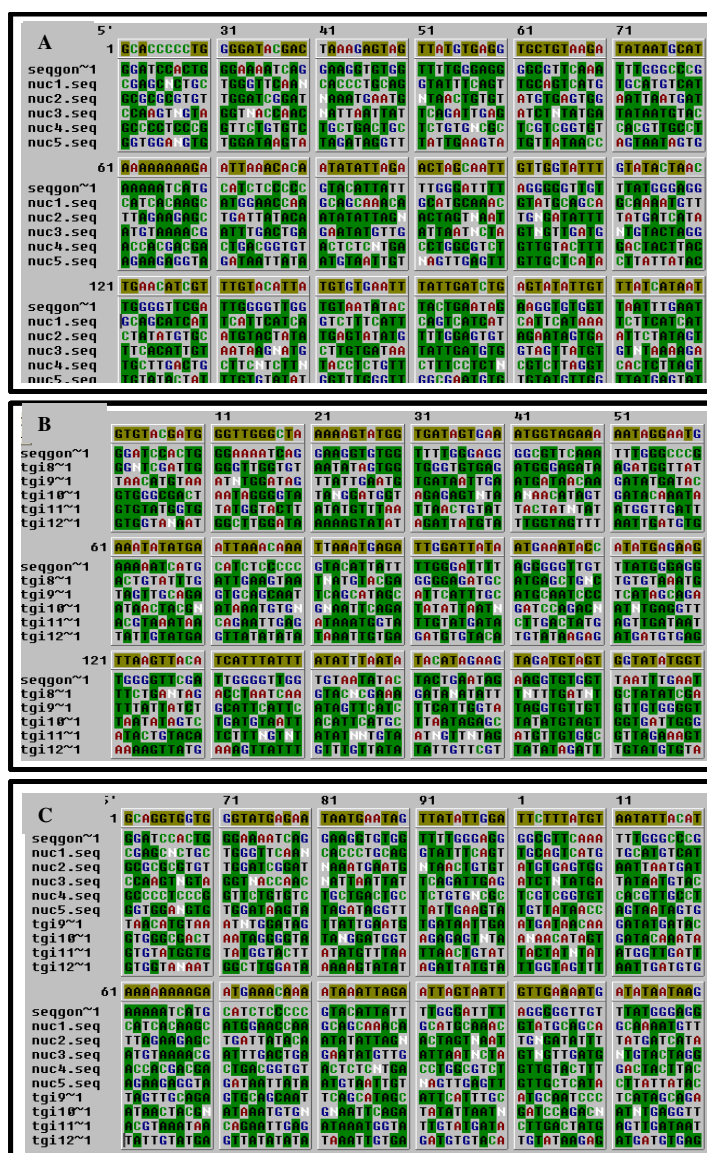


Figura 6- A: alinhamento entre seqüências nucleotídicas do coração; B: alinhamento entre seqüências do TGI; C: alinhamento entre coração e TGI. A primeira linha (verde-musgo) demonstra uma seqüência comum entre todas alinhadas, gerada pelo programa *Gene Runner*. A cor verde existente entre as seqüências, reflete as bases nucleotídicas coincidentes relacionadas ao alinhamento com a seqüência descrita por Gonzalez (1986), demonstrando que há pouca similaridade entre as seqüências do kDNA. A abreviação “seqgon” refere-se à seqüência disponível no Gen Bank (acesso: X04680), “nuc” refere-se a seqüência obtida do coração, e “tgi” do trato gastrointestinal.

Figura 7- Eletroferograma com iniciador S35 – amostra 64/04_PP/VE - coração

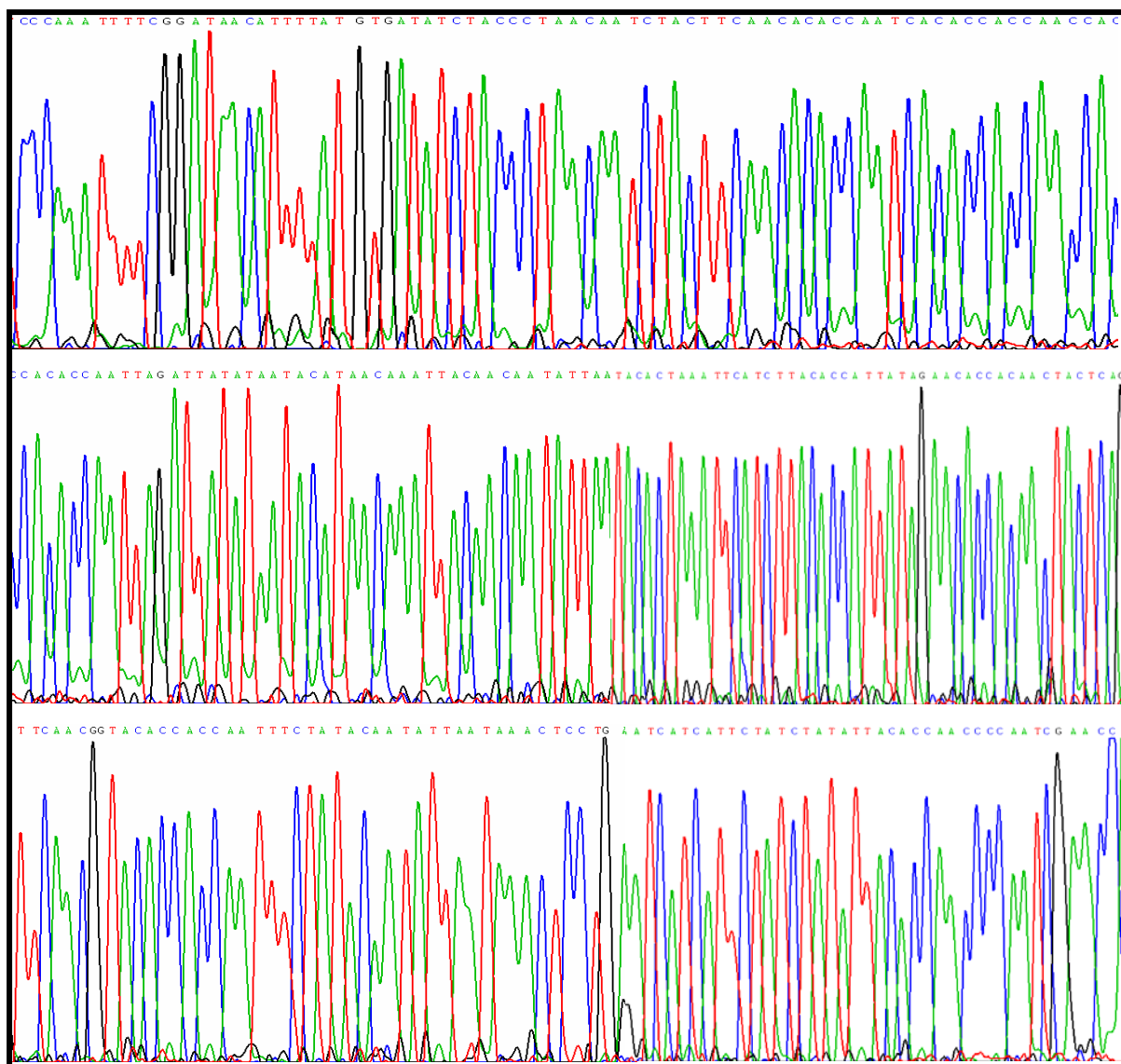


Figura 7- Sequenciamento de DNA da amostra extraída do coração (64/04 PP/VE), onde os picos em azul representam a base citosina (C), em preto, guanina (G), em vermelho, timina (T) e em verde, adenina (A).

Figura 8- Eletroferograma com iniciador S36, 54/99_corção (picos desencontrados).

