

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

*Fabiana Caroline Zempulski Volpato*



**Diagnóstico parasitológico e molecular da doença de Chagas humana e tipagem do *Trypanosoma cruzi* recém-isolado de pacientes portadores de diferentes formas clínicas**

Belo Horizonte, MG  
Maio/2013

**Fabiana Caroline Zempulski Volpato**

**Diagnóstico parasitológico e molecular da doença de Chagas humana e tipagem do *Trypanosoma cruzi* recém-isolado de pacientes portadores de diferentes formas clínicas**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

**Orientador:** Prof. Dr. Egler Chiari  
Professor Titular e Emérito  
Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG

**Coorientadora:** Profa. Dra. Lúcia Maria da Cunha Galvão  
Pesquisador Visitante/CNPq  
Programas de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Ciências Farmacêuticas, UFRN

Belo Horizonte, MG  
Maio/2013

043

Volpato, Fabiana Caroline Zempulski.

Diagnóstico parasitológico e molecular da doença de Chagas humana e tipagem do trypanosoma cruzi recém-isolado de pacientes portadores de diferentes formas clínicas [manuscrito] / Fabiana Caroline Zempulski Volpato. - 2013.

89 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Egler Chiari. Co-orientadora: Lúcia Maria da Cunha Galvão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Tripanossoma cruzi - Teses. 2. Chagas, Doença de - Teses. 3. Hemocultura. 4. Reação em cadeia de polimerase - Teses. 5. Diversidade genética. 6. Parasitologia - Teses. I. Chiari, Egler. II. Galvão, Lúcia Maria da Cunha. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

## Instituições envolvidas



Dissertação de Mestrado desenvolvida no “Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas” do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, Av. Antonio Carlos, 6627, Sala 179 Bloco L4, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG CEP 31270-901  
Fone: 31 3409-2847 Fax: 31 3409-2970



Faculdade de Medicina da UFMG  
Departamento de Clínica Médica e Centro de Pós-Graduação  
Av. Prof. Alfredo Balena, 190 Salas 246 e 503  
Belo Horizonte, MG CEP 30130-100  
Fones: 31 3409-9746 3409-9641 Fax: 31 3409-9640

## Colaboradores

Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha  
Professor Titular  
Departamento de Clínica Médica-Infectologia  
Faculdade de Medicina/UFMG

MSc. Giovane Rodrigo de Sousa  
Programa de Pós- Graduação em Medicina Tropical  
Faculdade de Medicina/UFMG

## Apoio financeiro



Edital MCT/CNPq N°14/2010-Universal  
CNPq (Bolsa de Mestrado)



CAPES Bolsa de Mestrado

*“Só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos”.*  
*Antoine de Saint-Exupéry*

Dedico esta dissertação com muito amor a *Anna Martincoski Zempulski*, “vó Anna” (*in memoriam*), pela cumplicidade, travessuras, guloseimas, histórias e carinho, com certeza a pessoa que me tornei e todas as minhas conquistas são o reflexo de seus ensinamentos.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. **Egler Chiari** pelo privilégio de ter trabalhado e convivido com o senhor, por todos os ensinamentos científicos, histórias e confiança, por me ajudar a cumprir o objetivo de aprender parasitologia com grandes mestres. A maneira simples de explicar e compartilhar as incríveis experiências com certeza me fez e fará crescer.

À Profa. **Lúcia Maria da Cunha Galvão** pela confiança em mim depositada, por todas as considerações pertinentes durante à minha formação e por todos os ensinamentos, sejam acadêmicos ou para a vida. A experiência compartilhada seja pela internet ou pessoalmente sempre me ajudaram muito.

Ao Prof. **Manoel Otávio da Costa Rocha** pela imprescindível colaboração com este projeto e por me permitir viver a doença de Chagas em contato com os pacientes, as histórias que ouvi com certeza farão de mim uma pessoa melhor.

À **Daniella Alchaar D'Ávila** por toda paciência e disponibilidade cada vez que precisei de auxílio.

À **Marcela Segatto** por sua acessibilidade as inúmeras vezes que pedi ajuda e por toda sua boa vontade, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus pais **Gelson José Volpato** e **Ana Regina Zempulski Volpato** por sempre tornarem possíveis meus sonhos e, acima de tudo, por todo o apoio e incentivo que recebi quando resolvi sair de casa e, por mais difícil que tenha sido suportar a distância de alguma maneira sempre se mostraram presentes.

Ao meu noivo **Anderson Luiz de Carvalho** por acreditar no meu potencial mesmo quando eu duvidei, por todo o incentivo e apoio, sem os quais com certeza eu não teria ido até o fim ou até mesmo não teria começado.

Aos meus primos **Gabriela Silva Zempulski**, **Ariane Silva Zempulski**, **Julia Elisa Volpato da Silva Rigo** e **Rubens Volpato** pelo carinho mesmo a distância e pelo amor que é mútuo.

À **Carina de Paula Pacanaro Oliveira** minha amiga desde a seleção do mestrado, eu agradeço imensamente pelas risadas e pelo seu jeito doce de ver as adversidades da vida.

À minha grande amiga **Arlene Koglin** pelas ótimas risadas e experiências, muito obrigado por ter me escutado tantas vezes, auxiliado em inúmeras situações, vibrado com tantas conquistas e me ajudado a continuar.

À minha turma de mestrado, Turma do Pepino, foi ótimo conviver com todos e de fato cada um de vocês me fez alcançar meu objetivo.

À Profa. **Maria Aparecida Gomes** por ter me ajudado a vir à Belo Horizonte sem ao menos me conhecer pessoalmente, por todo apoio ao longo do mestrado e por gentilmente me deixar usar a estrutura de seu laboratório.

À Profa. **Erika Martins Braga** por se preocupar com seus alunos e por ter sido um exemplo de profissional para mim.

À Profa. **Maria Norma de Melo** por todo carinho e a boa vontade ao disponibilizar a estrutura do laboratório.

À Profa. **Élida Mara Leite Rabelo** por todo o carinho, alegria e bom humor e, claro, por ter me “adotado”.

Ao **Afonso da Costa Viana** pelo ótimo convívio e auxílio sempre que preciso.

Ao **Orlando Carlos Magno** por todo auxílio e ensinamentos, com certeza as culturas não cresceriam tanto sem a sua ajuda.

À **Tatiana Almeida** por todo apoio e conversas divertidas.

À **Sumara** e à **Sibele** por todo carinho, paciência e bom humor cada vez que precisei.

À **Rosálida Estevan Nazar Lopes** por todas as ideias, além da ajuda e palavras de apoio.

À **Soraia de Oliveira Silva** por cada vez que precisei sempre me receber com um sorriso no rosto e bom humor.

Ao **João da Costa Viana** e à **Edna Maria Pires** por todo apoio.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia por terem contribuído na minha formação.

Ao **Giovane**, à **Karine**, ao **Marcos** e a todos do **CTR-DIP/UFMG** pela contribuição e pelo convívio agradável.

Aos pacientes deste estudo, por contribuir na realização deste projeto e por ter me deixado conhecer um pouco mais de suas histórias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, ICB/UFMG.

Ao Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que direta e indiretamente fizeram parte deste trabalho.



## Resumo

Neste trabalho foram avaliados dois métodos de diagnóstico, da doença de Chagas, a hemocultura e a reação em cadeia da polimerase (PCR), além do perfil genético das populações do *Trypanosoma cruzi* recém-isoladas de 91 pacientes chagásicos crônicos, não tratados, com formas clínicas definidas, indeterminada (n=23) e cardíaca (n=68). A positividade total da hemocultura foi de 54,95% e, quando relacionada à forma clínica foram positivos 60,29% dos pacientes com a forma cardíaca e 39,13% dos portadores da forma indeterminada. O *T. cruzi* foi detectado em 70,00% das hemoculturas entre 30-60 dias e 56,00% dos pacientes positivaram um ou dois tubos. A PCR detectou o kDNA do parasito em 98,90% dos pacientes e, em relação a forma clínica a positividade foi 100,00% nos pacientes cardíacos e 95,65% nos portadores da forma indeterminada. A associação dos métodos aumentou a positividade em 43,96%, uma vez que 54,95% dos pacientes foram positivos tanto pela PCR quanto pela hemocultura e 1,09% foram negativos em ambos os métodos. A variabilidade genética foi analisada em 36 isolados do *T. cruzi* procedentes de 29 pacientes chagásicos cardiopatas e sete portadores da forma indeterminada usando os marcadores moleculares: domínio divergente D7 do gene rDNA 24S $\alpha$ , gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (CO II) e região intergênica dos genes de minixon (SL-IRac) e, 97,22% dos isolados do *T. cruzi* foram relacionados ao rDNA 1 e haplogrupo mitocondrial C associados a DTU II. Entretanto, um único isolado de paciente com a forma clínica indeterminada foi associado à DTU III ou DTU V pelo marcador rDNA 24s $\alpha$  e a DTU I por CO II. A análise com o marcador dos genes SL-IRac confirmou que este isolado corresponde a DTU I. Os dados demonstraram que a hemocultura e a PCR foram eficientes com a coleta de apenas uma amostra de sangue e, quando associados aumentam a sensibilidade no diagnóstico da doença de Chagas crônica. A PCR é mais sensível para o diagnóstico, visto que, foi capaz de detectar o kDNA do parasito em pacientes negativos para a hemocultura. O perfil genético dos isolados do *T. cruzi* demonstrou que não foi possível estabelecer associação com as formas clínicas dos pacientes chagásicos.

## Abstract

This study evaluated two diagnostic methods for Chagas disease, such as blood culture and polymerase chain reaction (PCR) as well as genetic profile of *Trypanosoma cruzi* populations freshly isolated from 91 untreated chronic chagasic patients with defined clinical forms, indeterminate (n=23) and cardiac (n=68). Total positivity of blood culture was 54.95%, and 60.29% of cardiac patients and 39.13% of patients with indeterminate clinical form were positive. *T. cruzi* was detected in 70.00% of blood cultures between 30-60 days, and 56.00% of patients had one or two positive tubes. *T. cruzi* kDNA was detected by PCR in 98.90% of patients, in relation to clinical form; the positivity was 100.00% in cardiac patients and 95.65% of patients with indeterminate clinical form. The association between increased positivity in 43.96%, since 54.95% of patients were positive by both PCR and blood culture and 1.09% were negative by both methods. The association of these methods increased positivity in 43.96%, since 54.95% of patients were positive by both PCR and blood culture, and 1.09% were negative by both methods. The genetic variability was analyzed in 36 isolates of *T. cruzi*, 29 chagasic patients with heart disease and seven patients with indeterminate form using molecular markers: divergent domain D7 24S $\alpha$  rDNA gene, mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit II (CO II) and intergenic region of genes miniexon (SL-IRac), and 97.22% of *T. cruzi* isolates were related to rDNA 1 and mitochondrial haplogroup C associated with DTU II. However, an isolate from a patient with indeterminate clinical form was associated to DTU III or V by rDNA 24s $\alpha$  marker and DTU I with CO II. The analysis with SL-IRac confirmed that this isolate corresponds to DTU I. The data demonstrated that blood culture and PCR were efficient with just a blood sample and, when associated increased sensitivity in the diagnosis of chronic Chagas disease. PCR is more sensitive for the diagnosis, since it was able to detect parasite kDNA in blood culture negative patients. The genetic profile of the isolates of *T. cruzi* showed that it was not possible to establish an association with the clinical forms of chagasic patients.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata representativo da amplificação do fragmento de 330pb específico para o *T. cruzi* em amostras de sangue dos pacientes com a forma cardíaca mostrando a amplificação pela PCR do fragmento específico para o *T. cruzi* de 330 pares de bases (pb). Canaletas 1: PM-peso molecular (*Ladder* 100pb) e 2: CN-controle negativo (amostra de indivíduo não chagásico); Canaletas 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 (amostras de DNA extraídas pelo *kit Qiagen*); Canaletas 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 (amostras de DNA extraídas pelo fenol-clorofórmio); Canaleta 23: CP-controle positivo (sangue de paciente chagásico); Canaletas 24 a 29: TcI-VI (amostras controles correspondentes às diferentes DTUs do *T. cruzi*); Canaleta 30: Branco (reagentes sem adição de DNA).....2828

Figura 2 - Gel de poliacrilamida a 6% revelado pela prata representativo da amplificação do fragmento de 330pb específico para o *T. cruzi* em amostras de sangue dos pacientes com a forma indeterminada mostrando a amplificação pela PCR do fragmento específico para o *T. cruzi* de 330 pares de bases (pb).Canaletas 1: PM-peso molecular (*Ladder* 100pb) e 2: CN-controle negativo (amostra de indivíduo não chagásico); Canaletas 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 (amostras de DNA extraídas pelo *kit Qiagen*); Canaletas 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 (amostras de DNA extraídas pelo fenol-clorofórmio); Canaleta 23: CP-controle positivo (sangue de paciente chagásico); Canaletas 24 a 29: TcI-VI (controles correspondentes às diferentes DTUs do *T. cruzi*); Canaleta 30: Branco (reagentes sem adição de DNA). .....28

Figura 3- Gel de poliacrilamida a 6% revelado pela prata representativo da amplificação do gene rDNA 24Sa de isolados do *T. cruzi* procedentes de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Canaleta 1: PM-peso molecular (*Ladder* 25 pares de bases-pb); Canaletas 2 a 7: TcI-VI (amostras controles correspondentes às diferentes DTUs do *T. cruzi*); Canaletas 8 a 29 (DNA das amostras dos pacientes); Canaleta 30: Branco (reagentes sem adição de DNA). .....31