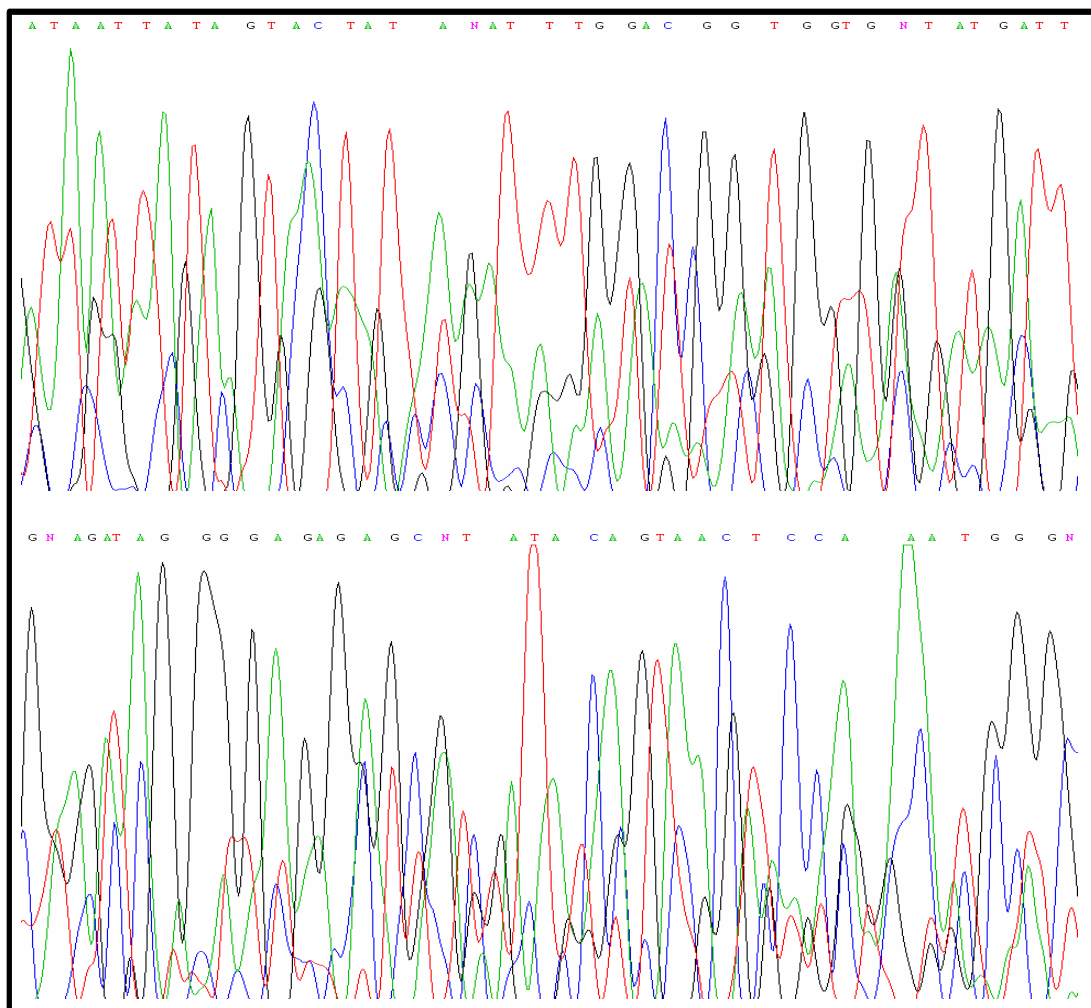


Figura 8- Sequenciamento de DNA da amostra extraída do coração (54/99_corção), onde os picos em azul representam a base citosina (C), em preto, guanina (G), em vermelho, timina (T) e em verde, adenina (A). Nessa figura, os picos estão desencontrados, devido à presença de vários clones do parasito no tecido infectado e também reflete a variabilidade de seqüências presentes no kDNA, não havendo, portanto, confiabilidade na seqüência.

5.3- Quantificação absoluta pela PCR em tempo real

Após a amplificação, a análise foi realizada com os seguintes parâmetros:

$slope = - 3,467778$ (aproximadamente 98% de eficiência). Nessa análise, dois pontos da curva foram retirados para resultar em maior eficiência. A PCR em tempo real foi padronizada com a concentração final de DNA de 2ng/μl. As curvas obtidas a partir da amplificação em tempo real estão demonstradas na figura 3.

Quantificamos as amostras de DNA pela PCR em tempo real em 13 amostras obtidas do coração e 6 obtidas do TGI. Em seis casos, houve comparação quanto ao número de cópias existentes nos dois órgãos. Quanto às amostras do coração, de um modo geral, observamos que não há uma relação entre o peso do coração e número de cópias encontradas (tabela 3; gráfico 2). No entanto, verificamos que há uma tendência de correlação inversa entre o número de cópias e peso do coração (gráfico 3).

Comparando-se os seis casos, onde foram quantificadas amostras do DNA extraído do coração e TGI concomitantemente, verificamos que há maior quantidade de cópias do fragmento TCZ no coração, comparando-se ao intestino (tabela 4). Nos dois casos onde a forma clínica é a cardiodigestiva, a diferença entre o número de cópias é relativamente menor entre os dois órgãos, comparando-se com as diferenças existentes nos casos de cardiopatia (gráfico 4).

Figura 9- Curva de amplificação das amostras e curva-padrão da PCR em tempo real.

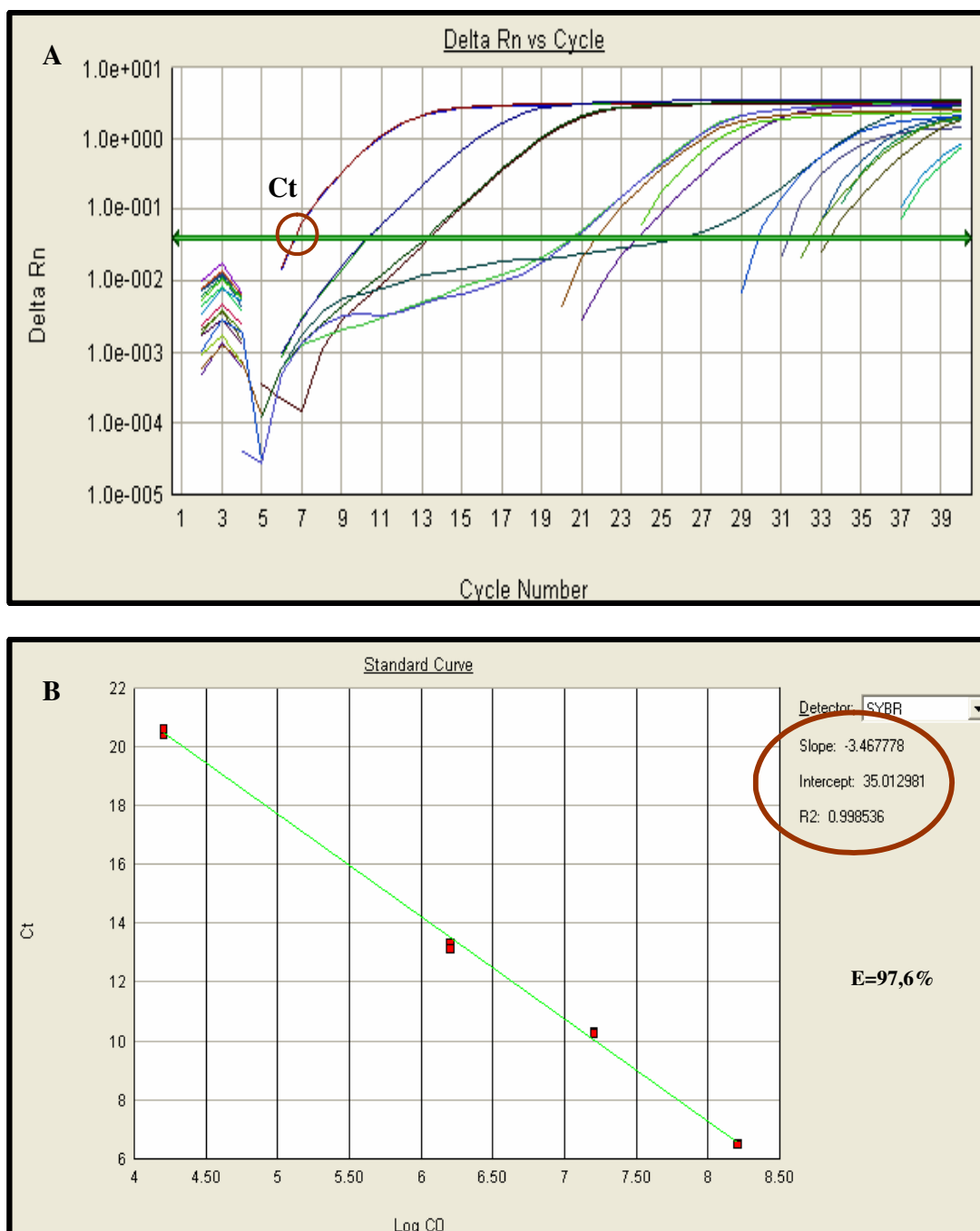


Figura 9- A: Curva de amplificação das amostras e curva-padrão. **B:** Curva-padrão e eficiência da reação dada pela fórmula $E=10^{-1/slope}$, então $E=97,6\%$ de eficiência. *Intercept*= Ct, onde detectaríamos uma cópia do DNA estudado (DNA satélite).