Figura 4 - Gel de poliacrilamida a 6% revelado pela prata representativo da análise dos fragmentos do gene mitocondrial CO II, após a digestão com a enzima Alu I (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism) de amostras do *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos. Canaleta 1: PM-peso molecular (*Ladder* 25 pares de bases-pb); Canaletas 2 a 7: Amostras controles das DTUs do *T. cruzi* (TcI, amplificação dos fragmentos 30, 81 e 264pb, perfil correspondente ao haplogrupo mitocondrial A; TcII, fragmentos de 81 e 212pb referentes ao haplogrupo mitocondrial C; TcIII, TcIV, TcV e TcVI amplificação dos fragmentos 81 e 294pb, correspondentes ao haplogrupo mitocondrial B); Canaletas 8 a 29: (DNA das amostras dos pacientes); Canaleta 30: Branco (reagentes sem adição de DNA). .....32

Figura 5 - Gel de poliacrilamida a 6% revelado pela prata representativo da amplificação do espaçador intergênico dos genes de minixon dos isolados do *T. cruzi* procedentes de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Canaleta 1: PM-peso molecular (*Ladder* 25 pares de bases-pb); Canaletas 2 a 7: TcI-VI (amostras controles correspondentes às diferentes DTUs do *T. cruzi*); Canaletas 8 a 29: (DNA das amostras dos pacientes); Canaleta 30: Branco (reagentes sem adição de DNA).....32

## Lista de Tabelas

Tabela 1- Características e referências dos iniciadores utilizados nas reações da PCR para detecção e caracterização molecular do <i>T. cruzi</i> .....	19
Tabela 2 - Distribuição da positividade da hemocultura em pacientes chagásicos crônicos não tratados, portadores de diferentes formas clínicas da doença de Chagas .....	24
Tabela 3 - Positividade da hemocultura em pacientes na fase crônica da doença de Chagas portadores de diferentes níveis de cardiopatia chagásica crônica .....	24
Tabela 4 - Distribuição da positividade da hemocultura por faixa etária e formas clínicas dos pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas .....	25
Tabela 5 - Positividade dos tubos de hemocultura por paciente chagásico com diferentes formas clínicas.....	26
Tabela 6 - Perfil de positividade da hemocultura em relação ao período examinado em pacientes chagásicos crônicos com diferentes formas clínicas .....	26

## Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Positividade da hemocultura e da PCR em pacientes na fase crônica da doença de Chagas (***) $p < 0,001$ .....	23
Gráfico 2 - Positividade da PCR usando diferentes métodos de extração do DNA (***) $p < 0,001$ .....	27
Gráfico 3 - Associação da positividade da hemocultura e a PCR dos pacientes na fase crônica da doença de Chagas (***) $p < 0,001$ .....	29
Gráfico 4 - Associação da positividade da hemocultura e a PCR dos pacientes com a forma clínica cardíaca da doença de Chagas (***) $p < 0,001$ .....	30
Gráfico 5 - Associação da positividade da hemocultura e a PCR dos pacientes com a forma clínica indeterminada da doença de Chagas (***) $p < 0,001$ .....	30

## Lista de Abreviaturas e Siglas

PCR	Reação em cadeia da polimerase
µg	Micrograma
µL	Microlitro
CCC	Cardiopatia Chagásica Crônica
CN	Controle Negativo
CO II	Gene Mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade II
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CP	Controle Positivo
CTR-DIP	Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DTU	<i>Discret typing units</i>
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HAI	Hemaglutinação Indireta
HCl	Ácido Clorídrico
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
Kb	Kilobase
kDNA	DNA do cinetoplasto
KRT	<i>Krebs-Ringer</i>
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i>
M	Molar
mL	Mililitro
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de Sódio
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
Pb	Pares de base
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Peso Molecular
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
rDNA 24S $\alpha$	Domínio Divergente D7 do Gene 24S $\alpha$ do DNA Ribosomal
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIFI	Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SL-IRac	Região Intergênica dos Genes de Miniexon

## Sumário

1. Introdução .....	1
1.1 Trypanosoma cruzi e aspectos gerais da doença de Chagas.....	1
1.2 O Trypanosoma cruzi e a variabilidade intraespecífica .....	3
1.3 Diagnóstico laboratorial da infecção pelo T. cruzi.....	9
2. Objetivo geral.....	14
2.1 Objetivos específicos.....	14
3. Material e Métodos .....	15
3.1 Seleção dos pacientes chagásicos.....	15
3.2 Diagnóstico parasitológico e molecular do T. cruzi.....	15
3.2.1 Hemocultura.....	15
3.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	16
3.2.2.1 Coleta de sangue e extração do DNA.....	16
3.2.2.2 Condições da PCR.....	17
3.3 Caracterização molecular do T. cruzi.....	17
3.3.1 Cultura do T. cruzi e obtenção de massa úmida.....	17
3.3.2 Preparação do DNA genômico.....	18
3.3.3 PCR do gene 24S $\alpha$ do DNA ribossomal (rRNA) .....	18
3.3.4 PCR do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (CO II) .....	20
3.3.5 Espaçador intergênico dos genes miniexon do T. cruzi (SL-IR).....	20
3.3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	21
3.4 Análise Estatística .....	21
4. Resultados .....	23
4.1 Diagnóstico parasitológico e molecular dos pacientes chagásicos.....	23
4.1.1 Hemocultura.....	23
4.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	27
4.1.3 Associação da positividade da hemocultura e PCR .....	28
4.2 Genotipagem dos isolados do Trypanosoma cruzi.....	31
4.2.1 Amplificação do gene 24S $\alpha$ do DNA ribossomal (RNA).....	31

4.2.2 Amplificação do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (CO II) .....	31
4.2.3 Amplificação do espaçador intergênico dos genes miniexon (SL-IRac) .....	32
5. Discussão.....	33
6. Conclusões .....	41
7. Referências Bibliográficas .....	42
8. Anexos .....	64
8.1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.....	64
8.2 Carta de aprovação do Hospital das Clínicas da UFMG.....	64
8.3 Termo de consentimento livre e esclarecido submetido aos pacientes participantes do estudo....	64
8.4 Protocolo de hemoculturas dos pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca, representando níveis diferentes parasitemia e quadros demonstrando a positividade em relação ao número de tubos e ao período de exame.....	64



# 1 Introdução

## 1.1 *Trypanosoma cruzi* e aspectos gerais da doença de Chagas

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas (CHAGAS, 1909), é uma zoonose de animais silvestres que passou a ser transmitida para humanos como antroponose quando o homem invadiu os ecótopos silvestres. A descoberta da doença foi uma das mais bem sucedidas e completa em toda a história da medicina tropical, já que se partiram da identificação do vetor e do agente etiológico, até a descrição do ciclo biológico completo da doença, aspectos estes determinados por um mesmo pesquisador em um curto espaço de tempo (COURA, 2007). A doença de Chagas endêmica tornou-se estabelecida como uma zoonose nos últimos 200-300 anos quando os triatomíneos colonizaram e se adaptaram ao ambiente domiciliar, embora a transmissão contínua do *Trypanosoma cruzi* possa ocorrer com ou sem o envolvimento de seres humanos (COURA & DIAS, 2009; MONCAYO & SILVEIRA, 2009). Em relação ao ciclo silvestre de transmissão, após as campanhas bem sucedidas dirigidas ao controle do vetor domiciliado, que incluíam o uso de inseticidas em domicílios e a educação em saúde, dados relatam que na América Latina 15 países ainda permanecem endêmicos com aproximadamente oito milhões de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*. No Brasil estima-se que ainda há cerca de dois milhões de infectados (OPAS, 2006; MONCAYO & SILVEIRA, 2009). Esta enfermidade assume grande importância na América Latina e está intimamente relacionado com o desenvolvimento social e econômico. Ainda, o impacto da doença durante a fase crônica é importante devido à elevada morbidade, como demonstrado por dados desses países (WHO, 2002; ZINGALES *et al.*, 2012). Considerando que, cerca de 30% de indivíduos infectados podem desenvolver lesões cardíacas e digestivas severas tais como, arritmia cardíaca, megaesôfago e megacólon a cada ano, o custo estimado para implantação de marca-passo e cirurgia corretiva somaria aproximadamente 750 milhões de dólares/ano, valor que seria suficiente para a construção ou melhoria de mais de 700 mil habitações rurais (MONCAYO & SILVEIRA, 2009).

A interação do *T. cruzi* com o hospedeiro é bastante dinâmica, diversos fatores podem estar envolvidos, aqueles relacionados à patogenia da doença de Chagas, alguns inerentes ao parasito, tais como, polimorfismo, tropismo, constituintes antigênicos, carga parasitária além dos relacionados ao hospedeiro, como constituição genética, idade e sexo (BRENER, 1997). A fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* tem duração variável entre duas e quatro semanas evoluindo para a fase crônica, que persiste por toda a vida do hospedeiro (LARANJA *et al.*, 1956; DIAS, 1984). A fase aguda é geralmente assintomática ou se apresenta como uma

doença controlada febril e é detectada em apenas 1-2% dos indivíduos infectados. Os sintomas podem aparecer em uma a duas semanas após a exposição aos vetores infectados ou até alguns meses após a transfusão de sangue de indivíduos infectados (RASSI Jr *et al.*, 2010; WHO, 2012). Na fase aguda a morte ocorre ocasionalmente em menos de 5 a 10% dos casos sintomáticos devido à miocardite grave ou meningoencefalite ou ambos (TEIXEIRA *et al.*, 2006; RASSI Jr *et al.*, 2010). Aproximadamente 90% dos indivíduos infectados nesta fase resolvem as manifestações da infecção espontaneamente. Cerca de 60% desses indivíduos nunca desenvolverá clinicamente a doença aparente mesmo sem tratamento específico. Esse quadro caracteriza a forma indeterminada da doença crônica com persistente reatividade sorológica anti-*T. cruzi*, hemocultura, xenodiagnóstico e PCR positivos ou não, sem alterações no eletrocardiograma (ECG) e exames radiológicos, e ainda, com a ausência de sinais e sintomas da doença de Chagas. A grande maioria dos pacientes com a forma clínica indeterminada possui entre 20-50 anos de idade e são identificados durante o rastreamento em bancos de sangue ou pela história familiar (ANDRADE, 1985; MACÊDO, 1997; RIBEIRO & ROCHA, 1998; MACÊDO, 1999; TEIXEIRA *et al.*, 2006; COURA, 2007; COURA & BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011). Os demais (30-40%) podem desenvolver, em 10 a 30 anos após a infecção inicial, as formas clínicas da doença denominadas cardíaca, digestiva e/ou cardiodigestiva (DIAS, 1995).

Há uma grande variabilidade regional nas manifestações clínicas e morbidade da doença de Chagas (COURA *et al.*, 1983, 1985), a qual pode ser atribuída, em parte, à eficácia da resposta imune e aos aspectos genéticos dos indivíduos infectados e primariamente à complexidade da estrutura populacional do *T. cruzi* (MILES *et al.*, 1981; TIBAYRENC & AYALA, 1999; CASTLE, 2000). As características biológicas das cepas e clones do *T. cruzi* e, particularmente o seu tropismo tecidual, certamente têm uma importante função como determinantes da doença de Chagas e sua forma clínica (COURA, 2007). Dados da literatura têm demonstrado que a resposta imune do hospedeiro participa no controle da multiplicação do parasito nos tecidos. A passagem do *T. cruzi* pelo hospedeiro vertebrado deve sofrer pressão seletiva do sistema imunológico deste com conseqüente destruição de alguns clones menos resistentes, uma vez que ambas subpopulações de linfócitos TCD4+ e CD8+ exercem um papel ativo no controle da infecção pelo *T. cruzi* (ROTTENBERG *et al.*, 1995). Embora a patogenia da doença de Chagas na fase crônica não esteja completamente elucidada, um consenso crescente indica que a persistência do parasito é necessária para o desenvolvimento da doença (TARLETON & ZHANG, 1999; KIERSZENBAUM, 2007; BONNEY *et al.*, 2008).

## 1.2 O *Trypanosoma cruzi* e a variabilidade intraespecífica

O *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida e caracteriza-se pela presença de uma única estrutura mitocondrial denominada cinetoplasto, que representa 20-25% do total de DNA da célula ou DNA do cinetoplasto (kDNA) (BRENER, 1997; SOUZA, 2009). O kDNA está organizado em uma rede complexa de moléculas circulares concatenadas, denominadas de maxicírculo e minicírculo, composta aproximadamente de 50 cópias de maxicírculos apresentando em torno de 20 kilobases (kb) e 5-10.000 cópias de minicírculos de 1,4kb. Esta organela localiza-se próximo ao núcleo e tem a forma e estrutura organizada de acordo com o desenvolvimento do protozoário (SIMPSON, 1987; SOUZA, 2009). Os maxicírculos possuem cerca de 22.000 pares de bases (pb) de tamanho e o número de cópias por célula que varia de 20-50 e, apresenta estrutura genética e função correspondentes a mitocôndria, codificam o RNA e as subunidades do complexo respiratório e, por essa razão, eles são os equivalentes funcionais do DNA mitocondrial de outros eucariotos (SIMPSON, 1987; JUNQUEIRA *et al.*, 2005; WESTENBERGER *et al.*, 2006; SOUZA, 2009).