Tabela 3- Relação entre o peso do coração e o número de cópias obtidas pela PCR em tempo real

AMOSTRA	PESO CORAÇÃO	CÓPIAS
64/01-53 PL/VE	990g	1770,2
158/98 VE	640g	5,77
208/88 PP	620g	256,23
64/04 10 PL/VE	610g	395,87
147/87 SI	600g	33,44
08/01 37AD/VE	560g	11,54
238/88 V CORAÇ	490g	283,31
140/88 CDA CORAÇ	450g	1524,05
35/05 VE/PT	440g	681,69
136/86 AD	420g	1965,23
138/03 31 CORAÇ	390g	548,1
54/99 12 CORAÇ	340g	1854,84
262/87 FH	280g	3,12

Tabela 3- Amostras: fragmentos do coração testados por PCR e, tempo real; **peso do coração:** peso em ordem decrescente dos corações testados; **cópias:** número de cópias do DNA do *T. cruzi* obtidas pela PCR em tempo real.

Gráfico 2- Análise estatística entre peso do coração e número de cópias obtidas pela PCR em tempo real.

Variável	N	Média	desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Peso coração	13	525.38	180.31	280.00	490.00	990.00
Cópias	13	717.95	770.66	3.12	395.87	1965.23

Coeficiente de correlação de Spearman = -0.20330 (p-valor=0.5053)

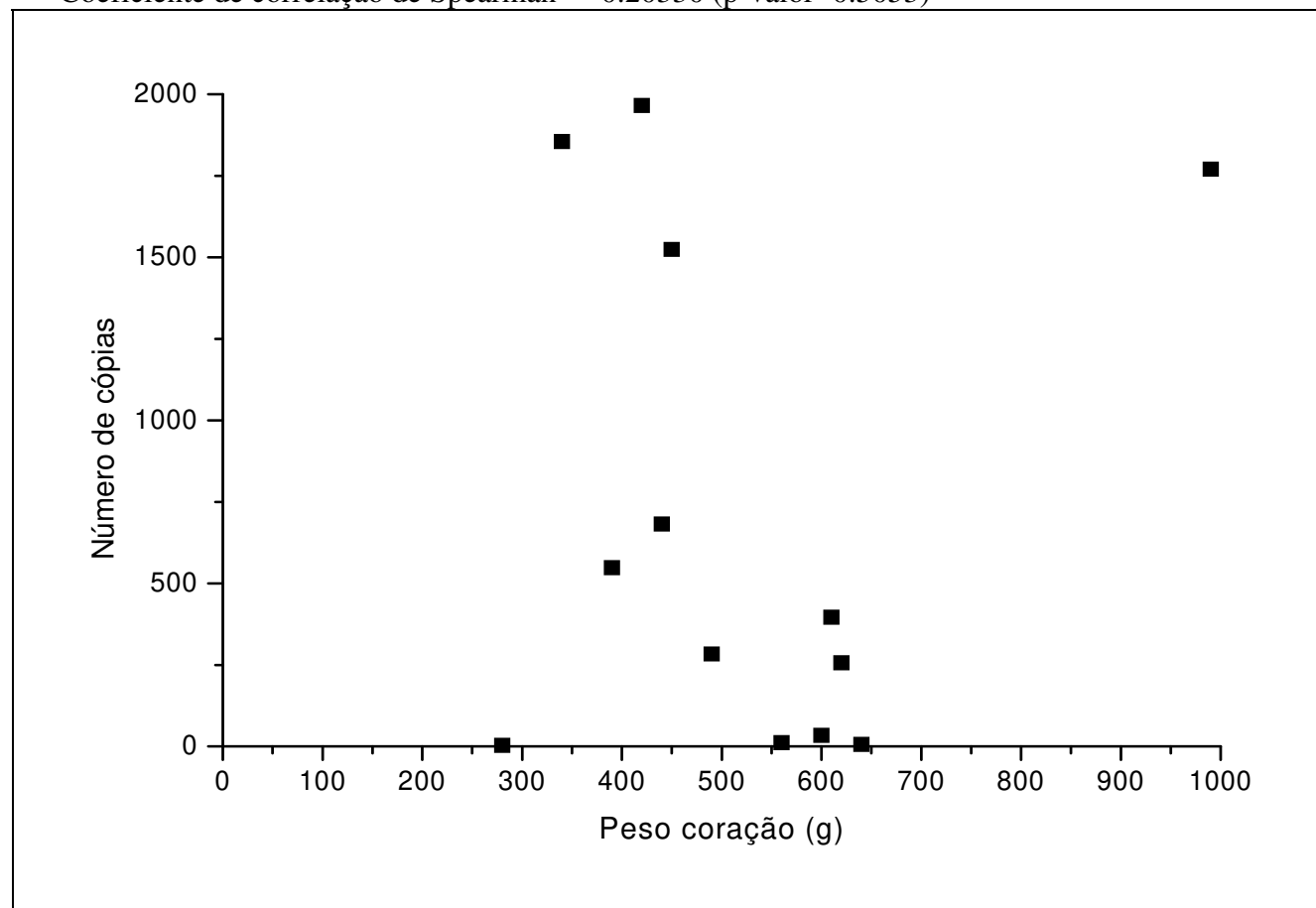


Gráfico 2- Correlação entre peso do coração e número de cópias, segundo cálculos estatísticos.

Gráfico 3- Relação entre peso do coração e número de cópias avaliados pela PCR em tempo real.

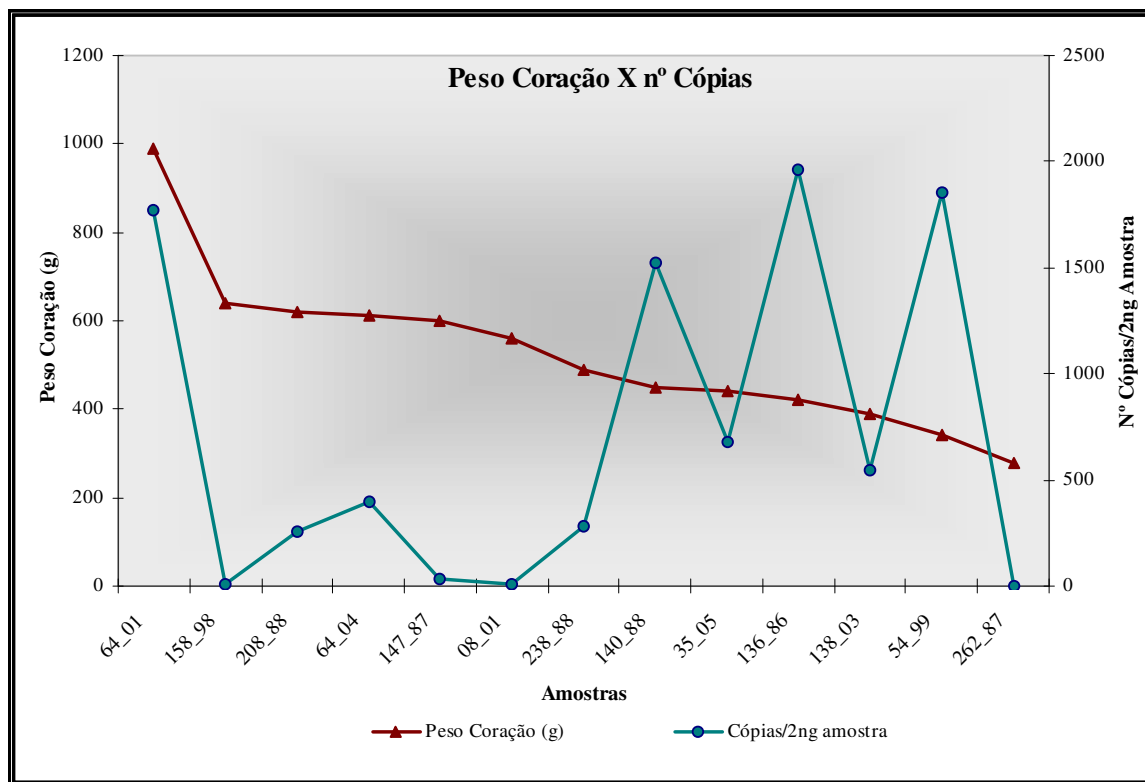


Gráfico 3- Sugere que há uma correlação inversa entre peso do coração e número de cópias do DNA do *T. cruzi* obtidas pela PCR em tempo real.