A organização do maxicírculo consiste em uma região transcrita contendo genes de rRNA, genes estruturais, de uma região divergente ou variável, contem também, repetidas sequências variadas de função ainda desconhecidas (SIMPSON, 1987). Uma característica importante do genoma dos maxicírculos, além da presença de vários genes, é a falta de alguns elementos-chave para a sua tradução, como códons de iniciação ou janelas abertas de leitura descontínua, o que é resolvido pela adição e/ou remoção de uridinas após a transdução (SIMPSON, 1987; WESTENBERGER *et al.*, 2006). Com a descrição das sequências de DNA de maxicírculos do clone CL Brener e da cepa Esmeraldo foi demonstrado que as regiões codificantes nestas duas cepas apresentam pouca ou nenhuma variação de nucleotídeos, apesar de, apresentarem algumas inserções e/ou deleções cepa-específica, indicando que o maxicírculo pode ser um ótimo marcador para diferenciar as DTUs do *T. cruzi*. A região de codificação de ambos os maxicírculos sequenciados mostra conservação de genes da ordem Kinetoplastida, com padrões semelhantes dentro do gênero *Trypanosoma* spp. (WESTENBERGER *et al.*, 2006). A análise do genoma mitocondrial de seis amostras do *T. cruzi* demonstrou um aumento da expressão do gene NADH desidrogenase subunidade 7 (ND7) nos isolados obtidos de pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas. Esta diferença foi detectada pela alteração essencial de ND7 e, a deleção foi associada à DTU II. Este e outros genes dessa via constituem alvos para ensaios de PCR no diagnóstico diferencial da cepa infectante, mas requer ainda validação em isolados recentes do parasito, de pacientes com diferentes manifestações clínicas. A identificação de marcadores moleculares representa

um avanço na associação entre a genética do parasito e a patogenia da doença (BAPTISTA *et al.*, 2006).

Os minicírculos do *T. cruzi* representam 95% do DNA total do cinetoplasto (SIMPSON & SILVA, 1971) e cada molécula do minicírculo está organizada em quatro regiões distintas, de sequências extremamente variáveis e, podem ser diversificados entre os isolados do parasito (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Estas sequências são intercaladas por quatro regiões de 120-160pb de sequências bastante conservadas, que correspondem a aproximadamente 10% do comprimento do minicírculo e, dispostas em ângulo de 90° uma em relação à outra (SIMPSON, 1987; DEGRAVE *et al.*, 1988). Esta molécula possui uma alta organização, com sequências não aleatórias e conservadas, sugerindo um papel funcional. Ainda, cada molécula contém a origem de replicação do DNA e estas são conservadas entre diferentes cepas do *T. cruzi*, onde, apenas duas dessas sequências possuem a duplicação de uma molécula ancestral (SIMPSON, 1987). A região variável (280-230pb) dos minicírculos está envolvida na formação de pequenos RNAs guias que controlam a especificidade do processo de edição (adição ou deleção de uridinas) do RNA mensageiro formado a partir dos maxicírculos (DEGRAVE *et al.*, 1988; STUART & FEAGIN, 1992; JUNQUEIRA *et al.*, 2005; WESTENBERGER *et al.*, 2006). Os minicírculos são bastante variáveis entre as diferentes populações de *T. cruzi* e evoluem rapidamente permitindo a diferenciação de cepas evolutivamente muito próximas (JUNQUEIRA *et al.*, 2005). Devido ao seu elevado número de cópias, os minicírculos do kDNA do *T. cruzi* têm sido utilizados como alvos preferenciais para o diagnóstico do parasito em indivíduos infectados, pois, esta estrutura pode representar um único marcador molecular comum as populações do *T. cruzi* (ÁVILA *et al.*, 1991; GOMES *et al.*, 1988; LAGES-SILVA *et al.*, 2001; MEIRA *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2002; JUNQUEIRA *et al.*, 2005).

O *T. cruzi* é um táxon heterogêneo constituído por um conjunto de populações que circulam na natureza entre diversos hospedeiros vertebrados e invertebrados silvestres e domésticos (MOREL *et al.*, 1986; ZINGALES *et al.*, 1998). A heterogeneidade das populações do *T. cruzi* tem sido demonstrada por diferentes marcadores que avaliam suas características biológicas, bioquímicas e genotípicas em amostras do *T. cruzi* isoladas de diferentes hospedeiros, áreas geográficas e, associadas à complexidade ecoepidemiológica (MILES *et al.*, 1977; MELO & BRENER, 1978; MOREL *et al.*, 1980; ANDRADE, 1985; STURM *et al.*, 1989; CARNEIRO *et al.*, 1990, 1991; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997; MACEDO & PENA, 1998; CAMPBELL *et al.*, 2004, MILES *et al.*, 2009). A utilização desses marcadores para avaliar a heterogeneidade das populações do *T. cruzi* podem ajudar a

esclarecer a distribuição geográfica destas e, também, as diferenças nas manifestações clínicas dos pacientes chagásicos crônicos, a morbidade e a mortalidade dessa doença (MACEDO *et al.*, 2004; MANOEL-CAETANO & SILVA, 2007).

O *T. cruzi* pode apresentar populações multiclonais complexas diferindo em suas características biológicas, morfológicas e o seu comportamento no hospedeiro vertebrado como já relatadas (CHAGAS, 1909; BRENER & CHIARI, 1963). Em relação às características biológicas, as cepas do *T. cruzi* podem ser agrupadas em biodemas (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997; DEVERA *et al.*, 2002) ou então, dependendo de sua localização preferencial por determinados tecidos ou órgãos, em reticulotrópicas ou macrofagotrópicas e miotrópicas (MELLO & BRENER, 1978).

A variabilidade bioquímica das populações do *T. cruzi* tem sido avaliada usando eletroforese de isoenzimas, ou análise de zimodemas. Esse agrupamento permite diferenciar as cepas isoladas tanto de humanos quanto de animais domésticos e silvestres, além das populações encontradas nos vetores. Os isolados do *T. cruzi* foram classificados de acordo com as suas diferenças e semelhanças por meio de diversos perfis eletroforéticos em três zimodemas: Z1, Z2 e Z3 (MILES *et al.*, 1977) e, posteriormente em quatro: ZA, ZB, ZC e ZD (ROMANHA, 1982). A análise desses zimodemas mostrou que Z2 e ZA são equivalentes e, no Brasil, são encontrados seis zimodemas principais correspondentes ao Z1, Z2 (ou ZA), Z3, ZB, ZC e ZD. Destes, o que está associado ao ciclo doméstico é Z2 e, Z1 e Z3 seriam encontrados principalmente no ciclo silvestre (BARRET *et al.*, 1980; MILES *et al.*, 1980). No entanto, com o aumento do número de marcadores enzimáticos para análise, é possível detectar elevada heterogeneidade entre as cepas (TIBAYRENC *et al.*, 1986). Utilizando 15 marcadores enzimáticos e 121 cepas do *T. cruzi* procedentes de diversos países, estes autores distinguiram 43 zimodemas ou *clonets* e, em 16 desses, a diferença foi encontrada em apenas um alelo, sendo assim, estes marcadores permitiram estabelecer importantes parâmetros sobre a estrutura genética das populações do *T. cruzi*. A análise molecular do *T. cruzi* permitiu, ainda, caracterizá-los em esquizodemas, relacionados ao polimorfismo de tamanhos dos fragmentos de restrição do kDNA (RFLP) que demonstraram a variabilidade do kDNA do parasito gerando perfis de bandas cepa-específica, indicando diferentes graus de variabilidade intraespecífica nas sequências dos minicírculos do kDNA. Entre os padrões de RFLP foi detectada uma elevada heterogeneidade das cepas do *T. cruzi* e, pela primeira vez foi relatada essa heterogeneidade na cepa CL, determinando um número de esquizodemas superior ao de zimodemas previamente estabelecidos, isto indica que diferentes esquizodemas podem estar presentes dentro de um mesmo zimodema (MOREL *et al.*, 1980). Esta técnica foi

posteriormente utilizada também para diferenciar populações mistas naturais ou artificiais do *T. cruzi* (DEANE *et al.*, 1984) pois, os perfis de restrição do kDNA têm se mostrado estáveis e conservados durante algumas passagens em meios de cultivo (MOREL *et al.*, 1980).

Várias técnicas bioquímicas e moleculares têm demonstrado uma grande diversidade genética das populações do parasito, e permitiram a classificação das cepas do *T. cruzi* inicialmente em duas linhagens principais *T. cruzi* I e II (ANONYMOUS, 1999). No entanto, algumas cepas do parasito não puderam ser classificadas dentro dessas linhagens, entre estas, estão aquelas correspondentes ao zimodema 3 (Z3) e as cepas caracterizadas como grupo ½ e rDNA 2 (SOUTO & ZINGALES, 1993; SOUTO *et al.*, 1996; STOLF *et al.*, 2003). Com ênfase na relevância dos conceitos e métodos de evolução genética ao estudar a epidemiologia de protozoários, Tibayrenc (1998) propôs o termo “unidades discretas de tipagem” (DTUs- *Discret typing units*). Tanto as características genéticas das populações quanto análises filogenéticas puderam contribuir para determinação das DTUs, que foram definidas como conjuntos de amostras geneticamente mais relacionadas entre si do que qualquer outra amostra e, que são identificáveis por meio de marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos. Com isso, as populações do *T. cruzi* foram agrupadas em DTUs e, embora, um conjunto de marcadores genéticos possa classificá-las em uma mesma DTU, estas cepas podem não ser totalmente equivalentes. Brisse *et al.* (2000) caracterizaram geográfica e ecologicamente diversas cepas do *T. cruzi* representativas, que apresentavam diversidade clonal em cada uma das duas linhagens principais. Para esta caracterização eles utilizaram os marcadores RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*) e MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) e evidenciaram a existência dessas duas linhagens principais, mas também, revelaram que *T. cruzi* II apresentava cinco grupos filogenéticos, fortemente delineados. A fim de facilitar a comunicação sobre a diversidade filogenética do parasito, esses autores propuseram a subdivisão da linhagem 2 em cinco subgrupos distintos com características geográficas e ecológicas bem definidas, renomeando-a em DTU IIa, IIb, IIc, IId e IIe (BRISSE *et al.*, 2001).

No estudo da variabilidade genética das populações do *T. cruzi* a utilização de marcadores evolutivamente mais conservados podem ajudar a elucidar algumas questões (CHIARI *et al.*, 2005). Um dos marcadores empregados na caracterização molecular de isolados é a sequência do gene do RNA ribossomal (rRNA) do *T. cruzi*. Ao comparar a sequência deste gene do parasito com o de outros tripanosomatídeos foi possível perceber uma homologia elevada entre eles, contudo, houve uma exceção no produto de amplificação em uma região de aproximadamente 100pb na extremidade 3' do gene. Esse domínio

divergente do gene do rRNA mostrou um polimorfismo em três diferentes grupos do *T. cruzi*, gerando fragmentos de 110pb, 125pb e um terceiro de 110/125pb (SOUTO & ZINGALES, 1993; SOUTO *et al.*, 1996). A PCR do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (CO II) foi desenvolvida para caracterizar o genoma mitocondrial das populações do *T. cruzi*. Este marcador tem sido bastante utilizado na diferenciação das populações do parasito, devido a amplificação da extremidade 3' da região COII e, digerida por uma enzima de restrição revelou três haplogrupos mitocondriais o A, B e C com produtos de amplificação divergentes entre eles (FREITAS *et al.*, 2006).

Os minixons fazem parte do genoma nuclear dos Kinetoplastida e são constituídos por três regiões, uma que é altamente conservada correspondente aos exons (39pb), outra denominada de introns (73pb) e uma terceira região intergênica muito divergente. Desse modo, uma PCR *multiplex* foi desenvolvida usando três iniciadores para a amplificação do espaçador não transcrito desse gene em diferentes cepas do *T. cruzi*. Os isolados analisados apresentaram um dimorfismo nesta terceira região, o que permitiu agrupar populações do parasito em dois grupos, os que amplificaram um fragmento de 300pb (grupo 1) e aqueles com 350pb (grupo 2) (SOUTO *et al.*, 1996).

A diversidade do genoma do *T. cruzi* e, também a grande variabilidade de genótipos e fenótipos são bem reconhecidos (ANDRADE *et al.*, 1974; MILES *et al.*, 1977; ROMANHA *et al.*, 1979; MOREL *et al.*, 1980; SOUTO *et al.*, 1996; TIBAYRENC *et al.*, 1998; TIBAYRENC & AYALA 1999). Esses dados permitiram realizar uma nova revisão na nomenclatura das cepas do parasito, com o objetivo de facilitar a comunicação entre os pesquisadores que trabalham na área e, fornecer subsídios para suas características ecoepidemiológicas, patogenicidade e questões da biologia básica. Desta forma, as cepas do *T. cruzi* foram classificadas, recentemente, em seis DTUs, TcI-TcVI (ZINGALES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012), embora as questões em relação ao número de DTUs ainda permaneçam em debate (TIBAYRENC, 2003).

A necessidade de mais de dois marcadores genéticos para a tipagem correta de populações do *T. cruzi* tem sido relatada na literatura, visto que cepas do parasito podem ser classificadas erroneamente (D'ÁVILA *et al.*, 2009; CÂMARA *et al.*, 2010). Um exemplo dessa classificação molecular incorreta, ocorreu com o clone CL-Brener, que foi identificado como *T. cruzi* II baseado na amplificação dos genes do rDNA 24S $\alpha$  e minixon com alelos de 125pb e 300pb, respectivamente (SOUTO & ZINGALES, 1993; SOUTO *et al.*, 1996; ZINGALES *et al.*, 1999) entretanto, está claramente demonstrado que é um clone híbrido *T. cruzi* VI (DTU IIe) e, provavelmente derivado de um evento de hibridização entre cepas *T.*

*cruzi* II (DTU I Ib) e *T. cruzi* III (DTU I Ic) (CANO *et al.*, 1995; MACEDO *et al.*, 2004; EL-SAYED *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2006).