Tabela 4- Relação entre as amostras do TGI e coração com o número de cópias obtidas pela PCR em tempo real.

Amostras	Cópias	Forma clínica
147/87 I (TGI)	14,15	Cardiodigestiva
147/87 SI (coraç)	33,44	
08/01-15 (TGI)	8,77	Cardiodigestiva
08/01-37 AD/VE (coraç)	11,54	
208/88 esof (TGI)	5,74	Cardíaca
208/88 PP (coraç)	256,23	
238/88 Cólon (TGI)	29,2	Cardíaca
238/88 V (coraç)	283,31	
35/05 18 esof (TGI)	211,22	Cardíaca
35/05 VE/PT (coraç)	681,69	
64/04-6 Cólon (TGI)	12,93	Cardíaca
64/04-10 PL/VE (coraç)	395,87	
64/01-31 IG (TGI)	4,75	Cardíaca
64/01-53 PL/VE (coraç)	1770,2	
138/03-25 (TGI)	35,45	Cardíaca
138/03-31 (coraç)	548,1	

Tabela 4- Amostras: fragmentos do coração e TGI avaliados simultaneamente pela PCR em tempo real; **Cópias:** número de cópias obtidas pela PCR em tempo real; **Forma Clínica:** nas duas primeiras linhas, forma cardiodigestiva, demonstrando uma pequena diferença entre o número de cópias. Nas demais linhas, forma cardíaca, onde predomina maior número de cópias no coração.

Gráfico 4- Comparação entre o número de cópias

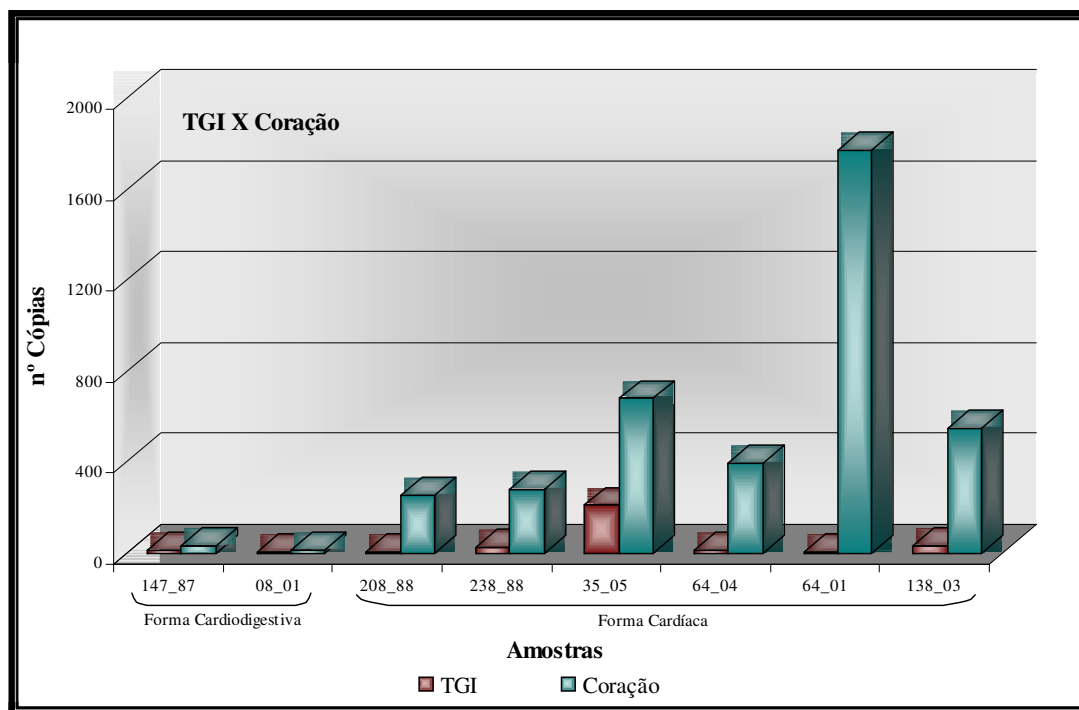


Gráfico 4- Comparação entre número de cópias encontrados no coração e TGI, nas formas cardíaca e cardiodigestiva, demonstrando maior número de cópias no coração na forma cardíaca.

6- DISCUSSÃO

Vários estudos têm sido realizados no intuito de esclarecer aspectos sobre a patogênese da doença de Chagas. A importância da atual pesquisa é confirmar que o parasito está presente nos tecidos envolvidos, detectado indiretamente através da amplificação do seu DNA. Ainda mais relevante, seria a abertura de caminhos para outros testes moleculares no que diz respeito a genotipagem, pois se organismo humano funcionaria como um filtro na seleção de clones, aquele clone que encontraríamos no coração e TGI desses pacientes poderia estar relacionado à forma clínica da doença (Vago *et al.*, 1996).

Destaca-se então, a aplicação da extração de DNA de tecido emblocado em parafina. Sabe-se que a extração de DNA nesse tipo de material representa certa dificuldade, pois geralmente a fixação do tecido é feita em formol a 10%, que representa um método prático e eficiente para ser utilizado em anatomia patológica, porém, este tipo de extração resulta no enovelamento das proteínas nucleares, na formação de ligações entre proteínas e DNA, assim como na fragmentação do DNA, não sendo, portanto, uma metodologia fácil de ser realizada (Mesquita *et al.*, 2001).

Durante a padronização da extração de tecido emblocado, a principal dificuldade foi o pré-tratamento (desparafinização e hidratação) do material. Com revisão bibliográfica (Nascimento *et al.*, 2003, Mesquita *et al.*, 2001) e vários testes, este problema foi sanado. No entanto, a amplificação do nosso controle interno (β -globina) não foi favorável em todas as amostras, sendo necessárias várias extrações. A partir dessa experiência com extração em tecidos, observou-se a importância da desparafinização das amostras com aquecimento e xilol, pois a parafina pode inibir a reação de amplificação. Também ressaltamos a hidratação do material com vários banhos de etanol e água destilada para toda a retirada do xilol, pois este inativa a proteinase K, utilizada na etapa seguinte para a digestão das proteínas. Na etapa de digestão, deixamos o tecido sendo lisado por aproximadamente 72 h, confirmando o protocolo discutido por Mesquita e colaboradores (2001), onde a digestão com proteinase K em baixa concentração e por longo período de tempo (3 a 5 dias) determinam uma qualidade/quantidade final de DNA melhor do que com digestão com proteinase K por curto período de tempo. James e colaboradores (2002) detalham as dificuldades da amplificação em tecidos fixados, como a baixa qualidade e

concentração do DNA; a presença de inibidores da PCR pelas soluções de fixação (Chang *et al.*, 1994).

Durante o procedimento com o *kit* de extração, há uma fase, após a digestão com proteinase k, onde as amostras são levadas ao aquecimento por cerca de 70°C, para inativação da referida enzima, pois é sabido que esta também interfere na reação de PCR. Testamos, em algumas amostras, a extração pelo método fenol-clorofórmio (Kadereit *et al.*, 1992) após a desparafinização e digestão das proteínas, onde o resultado obtido foi razoável, mas devido às muitas lavagens, provavelmente, perde-se parte do DNA, já em tão pouca quantidade em tecidos emblocados. Portanto, a utilização do *kit* resulta em melhor rendimento e qualidade do DNA.

No início do projeto, testamos vários protocolos de extração rápida de DNA (Coates *et al.*, 1991, Pardini *et al.*, 1997), não obtendo resultados satisfatórios.

Quanto à amplificação do DNA do *T. cruzi*, utilizando-se iniciadores referentes à DNA satélite, conseguimos ótimos resultados (figura 1). Das 23 necrópsias testadas, todas apresentaram ao menos uma PCR dupla positiva, em tecido do coração ou do trato gastro-intestinal (tabela 1).

De acordo com a literatura, parasitos raramente têm sido encontrados em tecidos examinados por técnicas rotineiras de coloração. No entanto, a utilização de ferramentas da Biologia Molecular, altamente sensíveis, como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), tem revelado a presença do *T. cruzi* em tecidos envolvidos, mas raramente em órgãos saudáveis dos pacientes chagásicos crônicos (Vago *et al.*, 2000, Ochs *et al.*, 1996). Lages-Silva e colaboradores (2001) ao analisarem através da PCR e cultura de sangue, tecidos do esôfago e sangue de pacientes chagásicos crônicos com megaesôfago, encontraram 98% de positividade, dando a devida importância do parasito no processo patológico do hospedeiro. Nesse mesmo trabalho, utilizando-se da PCR e PAP, detectaram o *T. cruzi* em 76,9% dos tecidos de megaesôfago analisados. Em nossa pesquisa, esse índice foi de 87,5% ao analisarmos pela PCR dupla, os fragmentos do TGI, o que confirma a presença do *T. cruzi* em tais órgãos.

Através da PCR dupla para a região nuclear (DNA satélite) e kDNA, conseguimos evidenciar a presença do patógeno nos tecidos infectados dos pacientes chagásicos necropsiados, que pode estar relacionada à evolução da cardiopatia e/ou colonopatia chagásica. Segundo revisão feita por Tarleton (2003), os autores que defendem a autoimunidade na doença de Chagas, admitem que a persistência do parasito é um pré-requisito para a doença, comprovados pela detecção do DNA do parasito, detecção de proteínas e até mesmo de parasitos intactos nos tecidos afetados. Além disso, estudos realizados indicam que a detecção do DNA diretamente nos tecidos afetados ocorre devido à persistência do próprio parasito em tais tecidos (Cummings & Tarleton, 2003). No entanto, a controvérsia existente entre o papel do parasito e a autoimunidade ainda está pendente (Kierszenbaum, 2005). Segundo Zhang e Tarleton (1999), a persistência do parasito em modelos experimentais demonstraram absoluta correlação com a gravidade da doença. Em modelos experimentais, a *clearance* de parasitos em tecidos resulta no desaparecimento da inflamação e resolução da doença, no entanto, os autores não excluem completamente a autoimunidade no desenvolvimento da doença de Chagas.

A falha na detecção de parasitos pelas técnicas rotineiras de coloração, em tecidos afetados pelo *T. cruzi* fortalece de certa forma, a teoria da autoimunidade na doença de Chagas. Tais análises histopatológicas geralmente buscam parasitos intactos e em grande número (Zhang & Tarleton, 1999). A PCR dupla é uma técnica sensível e específica, pois reamplifica um segmento de DNA da região nuclear do *T. cruzi*, já padronizada e seqüenciada (Marcon *et al.*, 2001), o que indica realmente a presença de parasitos intactos e daqueles que estavam dentro das células e que foram destruídas por mecanismos imunes.

Outra inferência importante diante da padronização da extração de DNA em tecidos emblocados, seria a relação entre a forma clínica e o perfil genético do parasito. Nesse trabalho, empregamos o kDNA como fragmento alvo. O kDNA é encontrado no minicírculo (cinetoplasto) do *T. cruzi*, onde apresenta-se de forma repetitiva e abundante (120.000 minicírculos por parasito) além de apresentar variabilidade genética entre seqüências conservadas (Simpson, 1987). Mesmo sendo uma região alvo para genotipar o *T. cruzi*, não deixa de ser importante também para diagnóstico (Junqueira *et al.*, 2005). A importância do seqüenciamento direto é a não necessidade de isolamento e cultura do

parasito, o que poderia levar a uma seleção de clones. Além disso, a cepa que está no sangue retirado para cultura pode não ser a mesma que afeta os órgãos (Vago *et al.*, 1996).

Para conseguirmos seqüenciar os fragmentos do kDNA amplificados do DNA de tecidos, foi necessária a padronização da PCR dupla, para minimizar as bandas inespecíficas. Por ser uma região repetitiva, o aparecimento de produtos inespecíficos é comum, o que dificultava a purificação para o seqüenciamento. Diversas diluições da 1ª PCR foram feitas para a realização da 2ª reação, com o intuito de retirar as bandas inespecíficas. Existem técnicas de extração do produto amplificado diretamente da banda no gel, mas nesse protocolo, perde-se parte do produto amplificado, no entanto, não deixa de ser viável. Mesmo conseguindo bandas limpas e intensas, a análise de seqüenciamento demonstrou grande variabilidade entre as amostras. Variabilidade existente entre as amostras do coração, entre as do TGI, e mesmo dentro de um mesmo paciente, comparando-se TGI e coração, confirmando a teoria policlonal do *T. cruzi*. (Vago *et al.*, 2000) ou a existência das trocas genéticas que possam desempenhar um papel significativo na diversidade genética desse parasito (Machado e Ayala, 2001).

Conseguimos amplificar, através da PCR dupla, o fragmento de 330 pb em todos os casos incluídos no projeto, e a partir do seqüenciamento automatizado das amostras descritas (sense e antisense), confirmando o polimorfismo existente no *T. cruzi* (Junqueira *et al.*, 2005). Na revisão de Devera e colaboradores (2003), é demonstrado que o estudo do *T. cruzi* através de várias ferramentas biológicas e moleculares, e propõe um conceito de “complexo cruzi”, já descrito em 1966 por Coura e colaboradores.

As comparações das amostras seqüenciadas com o *Gen Bank* (Blast N) nem sempre foram similares ao *T. cruzi*. Provavelmente, todas as possíveis combinações entre os clones ainda não foram depositadas nesse banco de dados. Consideramos as seqüências onde houve regiões homólogas com a seqüência do kDNA descrita por Gonzalez (1986) e Telleria e colaboradores (2006). Excluímos do alinhamento as seqüências onde claramente há a amplificação de dois produtos, provavelmente de dois ou mais clones (figura 8).

Vago e colaboradores (2000) testaram LSSP-PCR (Pena & Simpson, 1996) em pacientes chagásicos crônicos com cardiopatia. Cada paciente apresentou um padrão de bandas diferentes, o mesmo ocorrendo entre amostras de DNA extraídos do coração e

esôfago do mesmo paciente, o que demonstra que o parasito é policlonal, onde cada paciente é infectado por cepas multiclonais que afetam os diferentes órgãos. A heterogeneidade entre as seqüências de nucleotídeos que observamos em nosso trabalho confirma esta variabilidade encontrada entre as amostras.

A variabilidade do kDNA entre os dois tecidos – coração e TGI de um mesmo paciente e entre os próprios tecidos já vem sido descrita por outros autores, utilizando a LSSP-PCR (Vago *et al.*, 2000, Andrade, *et al.*, 2002, Lages-Silva *et al.*, 2006) ou RAPD (D'Ávila *et al.*, 2006). Tal variabilidade não permitiu fazermos inferências quanto à forma clínica da doença de Chagas.

A partir dessa heterogeneidade encontrada, podemos discutir que o kDNA não é um bom marcador para definir o perfil genético das cepas do *T. cruzi*. Mesmo analisando as seqüências nucleotídicas, não há parâmetros para comparações entre os produtos seqüenciados e mesmo entre o banco de dados *Gen Bank*. As demais técnicas envolvendo Biologia molecular (LSSP-PCR e RAPD), que resultam em padrões diferenciados de bandas também não permitem comparações com bancos de dados. Em cada minicírculo, há quatro blocos homólogos (Simpson, 1987), sendo os iniciadores desenhados nessas regiões, que corresponde a 27% das seqüências de 330 pares de base. A partir do seqüenciamento, observamos que em cada minicírculo, há seqüências diferenciadas entre os blocos, dessa maneira, devemos considerar a hipervariabilidade entre os diversos minicírculos existentes em cada parasito. A partir dessas considerações, pesquisas futuras serão necessárias para padronizar um marcador que permita diferenciar a diversidade entre os clones do *T. cruzi* diretamente no sangue ou tecidos lesados e correlacioná-los à forma clínica da doença.

Por outro lado, podemos considerar que a variabilidade genética, levando em conta kDNA como fragmento alvo, não tem relação com a forma clínica da doença de Chagas e que realmente o hospedeiro funcionaria como um filtro selecionando clones. Também não devemos deixar de considerar a história da infecção de cada indivíduo afetado, a qual não temos dados. A partir disso, concluiríamos que o organismo humano é o que realmente define a evolução da doença de Chagas (Koeberle, 1957) vem daí a necessidade de estudar a expressão dos genes humanos nos tecidos afetados (Baptista *et al.*, 2006).

Em resumo, a genotipagem do *T. cruzi* através do sequenciamento do kDNA não ofereceu parâmetros para relacionar a forma clínica da doença com o perfil genético encontrado, devido à alta variabilidade da região. Entretanto, corroboram com os trabalhos envolvendo o kDNA realizados através de outras técnicas descritas (Vago *et al.*, 2000, Lages-Silva *et al.*, 2006).