O perfil genético de 102 amostras do *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos em momentos diferentes e procedentes de diversas regiões endêmicas dos estados de Minas Gerais e Goiás usando os marcadores moleculares, amplificação do domínio divergente D7 do gene 24S $\alpha$  do DNA ribossomal (rDNA 24S $\alpha$ ); gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (COII) e amplificação da região intergênica dos genes de miniexon; mostrou uma boa correlação entre os marcadores genéticos, visto que, a maior parte dos isolados está associada ao *T. cruzi* II (rDNA do grupo 1 e haplogrupo C na determinação por CO II). Amostras do *T. cruzi* isoladas de dois pacientes assintomáticos amplificaram simultaneamente três fragmentos diferentes para um único *locus* de microssatélite (TcAAAT6) sugerindo a presença de diferentes subpopulações do parasito (policlonalidade) e um elevado poder discriminatório deste *locus* entre os isolados o qual aumenta a capacidade de detectar populações multiclonais. Ainda neste estudo, usando mais de um marcador molecular foi demonstrado o TcIII em isolados de dois pacientes crônicos, um do estado de Goiás e outro de Minas Gerais (D'ÁVILA *et al.*, 2009). Câmara *et al.* (2010) relataram a diversidade genética do *T. cruzi* usando os mesmos marcadores e identificaram uma população naturalmente heterogênea constituída de TcI, TcII e TcIII circulando entre triatomíneos das espécies *T. brasiliensis* e *P. lutzii*, e humanos na mesma área endêmica do estado do Rio Grande do Norte sem colonização domiciliar. Ainda demonstraram que um grande número de isolados correspondentes ao TcI pela amplificação do domínio D7 do gene 24S $\alpha$  do DNA ribossomal (rDNA 24S $\alpha$ ) usando outros marcadores foram confirmados como TcIII, isto reforça a necessidade de dois ou mais marcadores para a caracterização das amostras do parasito.

A maioria dos marcadores moleculares empregados para a genotipagem do *T. cruzi* requer, primeiramente, o isolamento do parasito de amostras de sangue, crescimento e manutenção em meio de cultura acelular e/ou em animais de laboratório, esse processo demanda, em média, um período de um a dois meses. A hipótese para uma aparente ausência na relação entre a forma clínica do hospedeiro vertebrado e as cepas do *T. cruzi*, é que estas podem ser constituídas de uma ou mais subpopulações ou clones, e essas podem apresentar tropismo diferente. Esta ausência poderá estar associada com a seleção de clones específicos presentes na população, ou indução de modificações no seu comportamento fenotípico e genético uma vez que tem sido demonstrada a elevada plasticidade do *T. cruzi* (ROMANHA *et al.*, 1979; DEANE *et al.*, 1984; CARNEIRO *et al.*, 1990; MACEDO & PENA, 1998;



GOMES *et al.*, 1998; PACHECO & BRITO, 1999; ANDRADE *et al.*, 1999; VAGO *et al.*, 2000; CHIARI *et al.*, 2005; LAGES-SILVA *et al.*, 2006; D'ÁVILA *et al.*, 2009). Por outro lado, as populações do *T. cruzi* que estão na circulação periférica no momento da coleta do sangue podem ser diferentes daquelas que realmente causam a lesão do tecido e, possivelmente, as manifestações clínicas. Portanto, a população do parasito isolada de um determinado paciente pode não representar significativamente a real população do hospedeiro vertebrado e não representar também, as subpopulações nos diversos tecidos e/ou no sangue periférico (MACEDO & PENA, 1998; ANDRADE *et al.*, 1999; VAGO *et al.*, 2000; LAGES-SILVA *et al.*, 2006).

A diversidade genética do *T. cruzi* apresenta um forte impacto nas características fenotípicas do parasito, o que dificulta as interpretações e associações entre este e o meio ambiente, vetores, hospedeiros vertebrados e, em consequência o seu reflexo nos aspectos clínicos e epidemiológicos da doença (CHIARI *et al.*, 2005). Um grande desafio é a identificação de marcadores genéticos que permitam estabelecer uma possível associação das DTUs do parasito com a forma clínica da doença. A aplicação desses marcadores em estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos tem contribuído para esclarecer vários aspectos do parasito (CHIARI *et al.*, 2005). Contudo, para garantir a confiabilidade dos achados é necessário utilizar um número mais elevado de marcadores genéticos (TIBAYRENC & AYALA, 1999; D'ÁVILA *et al.*, 2009).

### **1.3 Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. cruzi***

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. cruzi*, deve ser direcionado em função da fase da infecção. Na fase aguda, o exame direto do sangue é o método de escolha, devido ao elevado número de formas tripomastigotas na circulação periférica que permite a identificação direta do parasito no sangue, nesta fase devem ser priorizados os métodos parasitológicos. Enquanto que na suspeita de infecção crônica, o diagnóstico é insatisfatório (ÁVILA *et al.*, 1991), devido à baixa concentração de formas tripomastigotas no sangue dos indivíduos, deve ser primariamente dirigida à pesquisa de anticorpos específicos contra o parasito, com a realização de dois métodos de princípios distintos ou de diferentes preparações antigênicas (WINCKER *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 2002; BRASIL, 2005; WHO, 2012). Na fase crônica da doença de Chagas, além da parasitemia transiente, mais metade dos infectados não apresentam as formas clínicas determinadas como, cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva, sendo diagnosticados por reatividade sorológica (CASTRO *et al.*, 2002). Assim, o diagnóstico pode ser sugerido pelos antecedentes epidemiológicos e, confirmado ou excluído de acordo com os resultados dos métodos laboratoriais que incluem a detecção de anticorpos por reação

imunofluorescência indireta (RIFI), hemaglutinação indireta (HAI) e *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (GOMES *et al.*, 2009). A maior limitação dos métodos sorológicos é a especificidade, porque há reações cruzadas com outros tripanosomatídeos presentes em áreas endêmicas como, *Leishmania* sp e *T. rangeli* (ARAÚJO 1986; ANTAS *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2001; CABALLERO *et al.*, 2007). Outra dificuldade é que, após tratamento específico anti-*T. cruzi*, os métodos sorológicos permanecem positivos por vários anos. A reversão da sorologia após o tratamento é considerada inferior a 10% na fase crônica da doença e prejudica a avaliação da eficácia da terapêutica (KRETTLI *et al.*, 1984; GALVÃO *et al.*, 1993; CANÇADO, 1999; COURA & CASTRO 2002; FLORES-CHAVES *et al.*, 2006; KRETTLI, 2009; GOMES *et al.*, 2009). Os métodos parasitológicos indiretos, como, o xenodiagnóstico (BRUMPT, 1914; CERISOLA *et al.*, 1974; JUNQUEIRA *et al.*, 1996; LUQUETTI & SCHMUNIS, 2010) e a hemocultura dependem da presença de pelo menos um tripomastigota íntegro para o seu crescimento no meio de cultura (CHIARI & BRENER, 1966; MOURÃO & MELLO, 1975; CHIARI & DIAS, 1975; CHIARI *et al.*, 1989). Assim, um resultado negativo pode estar relacionado à baixa parasitemia nessa fase e, não afasta a possibilidade da infecção, mas um exame positivo tem valor diagnóstico absoluto (LUQUETTI *et al.*, 2005; LUQUETTI & SCHMUNIS, 2010). Embora estas técnicas não sejam 100% sensíveis, podem ser afetadas por fatores intrínsecos e extrínsecos, além de depender diretamente do número de tripomastigotas no sangue periférico. A hemocultura é uma importante ferramenta na identificação do *T. cruzi*, especialmente em indivíduos com sorologia inconclusiva e quando positiva é possível isolar o parasito para estudos biológicos, bioquímicos e moleculares (CHIARI & GALVÃO, 1997; CASTRO *et al.*, 2002; CHIARI *et al.*, 2005).

As dificuldades no diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica justificam a busca de métodos mais sensíveis e específicos. Novas ferramentas moleculares têm sido desenvolvidas baseadas na tecnologia do DNA recombinante, entre estas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI *et al.*, 1985; MULLINS & FALOONA, 1987), cujo resultado diferente dos métodos parasitológicos, é obtido em curto período de tempo, enquanto que os da hemocultura ou xenodiagnóstico podem levar até 30 dias e, ainda ser negativo (BRITTO, 2009). A PCR tem apresentado resultados extremamente promissores no diagnóstico de diferentes doenças infecciosas e parasitárias. Várias estratégias de amplificação usando a PCR têm sido empregadas no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*. Uma sequência de 195pb repetida 10<sup>5</sup> vezes no DNA genômico do *T. cruzi* tem sido utilizada como DNA alvo para ser amplificada pela PCR. Esta sequência corresponde cerca de 10% do DNA nuclear do parasito

e permanece conservada entre as cepas do *T. cruzi*, esta região repetitiva no DNA mostra-se um ótimo marcador de espécies e cepas específicas se tratando da classificação e detecção deste parasito (STURM *et al.*, 1989; MOSER *et al.*, 1989; ÁVILA *et al.*, 1990; RUSSOMANDO *et al.*, 1992; WINCKER *et al.*, 1994; BRITTO *et al.*, 1995a; JUNQUEIRA *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1998; BRITTO *et al.*, 1999; SOLARI *et al.*, 2001; LAGES-SILVA *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2002; MEIRA *et al.*, 2002; MARCON *et al.*, 2002; GALVÃO *et al.*, 2003; ZULANTAY *et al.*, 2004; ZULANTAY *et al.*, 2011).

Visando o aprimoramento da PCR para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* foi utilizada a solução de guanidina-EDTA como reagente de lise e preservação do DNA a temperatura ambiente e do complexo cobre-fenantrolina que lineariza e corta o kDNA em fragmentos menores, facilitando a sua distribuição e melhorando a sensibilidade do ensaio (ÁVILA *et al.*, 1991, 1993). Essa linearização pode ser facilitada pelo aquecimento da amostra a 100°C por 15min, uma vez que os oligonucleotídeos se ligam à região conservada do minicírculo do *T. cruzi*, resultando na amplificação da região variável originando um fragmento de 330 pares de bases (BRITTO *et al.*, 1993). Gomes *et al.* (1998) propuseram a padronização no protocolo da PCR e com um volume menor de reação obtiveram uma sensibilidade mais elevada que outros estudos, detectando até 10fg do DNA do *T. cruzi* ou 0,01% de fragmentos do DNA livres na corrente sanguínea. As alterações relatadas por estes autores incluíam uma solução tampão com o pH mais elevado que outros protocolos, bem como, aumento da concentração do KCl, dos iniciadores e das enzima e, uma diminuição na concentração de MgCl<sub>2</sub> além de diferentes passos no ciclo de amplificação e a ausência da solução *hot-start*. A literatura mostra que os resultados da PCR apresentam persistente variabilidade na sensibilidade, que é reforçado pelas diferenças geográficas e regionais devido à baixa e transitória parasitemia na fase crônica da doença de Chagas (ÁVILA *et al.*, 1993; WINCKER *et al.*, 1994; BRITTO *et al.*, 1995a e b; COURA *et al.*, 1996; JUNQUEIRA *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 2002). É bem conhecido que a sensibilidade da técnica é maior quando se aumenta o número de amostras de sangue coletadas de um mesmo paciente (CASTRO *et al.*, 2002). A PCR é uma alternativa para o diagnóstico, devido ao curto período de processamento, por permitir a análise de várias amostras ao mesmo tempo (CHIARAMONTE *et al.*, 1999). Além de, a capacidade de detectar quantidades mínimas do DNA específico, salientando sua importância como ferramenta para avaliar a eficácia do tratamento específico e, também, na detecção do parasito em pacientes imunodeprimidos (GOMES *et al.*, 1999; SCHIJMAN *et al.*, 2000; BRITTO *et al.*, 2001; SOLARI *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2002; LAGES-SILVA *et al.*, 2002; GALVÃO *et al.*, 2003; PORTELA-

LINDOSO & SHIKANAI-YASUDA, 2003; ZULANTAY *et al.*, 2004; MEIRA *et al.*, 2004; FLORES-CHAVEZ *et al.*, 2006; DIEZ *et al.*, 2007; BRITTO, 2009; MURCIA *et al.*, 2010).

Na fase crônica da doença de Chagas, a PCR tem se mostrado uma alternativa para a comprovação do parasito, embora a PCR convencional seja útil para determinar a presença do parasito ela não é viável para uma avaliação quantitativa (CUMMINGS & TARLETON, 2003). Este método tem mostrado bons resultados para a quantificação de *T. cruzi* em amostras de sangue periférico de pacientes infectados (PIRON *et al.*, 2007; DUFFY *et al.*, 2009). Assim, o emprego de técnicas quantitativas ou semiquantitativas na amplificação do DNA do parasito comparada aos testes parasitológicos clássicos é importante para estabelecer o perfil da infecção e o controle da eficácia do tratamento específico (PORTELA-LINDOSO & SHIKANAI-YASUDA, 2003). A utilização da PCR quantitativa é fundamental para determinar a carga parasitária na corrente sanguínea e em tecidos, além de permitir o acompanhamento da evolução da doença, podendo ser eficaz na avaliação pós-tratamento de pacientes chagásicos, em infecções congênicas e na detecção precoce de reativação (BURGOS *et al.*, 2005; PIRON *et al.*, 2007; BRITTO, 2009; MOREIRA *et al.*, 2013).

Os bons resultados na PCR dependem de vários fatores como, o volume de sangue coletado, as condições e a conservação das amostras, métodos de extração do DNA, iniciadores, reagentes, programa de amplificação e os que estão diretamente ligados com a sensibilidade e a especificidade (WINCKER *et al.*, 1994, BRITTO *et al.*, 1995b; GOMES *et al.*, 1998; CHIARAMONTE *et al.*, 1999; CASTRO *et al.*, 2002; SCHIJMAN *et al.*, 2011). Embora a PCR não permita o isolamento do parasito, a sensibilidade é mais elevada quando comparado à hemocultura e, considerando a dificuldade do diagnóstico na fase crônica, a proposta de aliar um método molecular na detecção da infecção pré ou após o tratamento específico é importante. A PCR como método diagnóstico da doença de Chagas é uma alternativa para a comprovação do parasito devido à capacidade em detectar quantidade mínima de DNA e em curto período de tempo para a realização do método em comparação aos parasitológicos (CHIARI *et al.*, 2005). Com o objetivo de avaliar o desempenho da PCR para detecção do *T. cruzi* foi estabelecida uma rede internacional a fim de compartilhar e selecionar os procedimentos técnicos empregados por diferentes pesquisadores na América Latina, sendo o primeiro passo na padronização e validação da PCR no diagnóstico da infecção chagásica crônica (SCHIJMAN *et al.*, 2011).

Diante desses aspectos, neste trabalho foram empregados os métodos de diagnóstico parasitológico e molecular do *T. cruzi* em pacientes na fase crônica da doença de Chagas, sem tratamento prévio e portadores de diferentes formas clínicas. Estes métodos permitiram

confirmar a infecção e, analisar por parâmetros moleculares as populações do parasito recém-isoladas desses pacientes e pouco manipuladas em laboratório, a fim de determinar o perfil genético e a possível associação com as formas clínicas.

## 2 Objetivo geral

Avaliar a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hemocultura como critério parasitológico-molecular na detecção do *Trypanosoma cruzi* no sangue e determinar a variabilidade genética intraespecífica dessas populações recém-isoladas de pacientes chagásicos crônicos não tratados, portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas.

### 2.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar e comparar a positividade da PCR e da hemocultura em pacientes chagásicos crônicos portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca;
- ✓ Determinar os padrões genéticos, por diferentes marcadores moleculares, das populações do *Trypanosoma cruzi* e suas DTUs em amostras recentemente isoladas de pacientes chagásicos com as formas clínicas indeterminada e cardíaca, não tratados.
- ✓ Avaliar comparativamente os padrões genéticos encontrados nos isolados do *Trypanosoma cruzi* procedentes de pacientes chagásicos com as formas clínicas indeterminada e cardíaca.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Seleção dos pacientes chagásicos**

Neste trabalho foram acompanhados 91 pacientes com sorologia convencional reativa para tripanossomíase americana, desses, 89 são de diferentes regiões do estado de Minas Gerais, um da região de Presidente Prudente (São Paulo) e um de Barreiras (Bahia). Nenhum dos pacientes estudados recebeu tratamento específico anti-*T. cruzi* e, 25,3% (23/91) foram caracterizados com a forma clínica indeterminada e 74,7% (68/91) apresentaram diferentes graus de comprometimento cardíaco, conforme a classificação descrita por Rocha *et al.* (2003). Os pacientes portadores da forma cardíaca foram agrupados de acordo com o grau de acometimento da doença em cinco níveis de cardiopatia chagásica crônica (CCC). Os pacientes CCC1 com cardiopatia subclínica; os CCC2 apresentam alguma alteração no eletrocardiograma; os CCC3 há indícios de danos cardíacos; CCC4 são pacientes com graves distúrbios na condução elétrica cardíaca ou anormalidade no eletrocardiograma e, CCC5 são aqueles que apresentam também aumento ventricular (ROCHA *et al.*, 2003).

Os pacientes foram agendados para consulta médica conforme sua conveniência no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) da Faculdade de Medicina da UFMG e foram examinados e acompanhados de acordo com rotina padronizada pelo Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha. Os sujeitos envolvidos no estudo foram esclarecidos quanto aos objetivos do projeto de pesquisa e aos riscos ligados a participação, sendo estes selecionados após concordarem e autorizarem por escrito, um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP (Projeto CAAE: 0559.0.203.000-11/2012). Após a autorização, foi realizada a coleta de 35mL de sangue com a utilização do material biológico e seus produtos.

#### **3.2 Diagnóstico parasitológico e molecular do *T. cruzi***

##### **3.2.1 Hemocultura**

A hemocultura foi realizada conforme descrita por Chiari *et al.* (1989) com algumas modificações. De cada paciente foi coletado 30mL de sangue venoso utilizando tubos a vácuo heparinizado e posteriormente transferidos para um tubo de plástico cônico estéril de 50mL (Falcon®, USA). A seguir, o sangue foi centrifugado a 2.200rpm, 10 min a 4°C (HERMLE Z323K, Hermle Labortechnik GmbH, Alemanha) seguido da remoção do sobrenadante (plasma) para um tubo plástico cônico estéril de 15mL (Falcon®, USA). Ao sedimento de hemácias foram adicionados 10mL de meio de cultura acelular LIT (*Liver infusion tryptose*) e centrifugado a 2.200 rpm por 20min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao sedimento de hemácias 10mL de LIT, homogeneizado e transferido para seis tubos plásticos

de 15mL contendo 3mL de LIT cada. O tubo contendo plasma foi centrifugado nas mesmas condições e o plasma transferido para outro tubo de 15mL, armazenado a -20°C e, ao sedimento obtido do plasma foram adicionados 5mL de LIT. Os tubos foram incubados a 26-28°C, agitados levemente duas a três vezes por semana e alíquotas de 10µL da suspensão de cada tubo foram examinadas ao microscópio entre lâmina e lamínula, com aumento de 400×, mensalmente até 150 dias. A partir das hemoculturas positivas foram realizados cultivos em meio LIT para o isolamento do parasito, obtenção de massa úmida e criopreservação das amostras em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) a -196° C.

### **3.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

#### **3.2.2.1 Coleta de sangue e extração do DNA**

Uma amostra de 5mL de sangue foi coletada de cada paciente usando tubo a vácuo sem anticoagulante e transferida imediatamente para tubos plásticos estéreis de 50mL (*Falcon, USA*) contendo solução de lise Guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M (*Sigma Chemical Company, USA*) pH 8,0 (ÁVILA *et al.*, 1991) e homogeneizado lentamente. As amostras de sangue permaneceram uma semana à temperatura ambiente e, posteriormente foram fervidas a 100°C por 15min, para permitir a linearização dos minicírculos do kDNA (BRITTO *et al.*, 1993). A extração do DNA foi realizada segundo Gomes *et al.* (1998) com 200µL do sangue de cada paciente em microtubos de 1,5mL adicionando-se 100µL de fenol Tris pH 8,0 e 100µL de clorofórmio, precipitação em gelo durante 15min em presença de 10mM de acetato de sódio, 40µg/mL de glicogênio e dois volumes de etanol absoluto. O DNA foi resuspendido em água mili-Q estéril e armazenado a 4°C até o momento de uso (GOMES *et al.*, 1998).

Com o objetivo de compartilhar e selecionar os procedimentos técnicos empregados por diferentes pesquisadores na América Latina, um encontro internacional foi realizado, a fim de padronizar e validar a PCR no diagnóstico da infecção chagásica crônica. Neste encontro foram discutidos a utilização de dois métodos de extração de DNA, o de fenol-clorofórmio em comparação a um kit comercial o *Mini Kit QIAamp (Qiagen Sample & Assay Technologies, Mississauga, ON, Canada)* (SCHIJMAN *et al.*, 2011).

Com a finalidade de comparar a eficiência de dois métodos de extração, uma segunda técnica foi realizada usando o *Mini Kit QIAamp (Qiagen Sample & Assay Technologies, Mississauga, ON, Canada)* em 37 amostras de sangue dos pacientes. Dez amostras de pacientes com forma clínica indeterminada e 27 com cardiopatia e todas as amostras com hemocultura positiva. A extração foi realizada usando 400µL de sangue de cada paciente em microtubos de 1,5mL e, adicionados 200µL de etanol absoluto. Esta solução foi homogeneizada durante 15s e aplicada em um tubo contendo coluna de sílica e centrifugada a



13.000rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415C, Brinkmann Instruments Inc., Hamburg, Germany*) por 1min. O sobrenadante foi descartado e a coluna colocada em novo tubo com 500µL do tampão Aw1 e centrifugada nas mesmas condições. A seguir, a coluna de sílica foi transferida para um novo tubo e o mesmo volume do tampão Aw2 foi adicionado e centrifugado durante 3min a 13.000rpm. A coluna foi transferida para um novo tubo e centrifugada na mesma rotação por 1min e transferida novamente para um microtubo de 1,5mL. A seguir foram adicionados 200µL de água Mili-Q estéril, mantida a temperatura ambiente por 5min e centrifugada a 13.000rpm por 1min. A coluna foi descartada e o sobrenadante armazenado a 4°C até o momento do uso (Schijman *et al.*, 2011).

#### **3.2.2.2 Condições da PCR**

As seqüências da região constante dos minicírculos do kDNA do *T. cruzi* foram alvo da reação que amplifica um fragmento de 330 pares de base (pb) usando os iniciadores 121 e 122 descritos por Degraeve *et al.* (1988) e sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, USA*) (Tabela 1) e Platinum *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen, CA, USA*). As condições de amplificação consistiram de desnaturação inicial a 95°C (5min) seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C (1min), anelamento a 65°C (1min), extensão a 72°C (1min) e uma extensão final a 72°C (10min) em termociclador (PTC-100 *MJ Research Inc. USA*) (Gomes *et al.*, 1998).

Os produtos amplificados pela PCR foram visualizados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% revelados pela prata (SANTOS *et al.*, 1993). O tamanho das bandas foi monitorado por marcador de peso molecular de 100pb (DNA *Ladder Promega, Madison, WI, USA*). Para evitar contaminações, cada etapa da reação foi realizada em diferentes ambientes utilizando reagentes e equipamentos destinados exclusivamente para cada um deles. As etapas de extração do DNA e mistura da reação da PCR foram monitoradas com controles positivos (amostras de indivíduos chagásicos) e negativos (indivíduos não chagásicos de área não endêmica). Como controle positivo da reação de PCR foram utilizados 2µL de DNA correspondentes as DTUs do *T. cruzi* (TcI-TcVI) e controle negativo reagentes sem adição de DNA.

### **3.3 Caracterização molecular do *T. cruzi***

#### **3.3.1 Cultura do *T. cruzi* e obtenção de massa úmida**

Após o isolamento do *T. cruzi* foi realizado o crescimento em meio de cultura acelular LIT com o mínimo de passagens, até quatro passagens, a fim de evitar a seleção de subpopulações. Para a obtenção da massa do parasito com  $1 \times 10^6$  epimastigotas/mL, a cultura foi lavada duas vezes em tampão KRT (*Krebs-Ringer-Tris/pH 7,2*), concentrada por

centrifugação a 2.200rpm (*HERMLE Z323K, Hermle Labortechnik GmbH, Alemanha*) a 4°C durante 10min e o sedimento (massa úmida) armazenado em triplicata a -20°C, para posterior extração do DNA.

### **3.3.2 Preparação do DNA genômico**

O sedimento do parasito foi re-suspendido em 1mL do tampão de lise (NaCl 80mM/EDTA 45mM, pH 8,0/SDS 1%) contendo 0,1 mg/mL de proteinase K (*Promega, USA*) e incubado a 37°C durante 12h. A extração do DNA foi realizada por desproteinização com fenol (v/v), a fase aquosa recuperada e adicionada de igual volume (v/v) de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 25:24:1, seguida de agitação e centrifugação. Após esta etapa foi adicionado uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1. A precipitação do DNA foi realizada com dois volumes de etanol absoluto a 4°C, adicionado de 1mL de tampão ribonuclease (NaCl 80mM/EDTA 5mM, pH 8,0, 10U/ $\mu$ L de ribonuclease - *Promega, USA*). Esta solução foi incubada durante 2h a 37°C e realizada uma nova extração conforme descrição anterior. O DNA foi ressuspendido em 300 $\mu$ L de tampão *Low TE* (10mM Tris-HCl e 0,1mM EDTA pH 8,0) e armazenado a 4°C (*MACEDO et al., 1992*). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro a 260nm sendo o grau de pureza das amostras determinado pela relação das absorbâncias a 260/280nm. A concentração final de cada amostra de DNA foi ajustada para 3ng/ $\mu$ L, e as amostras armazenadas a 4°C até o momento do uso.

### **3.3.3 PCR do gene 24S $\alpha$ do DNA ribossomal (rRNA)**

O DNA das amostras do *T. cruzi* foi submetido a uma PCR composta de 10mM Tris-HCl pH 9,0; 50mM KCl; 0,1 % Triton X-100 *Buffer B*; 3,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,625U de *Taq* DNA Polimerase; 200 $\mu$ M de cada dNTP (*Promega*), 0,25 $\mu$ M de cada iniciador D71 e D72 (*IDT*) (Tabela 1) e, 2 $\mu$ L de DNA. Os ciclos de amplificação consistiram de uma primeira etapa de desnaturação (94°C, 1 min), desnaturação (94°C, 30 s), seguido de anelamento (60°C, 30s) e extensão (72°C, 30s), totalizando 30 ciclos (*SOUTO & ZINGALES, 1993; SOUTO et al., 1996*). Como controles das amplificações foram utilizados DNA de cepas ou clones que representam as DTUs do *T. cruzi* I (clone Col.17G2 da cepa referência Colombiana isolada de humano, BA), *T. cruzi* II (cepa referência JG isolada de humano, MG), *T. cruzi* III (cepa referência 222 isolada de humano, MG), *T. cruzi* IV (cepa referência CAN III, isolada de humano, Pará), *T. cruzi* V (cepa 3253, Uberaba, MG) e *T. cruzi* VI (cepa referência CL, isolada de triatomíneo, RS). Após a realização da PCR alíquotas de 5 $\mu$ L dos amplicons foram analisadas em gel de poliacrilamida a 6% e corado pela prata para visualização dos perfis de bandas: 110pb (TcI), 125pb (TcII/TcVI), 110pb e 125 pb (TcIII/TcV) e 117-119pb (TcIV).

Tabela 1- Características e referências dos iniciadores utilizados nas reações da PCR para detecção e caracterização molecular do *T. cruzi*.