Nesse trabalho, detectamos o DNA do *T. cruzi* nos tecidos infectados através da PCR dupla utilizando dois alvos diferentes. Provavelmente, a resposta imune do hospedeiro seria frente ao parasito que está no local. Provavelmente, a intensidade com que esta resposta ocorre depende de cada paciente, ou seja, da sua resposta imune. Vários estudos têm demonstrado que não há correlação entre intensidade de inflamação e quantidade de parasitos (Palomino *et al.*, 2000, Olivares *et al.*, 1998, Soares *et al.*, 2001). Estes são aspectos que precisam ser esclarecidos.

A quantificação absoluta pela PCR em tempo real está padronizada, sendo reprodutível, e a partir disso, em estudos posteriores poderemos tecer considerações quanto ao número de moléculas (fragmento alvo de DNA) de parasitos e o grau de inflamação dos órgãos infectados.

As dúvidas quanto ao papel do parasitas, que foram encontrados nos tecidos, ainda não foram esclarecidas, mesmo quantificando o DNA nuclear do *T. cruzi* pela PCR em tempo real, técnica inovadora que permite inferir a quantidade de moléculas amplificadas a cada ciclo da reação (Cummings & Tarleton, 2003). Pela análise estatística, não houve uma relação estatisticamente significativa entre o peso do coração e a quantidade de moléculas amplificadas, ou seja, o parasito está afetando o órgão, mas a sua quantidade é variável independente do progresso da doença no órgão. Entretanto, há uma tendência à correlação inversa entre o número de cópias obtidas pela PCR em tempo real e o peso do coração, que poderia ter significado estatístico se o número de casos tivesse sido maior. Certamente, há inúmeros fatores imunológicos do hospedeiro, tempo de infecção, além de antígenos diversos dos parasitos envolvidos na patogênese da tripanosomíase americana.

Apesar disso, ao compararmos a quantidade de cópias encontradas no TGI e coração de um mesmo paciente, nos casos de cardiopatia, observamos claramente que a quantidade de cópias é maior no coração. Nos dois casos com forma cardiodigestiva, o

número de cópias encontrados no coração e TGI são mais próximos (tabela 4), demonstrando que o parasito tem grande influência na progressão da doença.

Devemos considerar que a forma menos comum da doença de Chagas é a cardiodigestiva. A dificuldade em se obter coração e TGI de um mesmo paciente com essa forma da doença no Brasil (Vago *et al.*, 2000) já foi descrita. Além disso, nos deparamos com a baixa concentração de DNA extraído de tecidos fixados.

Iniciada nos anos 90, a partir da detecção do *T. cruzi* por técnicas moleculares, a fase genômica, resgata o papel do parasito na doença de Chagas, bem como a expressão dos seus genes no curso da enfermidade (Macedo *et al.*, 2004). Há necessidade de relacionar o perfil genético do parasito e do hospedeiro na evolução da doença de Chagas, principalmente com o estudo da expressão de genes humanos frente à invasão parasitária nos tecidos afetados (Baptista *et al.*, 2006). Apesar disso, os nossos resultados sugerem que o responsável por toda destruição de células e tecidos é o *T. cruzi*, pois encontramos o DNA do *T. cruzi* em todos os fragmentos do coração e TGI estudados utilizando como fragmentos alvo, o kDNA e DNA satélite (nuclear). Dessa maneira, o parasito estimularia o sistema imune do hospedeiro, que por apresentarem diferenças genéticas reagem de forma mais ou menos agressiva frente a antígenos diferenciados existentes nas populações policlonais do *T. cruzi*.

Na PCR em tempo real, o maior desafio foi padronizar a concentração de DNA a ser utilizada na reação em 2 ng. Sabe-se que as amostras de DNA total extraídas de tecido emblocado, além conter pouca quantidade, aparece muitas vezes fragmentado, degradado e enovelado com proteínas. Esses 2 ng englobam DNA humano e do *T. cruzi*. Tivemos o cuidado de submeter as amostras à amplificação do gene β -actina, no mesmo ciclo de amplificação, conferindo qualidade ao protocolo. Por esse motivo e pelo fato da baixa concentração de DNA, nem todas as amostras foram submetidas à quantificação pela PCR em tempo real. Mesmo utilizando uma quantidade ínfima de DNA, algumas amostras foram excluídas já que o volume de DNA que deveria ser amplificado ultrapassava o volume da reação proposta pelo protocolo. Entretanto, a técnica está padronizada, e caso seja utilizada com DNA total extraído de sangue ou tecido fresco, as dificuldades serão menores.

No presente trabalho, não realizamos comparações entre intensidade inflamatória e número de cópias avaliadas pela PCR em tempo real. Na literatura, alguns experimentos indicam que não existe correlação entre a concentração do antígeno e intensidade inflamatória (Higushi *et al.*, 1993, Brener & Gazzinelli, 1997). Por outro lado, Lages-Silva e colaboradores (2001) verificaram uma correlação entre frequência e intensidade do processo inflamatório na presença do *T. cruzi*, principalmente em casos avançados de megaesôfago. Por isso, não está claro se a cardiopatia chagásica está relacionada à persistência do parasito durante a fase crônica, ou se a alta parasitemia durante a fase aguda é suficiente para desencadear a doença (Brener e Gazzinelli, 1997). Confirmamos também que os tecidos estudados podem apresentar pequenas quantidades de antígenos, como descrito anteriormente por Higushi e colaboradores em 1993.

A quantificação do parasito em tecidos afetados nos permitiu reforçar que o parasito é essencial na evolução da doença de Chagas, conclusão essa evidenciada nos diferentes números de cópias existentes nos corações dos cardiopatas quando comparados com o número de cópias do TGI (tabela 4). Mas, a influência da resposta imune do hospedeiro não deve ser descartada já que comparando o número de cópias entre os corações, estatisticamente não houve correlação entre o peso do coração (que reflete o grau de inflamação) com o número de cópias encontrado.

7- CONCLUSÕES

- O DNA do *T. cruzi* foi detectado pela PCR dupla (kDNA e DNA satélite) tanto no coração quanto no TGI, em pacientes com formas cardíaca, digestiva e cardiodigestiva.
- Padronizamos a PCR em tempo real como método quantitativo do *T. cruzi* em amostras biológicas.
- O seqüenciamento automatizado do kDNA demonstrou que esta região é muito variável entre os diversos tecidos e dentro do próprio órgão afetado, não sendo possível correlacionar o genótipo obtido com a forma clínica da doença.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adad, SJ, Andrade, DCS, Lopes, ER. Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaeosôfago chagásico. Rev Inst Med Trop São Paulo 1991; 33: 443-450.
- Andrade, LO; Machado, CRS; Chiari, E; Pena, SDJ; Macedo, AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. Mol Bioch Parasitol 1999; 100: 163-172.
- Andrade, LO; Machado, Crs; Chiari, E; Pena, SDJ; Macedo, Am. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. Exp Parasitol. 2002; 100: 269-275.
- Añez, N, Carrasco, H, Parada, H, Crisante, G, Rojas, A, Fenmayor, C, Gonzales, N, Percoco, G, Borges, R, Guevara, P, Ramirez, JL. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am. J. Trop. Med. Hyg 1999; 60 (5): 726-732.
- Arens, M. Methods for subtyping and molecular comparison of human viral genomes. Clin. Microbiol. Res 1999;12(4): 612-626.
- Ávila, H. A.; Sigman, D. S.; Cohen, L. M.; Millikan, R. C.; Simpson, L. Polymerase Chain reaction amplification of *T. cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. Mol. Biochem. Parasitol 1991; 48:211-22.
- Baptista, CS, Vêncio, RZN, Abdala, S, Carranza, JC, Westenberger, SJ, Silva, MN, *et al.*. Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. Mol Biochem Parasitol 2006; 150(2):236-248.
- Blanco, A & Montamat, E E Genetic variation among *Trypanosoma cruzi* populations. J Exp Zool 1998; 282:62-70.
- Bosseno, MF, Barnabe, C, Gastelum, EM, Kasten, FL, Ramsey, J, Espinoza, B; Brenière, SF . Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. J Clin Microbiol 2002; 40 (2): 627 -632.
- Brener, Z, Gazzinelli, RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. Int Arch Allergy Immunol 1997; 114:103-110.

Brenière, SF, Bosseno, MF, Telleria, J, Bastrenta, B, Yacsik, N, Noireau, F, Alcazar, JL, Barnabé, C, Wincker, P, Tybayrenc, M. Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. *Exp Parasitol* 1998; 89: 285-295.