PCR	DNA alvo	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Referência	Fragmento amplificado (pares de base)	DTUs
k-DNA	Minicírculo do k-DNA	121	AAATAATGTACGGG(G/T)G AGATGCATGA	Degrave <i>et al.</i> (1988)	330	-
		122	GGTTCGATTGGGGTTGGTG TAATATA			
24S $\alpha$ rDNA	Domínio D7	D71	AAGGTGCGTTCGACAGTGT GG	Souto & Zingales (1993)	110	TcI, TcIII, TcV
		D72	TTTTTCAGAATGGCCGAACA GT	Souto & Zingales (1993) Souto & Zingales (1993)	125 117/119	TcII, TcVI, TcV TcIV
CO II (RFLP)	Mitochondrial	TcMit-21	TTGTAATAGGAGTCATGTT*	Freitas <i>et al.</i> (2006)	30, 81 e 264**	TcI
		TcMit-10	CCATATATTGTTGCATTAT T*		81 e 294**	TcIII, TcIV, TcV, TcVI
SL-IRac	Miniexon	UTCC	CGTACCAATATAGTACAGA AACTG	Burgos <i>et al.</i> (2007)	81 e 212** ~150-157	TcII TcI, TcII, TcV, TcVI
		TcIII	CTCCCCAGTGTGGCCTGGG		200	TcIII, TcIV

\*Amplifica um fragmento de 375pb com três sítios de restrição para a enzima AluI; \*\*Fragmentos obtidos após a digestão com a enzima AluI.

### 3.3.4 PCR do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (CO II)

A amplificação da região gênica que compreende a subunidade II da enzima mitocondrial citocromo oxidase do *T. cruzi* foi realizada com o DNA das amostras submetido a uma PCR composta de tampão I0 10× (10mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl); 3,5mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5U Taq DNA polimerase (*Phonectria* Biotecnologia & Serviços, Belo Horizonte, MG), 250µM de cada dNTP; 0,3µM dos iniciadores externos TcMit-21 e TcMit10 (*IDT, USA*) (Tabela 1), 3µL de DNA total (na concentração de 3ng/µL) e quantidade de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril suficiente para 20µL.

Os ciclos de amplificação da PCR consistiram de desnaturação inicial a 95°C por 5min, desnaturação (94°C, 45s), anelamento (48°C, 45s) e extensão (72° C, 1min) totalizando 40 ciclos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6%, a seguir, 15µL da PCR foi submetido à digestão utilizando enzima de restrição *Alu I* (*Promega*), conforme instruções do fabricante. O polimorfismo entre os tamanhos dos fragmentos encontrados foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% revelados pela prata e, como padrão de comparação dos RFLPs foram utilizados DNA de cepas e clones correspondentes as DTUs: *T. cruzi* I (clone Col.17G2 da cepa Colombiana), *T. cruzi* II (cepa JG), *T. cruzi* III (cepa 222), *T. cruzi* IV (cepa CAN III), *T. cruzi* V (cepa 3253) e *T. cruzi* VI (cepa CL). A interpretação do gel foi realizada de acordo com os haplótipos encontrados: *T. cruzi* I (clone Col.17G2, fragmentos: 30, 81, 264pb) correspondem ao haplótipo A; *T. cruzi* II (cepa JG, fragmentos: 81 e 212pb) haplótipo C. Entretanto, este marcador não diferencia as cepas *T. cruzi* III das cepas híbridas já que apresentam o mesmo perfil de restrição para o gene COII (fragmentos: 81 e 294pb) haplótipo B (FREITAS *et al.*, 2006).

### 3.3.5 Espaçador intergênico dos genes minixon do *T. cruzi* (SI-IRac)

A amplificação da região intergênica dos genes minixon foi realizada com o DNA das amostras do *T. cruzi* submetido a uma PCR contendo 20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl; 3mM MgCl<sub>2</sub>; 250mM de cada dNTP e 3µM de cada iniciador TcIII e UTCC (*IDT*) descritos na tabela 1, 1U de Platinum Taq DNA polimerase (*Invitrogen, USA*); 1,5µL de DNA total (na concentração de 3ng/µL) e quantidade de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril suficiente para 15µL. Estes iniciadores reconhecem as posições entre 368-386pb e 546-570pb da unidade repetitiva do minixon do *T. cruzi* (BURGOS *et al.*, 2007).

Os ciclos de amplificação da PCR consistem de uma etapa inicial de desnaturação (94°C, 3min), anelamento (68°C, 1min), extensão dos iniciadores (72°C, 1min) e desnaturação

(94°C, 1min). A cada três ciclos, a temperatura de anelamento foi diminuída para 66, 64, 62 e 60°C. Na última temperatura o número de ciclos foi aumentado para 35, seguido de uma extensão final (72°C, 10 min). A análise dos produtos amplificados em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata, permite distinguir as amostras do *T. cruzi* III (amplifica fragmento de ~200pb) daquelas pertencentes ao *T. cruzi* I, II e híbridos (amplifica fragmento de ~150-157pb) (BURGOS *et al.*, 2007). Como controles da reação da PCR foram utilizados DNA correspondente a cada DTU do *T. cruzi*. As cepas utilizadas foram dos grupos: *T. cruzi* I (Col.17G2 da cepa Colombiana), *T. cruzi* II (cepa JG), *T. cruzi* III (cepa 222), *T. cruzi* IV (cepa CAN III), *T. cruzi* V (cepa 3253) e *T. cruzi* VI (cepa CL).

### **3.3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Os produtos de amplificação obtidos pelas diferentes PCR foram analisados em géis de poliacrilamida não desnaturante na concentração de 6% e coloração por nitrato de prata 0,2% para visualização dos amplicons. Uma alíquota de 3-5µL do produto amplificado, diluído com igual volume do tampão da amostra 2× (0,5% de azul de bromofenol; 0,5% de xileno-cianol; 60% de glicerol) foi aplicado em cada canaleta. A corrida eletroforética foi realizada a 100-120V durante 3h, ou seja, com a migração de 6-7 cm do corante xileno cianol. O tamanho das bandas amplificadas foi monitorado por marcadores de peso molecular de 25pb e 100pb (*Promega*). Os géis foram transferidos para solução fixadora (etanol absoluto 10%, ácido acético 0,5%) durante 10min e revelados pela coloração com 0,2% de nitrato de prata (AgNO<sub>2</sub>) diluído em solução fixadora por 10min sob agitação lenta. Posteriormente estes géis foram lavados rapidamente em água Milli-Q e seguido da redução dos sais de prata com 3% (p/v) de hidróxido de sódio (NaOH) e 0,3% de formaldeído a 37% até a visualização dos produtos amplificados (SANTOS *et al.*, 1993). A revelação foi interrompida com a solução fixadora e os géis fotografados para documentação.

### **3.4 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS para Windows, versão 18, os resultados foram avaliados por estatística descritiva para os cálculos de percentagem, média e desvio padrão. Os dados foram considerados significativos quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ) e em todos os testes foram descritos o valor de **p**. A análise de variância de Friedman foi empregada na comparação entre mais de dois grupos após a correção de Bonferroni. As variáveis contínuas sem distribuição normal foram avaliadas pelos testes de Wilcoxon e Mann-Whitney empregados na comparação entre

dois grupos. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado na comparação entre três ou mais grupos. Em complemento as análises, o teste qui-quadrado e teste exato de Fisher foram utilizados para avaliar as possíveis relações entre as características estudadas.

## 4 Resultados

### 4.1 Diagnóstico parasitológico e molecular dos pacientes chagásicos

A hemocultura e a PCR foram realizadas em 91 pacientes chagásicos crônicos não tratados, avaliados e acompanhados segundo critérios clínicos previamente estabelecidos, sendo 23 caracterizados com a forma clínica indeterminada e 68 com a forma cardíaca. Desses 58,24% (53/91) são do gênero masculino e 41,76% (38/91) são do gênero feminino com a faixa etária variando entre 25 e 81, média de 51,8 anos e desvio padrão de  $\pm 11,3$ . A positividade da hemocultura foi 54,95% (50/91) e da PCR 98,90% (90/91), dados que foram significativos pela análise do Teste de Wilcoxon  $Z = -6,33$   $p < 0,001$  (Gráfico 1).

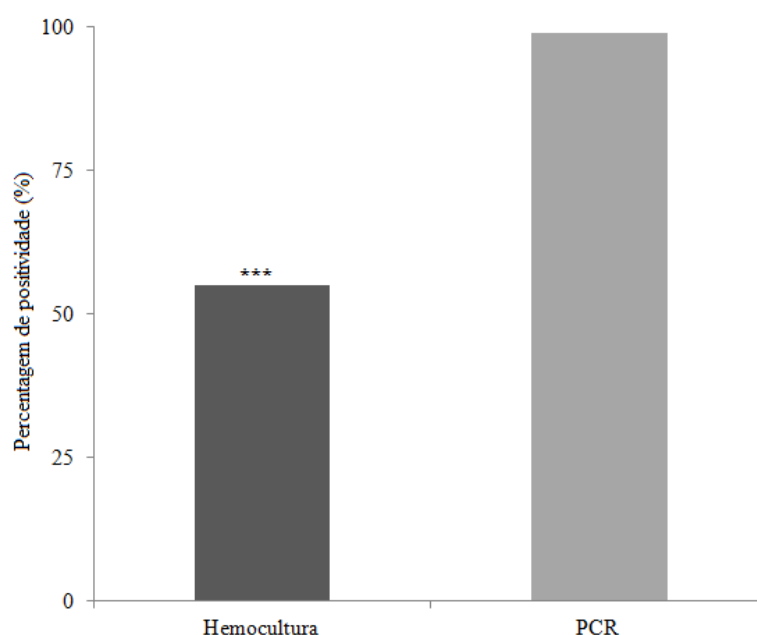


Gráfico 1 - Positividade da hemocultura e da PCR em pacientes na fase crônica da doença de Chagas (\*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.1.1 Hemocultura

A positividade da hemocultura em 68 portadores da forma cardíaca foi 60,29% (41/68) e, 39,13% (9/23) nos pacientes com a forma indeterminada. A análise pelo teste qui-quadrado revelou que não foi significativa a positividade entre os pacientes com as formas indeterminada e cardíaca ( $p = 0,072$ ) (Tabela 2). A positividade da hemocultura em pacientes com diferentes níveis de CCC foi de 75,00% em ambos os pacientes CCC1 e CCC2, nos pacientes CCC3 foi 50,00%, os CCC4 apresentaram índices mais elevados (85,70%) e, nos portadores de CCC5 a positividade foi 56,80%. Essas diferenças não apresentam significância

estatística segundo o teste exato de Fisher, cujo valor de p para todas as comparações 2 a 2 é maior que 0,05. (Tabela 3).

Tabela 2 - Distribuição da positividade da hemocultura em pacientes chagásicos crônicos não tratados, portadores de diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

<b>Forma Clínica</b>	<b>Positividade da hemocultura (%)</b>	<b>Número de pacientes positivos/Total</b>
Indeterminada	39,13	9/23
Cardíaca	60,29	41/68
Total	54,95	50/91

%; Percentual; p=0,072

Tabela 3 - Positividade da hemocultura em pacientes na fase crônica da doença de Chagas portadores de diferentes níveis de cardiopatia chagásica crônica

<b>Níveis de cardiopatia chagásica</b>	<b>Positividade da hemocultura (%)</b>	<b>Número de pacientes positivos/Total</b>
CCC 1	75,00	3/4
CCC 2	75,00	3/4
CCC 3	50,00	8/16
CCC 4	85,70	6/7
CCC 5	56,80	21/37

%; Percentual; CCC: Cardiopatia Chagásica Crônica em diferentes graus de acometimento cardíaco;

CCC1: cardiopatia subclínica; CCC2: anormalidade no eletrocardiograma; CCC3: indício de dano

cardíaco; CCC4: danos no sistema de condução elétrica cardíaca; CCC5: aumento ventricular; p>0,05.

A faixa etária dos pacientes chagásicos variou entre 26 e 81 anos (média de 51,8 anos, desvio padrão  $\pm 11,3$ ). A positividade da hemocultura foi aumentando gradativamente de acordo com a faixa etária dos pacientes e, aparentemente não há correlação com a forma clínica que eles são portadores. A positividade da hemocultura foi 52,94% (9/17) para os pacientes entre 30-39 anos de idade; 52,94% (9/17) positivaram na faixa de 40-49 anos; 53,85% (21/39) 50-59 anos; 58,33% (7/12) 60-69 anos, alcançando 75,00% (3/4) entre os de 70-79 anos. Ao aplicar o teste exato de Fisher não houve diferença entre as faixas etárias (p>0,05) (Tabela 4).



Tabela 4 - Distribuição da positividade da hemocultura por faixa etária e formas clínicas dos pacientes na fase crônica da doença de Chagas

Faixa Etária (anos)	Positividade da hemocultura n (%)		
	Formas clínicas		
	Cardíaca	Indeterminada	Total
20 – 29	1/1 (100,00)	0/0 (0,00)	1/1 (100,00)
30 - 39	4/6 (66,67)	5/11 (45,45)	9/17 (52,94)
40 - 49	9/12 (75,00)	0/5 (0,00)	9/17 (52,94)
50 - 59	19/34 (55,88)	2/5 (40,00)	21/39 (53,85)
60 - 69	6/11 (54,55)	1/1 (100,00)	7/12 (58,33)
70 - 79	2/3 (66,67)	1/1 (100,00)	3/4 (75,00)
80 - 89	0/1 (0,00)	0/0 (0,00)	0/1 (0,00)

%; percentual; (p>0,05).

O número de tubos positivos na hemocultura por paciente e forma clínica que é portador foi avaliado e, pelo menos um tubo positivo foi identificado em 34,00% dos pacientes, 22,00% deles tiveram dois tubos positivos, três ou quatro tubos positivos foram detectados em 20,00% e, 24,00% dos pacientes tiveram entre cinco e sete tubos positivos. A maioria dos pacientes portadores das formas clínicas, cardíaca e indeterminada apresentou apenas um tubo positivo 29,27% (12/41) e 55,56% (5/9), respectivamente. O teste de Friedman demonstrou diferença significativa entre as variáveis ( $\chi^2(3) = 15,818$ ,  $p < 0,001$ ) e, quando aplicado o teste de Wilcoxon (com correção de Bonferroni,  $p < 0,008$ ) revelou que esta diferença está relacionada aos pacientes com apenas um tubo de hemocultura positivo em relação àqueles com três ou quatro tubos positivos ( $Z = -2,646$ ,  $p = 0,008$ ) (Tabela 5).

Tabela 5 - Positividade de tubos da hemocultura por paciente chagásico com diferentes formas clínicas

Nº de tubos positivos	Tubos positivos por paciente/forma clínica		
	Cardíaca (%/Nº positivos/total)	Indeterminada (%/Nº positivos/total)	Total (%/Nº positivos/total)
1	29,27 (12/41)	55,56 (5/9)	**34,00 (17/50)
2	24,39 (10/41)	11,11 (1/9)	22,00 (11/50)
03 ou 04	21,95 (9/41)	11,11 (1/9)	**20,00 (10/50)
05 a 07	24,29 (10/41)	22,22 (2/9)	24,00 (12/50)

Nº: Número; %: Percentual; \*\*p<0,008

A positividade das hemoculturas foi determinada referente ao período do exame e em relação às formas clínicas e, 28,00% dos pacientes foram positivos aos 30 dias, 22,00% aos 45 dias, 20,00 % aos 60 dias, 24,00% aos 90 dias, e apenas 6,00% foram identificadas as formas evolutivas do *T. cruzi* aos 120 dias. O perfil de positividade variou entre os pacientes com as diferentes formas clínicas, o índice de positividade mais elevado (26,83%) foi aos 30 e 45 dias para a forma cardíaca. Os pacientes da forma indeterminada positivaram 33,33% das hemoculturas aos 30 dias e, a maioria deles (44,45%) a hemocultura foi positiva aos 90 dias. A aplicação do teste de Friedman evidenciou diferença entre as variáveis analisadas ( $\chi^2(4)=29,167$ ,  $p<0,001$ ) e o teste de Wilcoxon (com correção de Bonferroni,  $p<0,005$ ) ratificou esta diferença entre os períodos de 30 e 120 dias ( $Z= -3,317$ ,  $p= 0,001$ ), 45 e 120 dias ( $Z= -2,828$ ,  $p= 0,005$ ) e 90 e 120 dias ( $Z= -3,000$ ,  $p= 0,003$ ) (Tabela 6).

Tabela 6 - Perfil de positividade da hemocultura em relação ao período examinado em pacientes chagásicos crônicos com diferentes formas clínicas

Período examinado (dias)	Positividade da hemocultura		
	Formas clínicas		Total
	Cardíaca (%/Nº positivos/total)	Indeterminada (%/Nº positivos/total)	(%/Nº positivos/total)
30	26,83 (11/41)	33,33 (3/9)	***28,00 (14/50)
45	26,83 (11/41)	0,00 (0/9)	**22,00 (11/50)
60	19,51 (8/41)	22,22 (2/9)	20,00 (10/50)
90	19,51 (8/41)	44,45 (4/9)	**24,00 (12/50)
120	7,32 (3/41)	0,00 (0/9)	**, ***6,00%(3/50)

%: Percentual; Nº: Número; \*\*\*p=0,001; \*\*p=0,005; \* p=0,003

#### 4.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Com o emprego da PCR foi possível detectar o kDNA do parasito em 98,90% (90/91) dos pacientes usando o método de extração fenol-clorofórmio. No entanto, as amostras extraídas pelo *mini kit* positivaram apenas 54,05% (20/37) mostrando diferença na positividade da PCR ao comparar os métodos de extração de DNA pelo teste de Wilcoxon ( $Z = -4,00$ ,  $p < 0,001$ ) (Gráfico 2). A amplificação das amostras extraídas pelos dois métodos demonstrou diferentes padrões na intensidade das bandas na região de 330pb (Figuras 1 e 2).

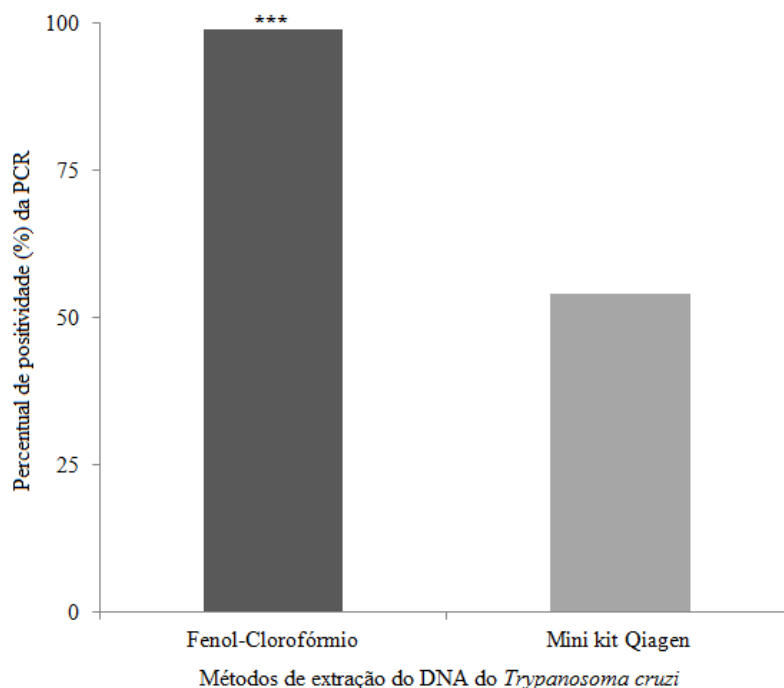


Gráfico 2 - Positividade da PCR usando diferentes métodos de extração do DNA (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Os 68 pacientes chagásicos portadores da forma clínica cardíaca foram positivos pela PCR quando a extração do DNA foi realizada pelo método do fenol-clorofórmio apresentando a mesma variação na intensidade dos fragmentos amplificados. Em 27 amostras desses pacientes o DNA foi extraído pelo *mini kit Qiagen* e, apenas 55,56% (15/27) foram positivas. A análise pelo teste de Wilcoxon mostrou que também houve diferença na positividade da PCR desses pacientes entre os métodos de extração ( $Z = -4,69$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 1).

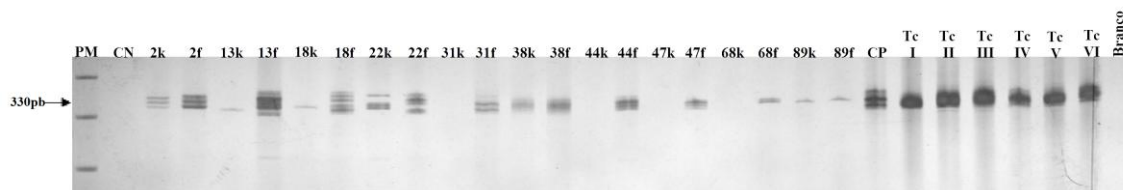


Figura 1 - Gel de poliacrilamida a 6% revelado pela prata representativo das amostras dos pacientes com a forma cardíaca mostrando a amplificação pela PCR do fragmento específico para o *T. cruzi* de 330 pares de bases (pb). Canaletas 1: PM-peso molecular (*Ladder* 100pb) e 2: CN-controle negativo (amostra de indivíduo não chagásico); Canaletas 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 (amostras de DNA extraídas pelo *kit Qiagen*); Canaletas 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 (amostras de DNA extraídas pelo fenol-clorofórmio); Canaleta 23: CP-controle positivo (amostra de paciente chagásico); Canaletas 24 a 29: TcI-VI (amostras controles correspondentes às diferentes DTUs do *T. cruzi*); Canaleta 30: Branco (reagentes sem adição de DNA).

A PCR foi positiva em 95,65% (22/23) dos pacientes com a forma indeterminada quando o método de extração do DNA usado foi o do fenol-clorofórmio e, em 50,00% (5/10) de dez amostras extraídas com o *mini kit Qiagen*, o teste de Wilcoxon revelou diferença na positividade da PCR entre os métodos de extração ( $Z = -2,97$ ,  $p = 0,003$ ) (Figura 2).

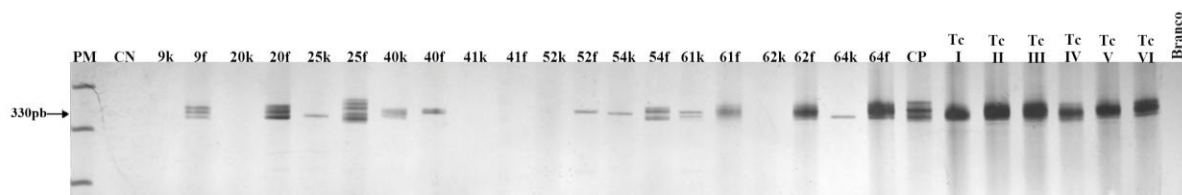


Figura 2 - Gel de poliacrilamida a 6% revelado pela prata representativo dos pacientes com a forma indeterminada mostrando a amplificação pela PCR do fragmento específico para o *T. cruzi* de 330 pares de bases (pb).Canaletas 1: PM-peso molecular (*Ladder* 100pb) e 2: CN-controle negativo (amostra de indivíduo não chagásico); Canaletas 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 (amostras de DNA extraídas pelo *kit Qiagen*); Canaletas 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 (amostras de DNA extraídas pelo fenol-clorofórmio); Canaleta 23: CP-controle positivo (amostra de paciente chagásico); Canaletas 24 a 29: TcI-VI (controles correspondentes às diferentes DTUs do *T. cruzi*); Canaleta 30: Branco (reagentes sem adição de DNA).

#### 4.1.3 Associação da positividade da hemocultura e PCR

O *T. cruzi* foi detectado em 98,90% (90/91) dos pacientes chagásicos ao associar a hemocultura com a PCR, 54,95% (50/91) foram positivos tanto pela PCR quanto por hemocultura, 43,96% (40/91) foram positivos apenas pela PCR e, em 1,09% (1/91) dos pacientes ambos os métodos foram negativos. A análise pelo teste de Friedman revelou diferença significativa ( $\chi^2(3) = 173,751$ ,  $p < 0,001$ ) e, o de Wilcoxon (com correção de

Bonferroni,  $p < 0,008$ ) demonstrou que a diferença ocorreu entre a associação dos métodos em relação aos pacientes positivos na hemocultura e na PCR ( $Z = -6,325$ ,  $p < 0,001$ ); aqueles detectados somente pela PCR ( $Z = -7,071$ ,  $p < 0,001$ ) e, nos pacientes com ambos os métodos negativos ( $Z = -9,434$ ,  $p < 0,001$ ) (Gráfico 3).

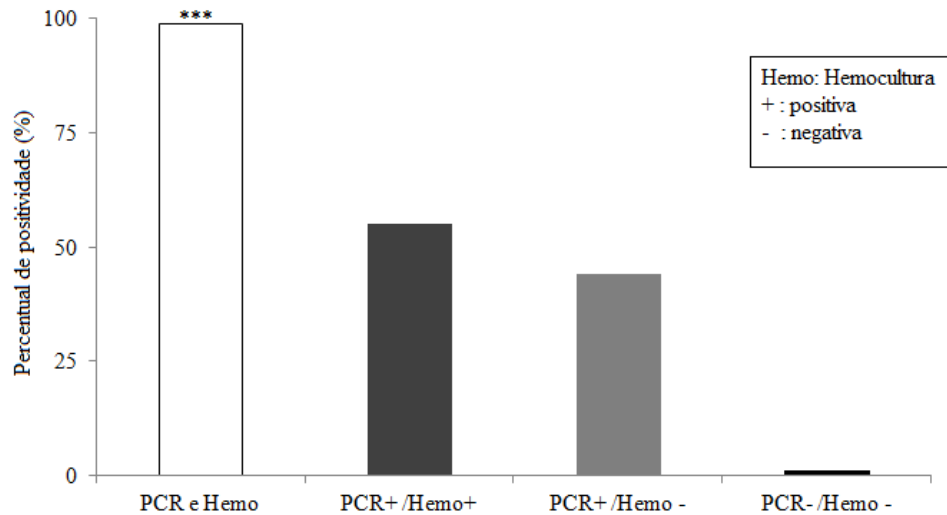


Gráfico 3 - Associação da positividade da hemocultura e a PCR dos pacientes na fase crônica da doença de Chagas (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

A associação dos dois métodos permitiu a detecção do *T. cruzi* em 100,0% (68/68) dos pacientes portadores da forma clínica cardíaca, 60,29% (41/68) deles foram positivos tanto pela hemocultura quanto pela PCR, enquanto 39,71% (27/68) dos pacientes positivaram apenas a PCR. Ao aplicar o teste de Friedman as variáveis apresentaram diferença ( $\chi^2(2) = 63,561$ ,  $p < 0,001$ ), a utilização do Wilcoxon (com correção de Bonferroni,  $p < 0,016$ ) revelou que houve significância referente à associação dos métodos quanto à positividade dos pacientes pela PCR e hemocultura ( $Z = -5,196$ ,  $p < 0,001$ ) e naqueles detectados apenas pela PCR ( $Z = -6,403$ ,  $p < 0,001$ ). (Gráfico 4).