Britto, C, Cardoso, MA, Ravel, C, Santoro A, Borges Pereira, J, Coura, JR, Morel, CM, Wincker, P. *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic Chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol* 1995; 81: 462-471.

Campos, RF, Gonçalves, MS, Reis, EAG, Reis, MG, Andrade, SG. Comparative analyses by Polymerase Chain Reaction amplified minicircles of kinetoplast DNA of stable strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe, Bahia, its clones and subclones: possibility of predominance of a principal clone in this area. *Mem Inst Osw Cruz* 1999, 94 (1): 23 –29.

Carneiro M, Chiari E, Goncalves AM, da Silva Pereira AA, Morel CM, Romanha AJ. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop*. 1990 Jan; 47(1):35-45.

Chagas, C. Processos patojenicos da tripanozomiasis americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1916; 8:5-35.

Chang, YT, Loew, GH. Reaction mechanisms of form-aldehyde with endocyclic imino groups of nucleic acid bases. *J Am Chem Soc* 1994; 116:3548-3555.

Coates, PJ, D'Árdenne, AJ, Khan, G; Kangro, HO, Slavin, G. Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections *J Clin Pathol*, 1991; 44:115-118.

Conover, WJ. Practical nonparametric statistics in John Wiley & Sons. Inc Nova Iorque, 1971.

Corrêa-Oliveira, R, Gomes, JAS, Lemos, EM, Cardoso, GM, Reis, DD, Adad, S, *et al.* The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease 1999 Suppl I; 253-255.

Cruz, RE, Macedo, AM, Barnabé, C, Freitas, JM, Chiari, e, Veloso, VM, Carneiro. CM, Bahia, MT, Tafuri, WL, Lana, M. Further genetic characterization of the two *Trypanosoma cruzi* Berenice strains (Be-62 and Be-78) isolated from the first human case of Chagas disease (Chagas, 1909). Acta Trop 2006; 97:239-246.

Cummings, KL, Tarleton, RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. Mol Biochem Parasitol 2003; 129:53-59.

D'Ávila, DA, Gontijo, ED, Lages-Silva, E, Meira, WSF, Chiari, E, Galvão, LMC. Random amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* isolates from chagasic patients with different clinical forms. Parasitol Res 2006; 98:455-461.

D'Ávila, DA, Gontijo, ED, Lages-Silva, E, Meira, WSF, Chiari, E, Galvão, LMC. Random amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* from chagasic patients with different clinical forms. Parasitol Res 2006; 98:455-461.

De Leon. MP, Yanagy, T, Kikushi, M, Um, J, Ayau, O, Matta, V, Paz, M, Juarez, H, Tada, I, Hirayama, K. Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by DNA polymorphism of the cruzipain gene detected by single-stranded DNA conformation polymorphism (SSCP) and direct sequencing. Int J Parasitol 1998; 28: 867-1874.

Degrave, W, Fragoso, SP, Britto, C, Heuverswyn, H., Kidane, GZ, Cardoso, MAB, Mueller, RU, Simpson, L, Morel, CM. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1988; 27: 63 –70.

Degrave, W, Thiemann, O, Gonçalves, AM, Ávila, H, Sturn, N, Simpson, L, Morel, C M. Development of tools for diagnosis and epidemiological studies of Chagas Disease: detection and Strain typing. In Molecular and Immunological Aspects of Parasitism 1991; 15: 177 –185, C.C. Wang Editor.

Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 Jan;98(1):1-12.

Devera, r, Fernandes, O, Coura, JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and the potencial of selecting population after in vitro culturing and mice infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(1):1-12.

Disponível um URL: <http://www.kinetoplastids.com.content/2/1/12>

Dost, CK, Albuquerque, S, Helleben, V, Engels, W, Prado Jr, JC. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strain and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. Parasitol Res 2001; 88:609-616.

Elias, MCQB, Vargas, NS, Zingales, B, Schenkman, S. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem parasitol 2003; 129:1-9.

Fernandes, O, Mangia, RH, Lisboa, CV, Pinho, AP, Morel, AM, Zingales, B, Campbell, DA, Jansen, AM. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. Parasitol 1998; 118:161-166.

Fernandes, O, Santos, SS, Cupolillo, E, Mendonça, B, Derre, R, Junqueira, ACV, Santos, LC, Sturn, NR, Naiff, RD, Barret, TV, Campbell, DA, Coura, JR. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95:97-99.

Fernandes, O, Santos, SS, Junqueira, ACV, Jansen, AM, Cupolillo, E, Campbell, DA, Zingales, B, coura, JR. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-éxon and ribosomal spacers. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; Supl I, 94: 195-197.

Fernandes, O, Souto, RP, Castro, JA, Pereira, JB, Fernandes, NC, Junqueira, ACV, Naiff, RD, Barrett, TV, Degrave, W, Zingales, B, Campbell, DA, Coura, JR. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribossomal RNA sequences. Am J Trop Med Hyg 1998; 58(6):807-811.

Freitas, JM, Augusto-Pinto, L, Pimenta, JR, Bastos-Rodrigues, L, Gonçalves, VF, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog 2006; 2(3):e24.

Freitas, JM, Lages-Silva, E, Crema, E, Pena, SDJ, Macedo, AM. Real –time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol* 2004; 35:411-417.

Guevara, AG, Eras, JW, Recalde, M, Vinueza, L, Cooper, PJ, Ouiassi, A, Guderian, RH. (1997). Severe digestive pathology associated with chronic chagas disease in ecuador: report of two cases. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; 30 (5): 389-392.

Higushi, R, Fockler, C, Dollinger, G, Watson, R. Kinetic PCR analyses: real-time PCR monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 1993 Sep; 11(9):1026-30.

Higushi, ML, De Brito, T, Reis, MM, Barbosa, A, Bellotti, G, Pereira-Barreto, C, Pillegi. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscope and immunohistochemical findings. *Cardiovas Pathol* 2003; 2:101-105.

James MJ, Yabsley MJ, Pung OJ, Grijalva MJ. Amplification of *Trypanosoma cruzi*-specific DNA sequences in formalin-fixed raccoon tissues using polymerase chain reaction. *J Parasitol*. 2002 Oct; 88(5):989-93.

Jones, EM, Colley, DJ, Tostes, S, Lopes, ER, Vnencak-Jones, CL, MCurley, TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48:348-357.

Kadereit, S, Michelson, S, Mougenot, B, Thibault, P, Verroust, PJ, Mignon, F, Colimon, R, Ronco, PM. Polymerase chain reaction detection of cytomegalovirus genome in renal biopsies. *Kidney International* 1992; 42:1012-1016.

Kierszenbaum, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *TRENDS in Parasitol* 2005; 21(11):513-516.

Koeberle, F. Chagas disease and Chagas syndrome: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 1968; 6: 63-116.

Koeberle, F. Patogenia da moléstia de Chagas. Estudo dos órgãos musculares ôcos. *Rev. Goiana Med.* 1957; 3: 155-180.

Lages-Silva E, Crema E, Ramirez LE, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. Am J Trop Med Hyg. 2001 Nov; 65(5):435-41.

Lages-Silva, E, Ramírez, LE, Pedrosa, AL, Crema, E, Galvão, LMC, Pena, SDJ, Macedo, AM, Chiari, E. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. J clin Microbiol 2006; Jun; 2167-2171.

Lane, JE, Olivares-Villagomez, D, Vnencak-Jones, CL, Mccurley, TL, Cater, CE. Detection of *Trypanosoma cruzi* with the Polymerase Chain Reaction and in situ hybridization in infected murine cardiac tissue. Am J Trop Med Hyg 1997, 56 (6): 588-595.

Lane, JE, Ribeiro-Rodrigues, R, Olivares-Villagómez, D, Vnencak-Jones, CL, McCurley, T, Carter, CE. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA within murine cardiac tissue sections by in situ polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(3):373-376.

López-Olmoz, V; Pérez-Nasser, N; Piñero, D; Ortega, E; Hernandez, R; Espinoza, B. (1998) Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica 69: 239-254.

Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SD. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. Mol Biochem Parasitol. 1992 Oct;55 (1-2):147-53.

Macedo AM, Pena SDJ. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of CHAGAS Disease. Parasitol Today 1998 Mar;14(3):119-24.

Macedo AM, Vallejo GA, Chiari E, Pena SD. DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. EXS 1993; 67:321-9.

Macedo, AM, Machado, CR, Oliveira, RP, Pena, SDJ. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(1) 1-12.

Macedo, AM, Pimenta, JR, Aguiar, RS, Melo, AIR, Chiari, E; Zingales, B; Pena, SDJ, Oliveira, RP. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2001; 96 (3): 407-413.

Marcon, GEB, Andrade, PD, Albuquerque, DM, Wanderley, JS, Almeida, EA, Guariento, ME, Costa, SCB. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. Diag Microbiol Infect Dis 2002; 43: 39-43.

Martinez-Diaz, RA, Escario JÁ, Nogal-Ruiz JJ, Gomez-Barrio A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(1):53-9.

Mesquita, RA, Anzai, EK, Oliveira, RN, Nunes, FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para a amplificação de DNA genômico pela técnica de PCR. *Pesqui Odontol Bras* 2001; 15(4): 314-319.

Miles, MA, Toyé, PJ, Oswald, SC, Godfrey, DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans R soc Trop med Hyg 1977; 71:217-225.

Morel CM, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 6810-6814.

Moser, DR, Kirchhoff, LV , Donelson, JE. Detection of *T. cruzi* by DNA amplification using the Polimerase Chain Reaction. J Clin. Microbiol 1989, 27 (7): 1477 – 1482.

Murta SMF & Romanha, AJ Charaterization of *Trypanosoma cruzi* .1999; Suppl. I:177-180
www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas.

Nascimento, EM, Spinelli, MO, Rodrigues, CJ, Bozzini, N. Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. J Bras Patol Med Lab 2003; 39 (3): 253-255.

Nitz, N, Gomes, C, Rosa, AC, D'Souza-Ault, MR, Moreno, F, Lauria-Pires, L, Nascimento, RJ, Teixeira, RL. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease. Cell 2004; 118:175-186.

Ochs, DE, Hnilica, VC, Moser, DR, Smith, JH, Kirchhoff, LV. Postmortem diagnosis of autochthonous acute chagasic myocarditis by Polymerase Chain Reaction amplification of a species-specific DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg 1996; 54 (5), 526-529.

Oliveira, RP, Broude, NE, Macedo, AM, Cantor, CR, Smith, CL, Pena, SDJ. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proc Natl Acad Sci USA 1998; Parasitol today 13:196-200.

Pardini, MIMC, Carvalho, JAB, Gushiken, T, Machado, PEA. Extração de DNA de tecido emblocado em parafina para utilização em PCR. JBM 1997; 72(4): 43-46.

Pena, SDJ & Simpson, AJG. LSSP-PCR multiplex mutation detection using sequence specific gene signatures. In: Laboratory protocols for mutation detection 1996. Ed Sandergreen Oxford.

Pérez-Brandán, C, Padilla, AM, Diosque, P, Basombrio, A. *Trypanosoma cruzi*: Infectivity modulation of a clone after passages through different hosts. Exp Parasitol 2006; 144: 89-93.

Pfaffl, MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nuc Acid Res 2001; 29 (900): 2002-2007.

Prata, A. A classificação da infecção chagásica no homem. Rev Soc Bras Med Trop 1990; 14: 392-399.

Pinto Dias, JC. Epidemiology of Chagas disease. In: Wendel, S, Brener, Z, Camargo, ME, Rassi, A. Chagas disease – American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT BRAZIL'92, SÃO PAULO, BRAZIL, 1992.

Requena, JM, Jimenez-Ruiz, A, Soto, M, Lopez, MC, Alonso, C. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. Mol Biochem Parasitol 1992; 51: 271-280.

Russomando, G, Figueiredo, A, Almiron, M, Sakamoto, M, Morita, K. Polymerase chain reaction-based detection of *T. cruzi* DNA in serum. J Clin Microbiol 1992; 30: 2864-2868.

Saiki, RK, Scharf, S, Faloona, F, Mullis, KB, Horn, GT, Erlich, HA, Arnheim, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230: 1350-1354.

Satellite Meeting 1999. Recommendations a satellite meeting. Mem Inst Osw Cruz 94: 287-310.

Simpson, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. Ann Rev Microbiol 1987; 41:363-382.

Soares, MBP & Ribeiro Dos Santos, R . Immunopathology of cardiomyopathy in the experiemntal Chagas disease. Mem Inst Osw Cruz 1999; 94, Suppl I: 257-262.

Souto, RP & Zingales, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. Mol Biochem Parasitol 1993 Nov; 62(1):45-52.

Souto, RP, Fernandes, O, Macedo, AM, Cambell, DA, Zingales, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1996; 83:141-152.

Stolf, SB, Souto, RP, Pedroso, A, Zingales, B. Two types of ribossomal genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. Mol biochem Parasitol 2003; 126:73-80.

Sturn, NR, Degrave, W, Morel, C, Simpson, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. Mol Bioch Parasitol 1989; 33: 205-214.

Tanowits, HB, Kirchhoff, LV, Simon, D, Morriz, SA, Wiss, LM, Wittner, M. Chagas' Disease. Clin Microbiol Rev 1992; 5 (4): 400-419.

Tarleton, RL . Parasite persistense in the aetiology of Chagas disease. Int J Parasitol, 2001; 31 (5-6): 550-554.

Tarleton, RL. Chagas disease: a role for autoimmunity? TRENDS in Parasitol 2003, 19(10): 447-451.

- Telleria J, Lafay, B, Barnabe, C, Tibayrenc, M, Syoboda, M. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp Parasitol* 2006;114(4):279-88
- Tibayrenc, M & Ayala, F. Isoenzyme variability of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetic, taxonomic and epidemiological significance. *Evolution* 1988; 42:277-292.
- Tibayrenc, M, Neubauer, K, Barnabé, C, Guerrini, F. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1335-1339.
- Tibayrenc, M, Ward, P, Moya, A, Ayala, FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:115-119.
- Tibayrenc, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biology and disease* 2003; 2:12, 1-6.
- Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvão LMC, Reis DA, Pereira MES, Simpson AJG, Tostes S, Pena SDJ. kDNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol* 1996;149: 2153-2159.
- Vago, A.R, Macedo, AM, Adad, SJ, Reis, DA, Corrêa Oliveira, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas disease. *Lancet* 1996, 348: 891 - 892.
- Vago, AR, Andrade, LO, Leite, AA, Reis, DA, Macedo, AM, Adad, SJ, Tostes Jr, S, Moreira, MCV, Brasileiro Filho, G, Pena SDJ. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. *Am J Pathol* 2000; 156 (5): 1805-1809.
- Vasquez. MP, Beldjord, C, Lorenzi, H, Bienvenu, T, Levin MJ. Detection of polymorphism in the *Trypanosoma cruzi* TcP2 β gene family by single strand conformational analyses (SSCP). *Gene* 1996; 180 :43-48.

Veloso, VM, Romanha, AJ, Lana, M, Murta, SMF, Carneiro, CM, Alves, CF, Borges, EC, Tafuri, WL, Machado-Coelho, GLL, Chiari, E, Bahia, MT. Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. *Parasitol Res* 2005; 96: 382-389.

Wanderley, DMV & Correa, FMA. Epidemiology of Chagas heart disease. *São Paulo Med Journal* 1995; 113 (2):742 – 749.

Zambrano-Villa, S, Rosales-Borjas, D, Carrero, JC, Ortiz-Ortiz, L. How protozoan parasites evade the immune response. *TRENDS in Parasitology* 2002;18(6): 272-278.

Zhang, L; Tarleton, RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas disease. *J Infect Dis* 1999; 180:480-486.

Zhang, Q, Tibayrenc, M, Ayala, FJ. Linkage disequilibrium in natural populations of *Trypanosoma cruzi* (Flagellate), the agent of Chagas disease. *J Parasitol* 1988; 35:81-85.

Zingales, B, Souto, RP, Mangia, RH, *et al.* Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol* 1998; 28:105-112.

Zingales, B; Stolf, BS; Souto, RP; Fernandes, O; Briones, MRS. Epidemiology, Biochemistry and Evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages Based on Ribosomal RNA Sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1999; 94, Supl 1: 159-64.

Referências pesquisadas na Internet – programas ou documentos eletrônicos:

Organização Mundial da saúde - OMS, 2005, acesso em 13/07/07:
<http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr17/chagas.pdf>

Centers for disease Control and Prevention - CDC, 2007, acesso em 13/07/07:
http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/chagasdisease/epidemiology_chagas_disease.htm

Fotomicrografia do *Trypanosoma cruzi*:

<http://professor-edmo.tripod.com/id19.html>

Programa para visualização de seqüências nucleotídicas: *Chromas*:

www.technelysium.com.au/chromas.html

Programa para alinhamento de seqüências nucleotídicas: *Blast 2 sequences*:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>