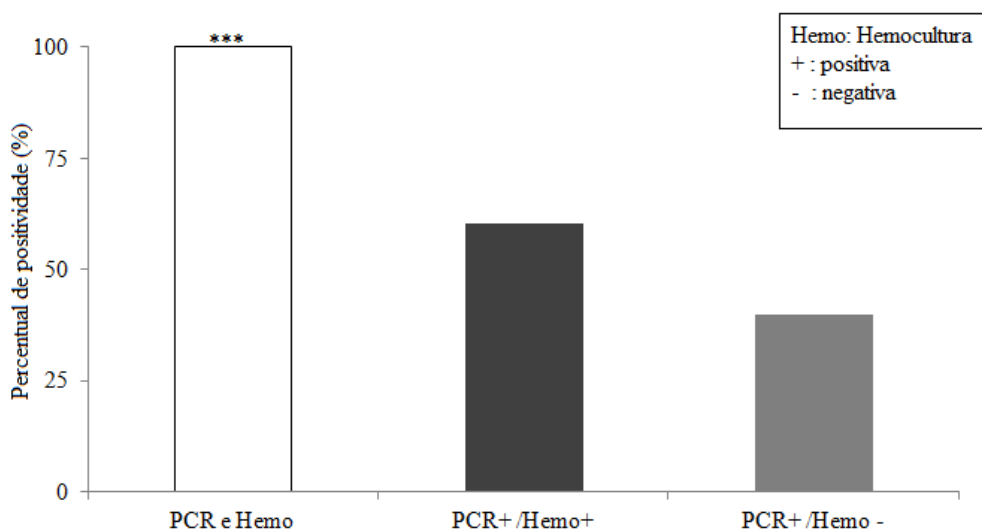


Gráfico 4 - Associação da positividade da hemocultura e a PCR dos pacientes com a forma clínica cardíaca da doença de Chagas (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

A positividade por associação dos dois métodos foi 95,65% (22/23) em pacientes portadores da forma indeterminada, 39,13% (9/23) deles foram positivos para a hemocultura e PCR, 56,52% (13/23) o parasito foi detectado apenas pela PCR e 4,35% (1/23) foram negativos pelos dois métodos. Quando utilizado o teste Friedman foi demonstrado diferença significativa entre as variáveis ( $\chi^2(3) = 40,970$ ,  $p < 0,001$ ) e, o de Wilcoxon (com correção de Bonferroni,  $p < 0,008$ ) confirmou a diferença na associação dos métodos quanto à positividade dos pacientes em ambos ( $Z = -3,606$ ,  $p < 0,001$ ); os positivos apenas pela PCR ( $Z = -3,000$ ,  $p = 0,003$ ) e aqueles com ambos os métodos negativos ( $Z = -4,583$ ,  $p < 0,001$ ). (Gráfico 5).

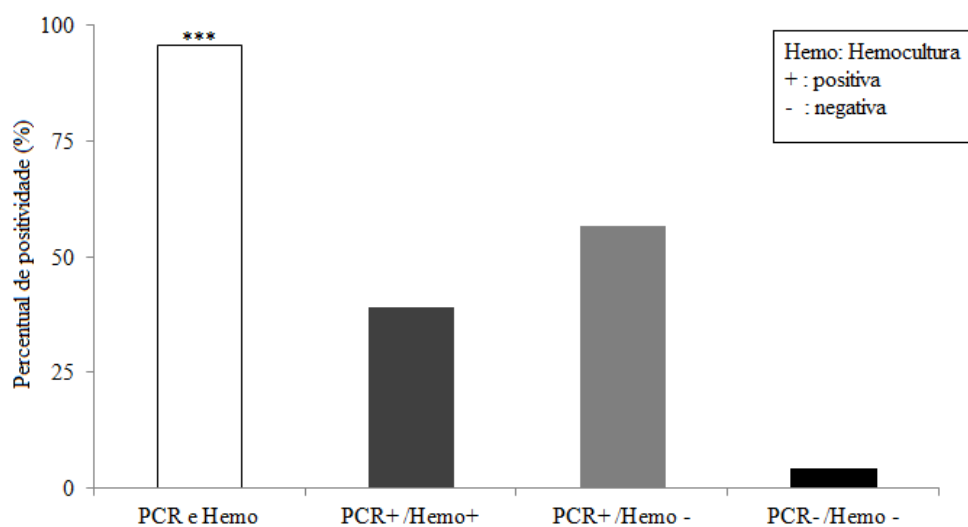


Gráfico 5 - Associação da positividade da hemocultura e a PCR dos pacientes com a forma clínica indeterminada da doença de Chagas (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

## 4.2 Genotipagem dos isolados do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* foi isolado de 36 pacientes chagásicos crônicos não tratados e, destes, sete são portadores da forma indeterminada e 29 da forma cardíaca. Na tipagem dos isolados do parasito foram utilizados três marcadores moleculares: rDNA 24S $\alpha$ , COII e SL-IRac.

### 4.2.1 Amplificação do gene 24S $\alpha$ do DNA ribossomal (RNA)

A análise de 36 isolados do *T. cruzi* pela PCR usando o marcador rDNA 24S $\alpha$  demonstrou a amplificação do fragmento de ~125pb (grupo rDNA 1) em 97,22% (35/36) das amostras com o perfil genético correspondente a DTU II. Apenas o isolado, 54, procedente de um paciente com a forma indeterminada, a amplificação foi observada na região de ~110 e 125pb (rDNA 1/2) sugerindo que corresponde a DTU III ou V (Figura 3).

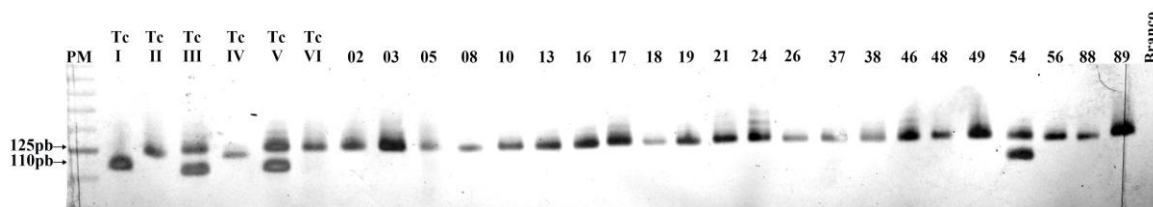


Figura 3 - Gel de poliacrilamida a 6% revelado pela prata representativo da amplificação do gene rDNA 24S $\alpha$  de isolados do *T. cruzi* procedentes de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Canaleta 1: PM-peso molecular (*Ladder* 25 pares de bases-pb); Canaletas 2 a 7: TcI-VI (amostras controles correspondentes às diferentes DTUs do *T. cruzi*); Canaletas 8 a 29 (DNA das amostras dos pacientes); Canaleta 30: Branco (reagentes sem adição de DNA).

### 4.2.2 Amplificação do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (CO II)

A PCR do gene CO II amplificou os fragmentos de 81 e 212pb relacionados ao haplogrupo mitocondrial C indicando que 97,22% (35/36) dos isolados do parasito correspondem a DTU II. O perfil de haplogrupo mitocondrial A com produtos amplificados de 30, 81 e 264pb foram obtidos para o isolado 54, sugerindo que usando este marcador corresponde a DTU I (Figura 4).

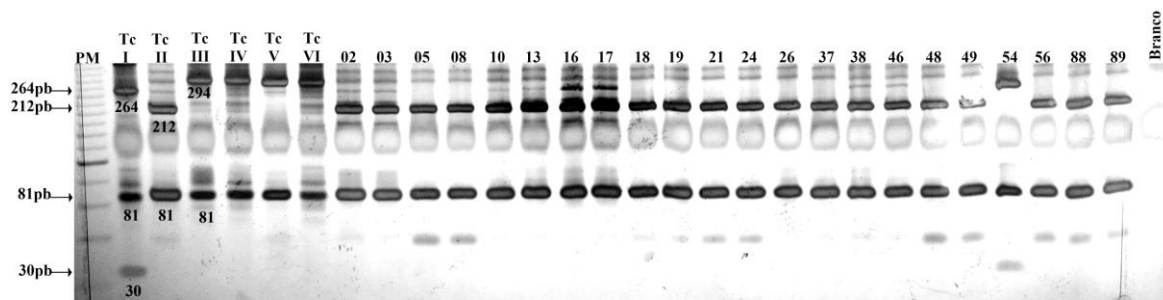


Figura 4 - Gel de poliacrilamida a 6% revelado pela prata representativo da análise dos fragmentos do gene mitocondrial CO II, após a digestão com a enzima Alu I (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) de amostras do *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos. Canaleta 1: PM-peso molecular (*Ladder* 25 pares de bases-pb); Canaletas 2 a 7: Amostras controles das DTUs do *T. cruzi* (TcI, amplificação dos fragmentos 30, 81 e 264pb, perfil correspondente ao haplogrupo mitocondrial A; TcII, fragmentos de 81 e 212pb referentes ao haplogrupo mitocondrial C; TcIII, TcIV, TcV e TcVI amplificação dos fragmentos 81 e 294pb, correspondentes ao haplogrupo mitocondrial B); Canaletas 8 a 29: (DNA das amostras dos pacientes); Canaleta 30: Branco (reagentes sem adição de DNA).

#### 4.2.3 Amplificação do espaçador intergênico dos genes minixon (SL-IRac)

A PCR com o marcador SL-IRac foi desenvolvida com o objetivo de diferenciar as DTU III e DTU IV do *T. cruzi* devido à amplificação de um fragmento de 200pb correspondente ao TcIII e ao TcIV, além de um fragmento de 150pb relacionado à DTU I e outro de 157pb correspondendo as DTUs II, V e VI (BURGOS *et al.*, 2007). Os 35 isolados caracterizados como DTU II pelos dois marcadores moleculares rDNA 24S $\alpha$  e CO II foram submetidos a PCR com SL-IRac e amplificaram um produto de ~157pb. O isolado 54, que havia apresentado o perfil de rDNA 1/2 e fragmentos correspondentes ao haplogrupo mitocondrial A (DTU I), com este marcador amplificou um fragmento de ~150pb sugerindo que este isolado corresponde a DTU I (Figura 5).

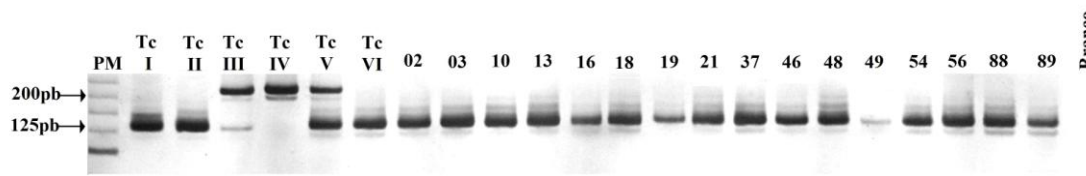


Figura 5 - Gel de poliacrilamida a 6% revelado pela prata representativo da amplificação do espaçador intergênico dos genes de minixon dos isolados do *T. cruzi* procedentes de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Canaleta 1: PM-peso molecular (*Ladder* 25 pares de bases-pb); Canaletas 2 a 7: TcI-VI (amostras controles correspondentes às diferentes DTUs do *T. cruzi*); Canaletas 8 a 29: (DNA das amostras dos pacientes); Canaleta 30: Branco (reagentes sem adição de DNA).



## 5 Discussão

A hemocultura foi positiva em mais da metade dos pacientes na fase crônica da doença de Chagas portadores de diferentes formas clínicas e não submetidos ao tratamento específico. Este método se mostrou eficaz com a coleta de apenas uma amostra de sangue de cada paciente e igual ou superior aos dados obtidos por diversos autores (CHIARI & BRENER, 1966; CHIARI & DIAS, 1975; MINTER-GOEDBLOED *et al.*, 1978; CHIARI *et al.*, 1989; BRONFEN *et al.*, 1989; GALVÃO *et al.*, 1993; JUNQUEIRA *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1999). Esta positividade pode estar relacionada ao elevado número de pacientes com a forma cardíaca, além de a maioria se encontrar na faixa etária acima de 50 anos. A positividade se mostrou mais elevada nos portadores da cardiopatia chagásica crônica nível 4 (CCC4), indicando que índices elevados de parasitemia podem estar associados a pacientes com a forma cardíaca (SCHENONE, 1999). Em indivíduos com níveis elevados de parasitemia têm sido descrito que as lesões do miocárdio são mais prováveis (COURA, 1975; PIFANO, 1977), embora esta relação com as formas clínicas mais severas da doença não tem sido observada em outros estudos (CASTRO, 1980; SILVA *et al.*, 1995; CASTRO *et al.*, 2005). A variabilidade na positividade da hemocultura está diretamente relacionada ao grupo de pacientes chagásicos crônicos com baixos e persistentes índices da infecção pelo *T. cruzi* (MINTER-GOEDBLOED, 1975; CHIARI *et al.*, 1989). Positividades mais elevadas têm sido demonstradas em pacientes sororreativos do estado do Rio Grande do Sul na faixa etária de 4 a 20 anos quando submetidos a uma hemocultura e em pacientes chagásicos crônicos oriundos do estado de Minas Gerais (FERNANDES *et al.*, 1999; MEIRA *et al.*, 2002).

Os métodos parasitológicos têm mostrado uma grande diversidade nos padrões de parasitemia em pacientes na fase crônica da doença Chagas. Além disso, devemos salientar que as formas clínicas da doença e a morbi-mortalidade podem variar consideravelmente em relação à área endêmica, a intensidade da infecção e a resposta imune dos pacientes (COURA, 2007). Outro fator envolvido é a idade do paciente, que aparentemente pode afetar a positividade das hemoculturas. Dados na literatura relatam que a progressão mais intensa na doença de Chagas pode ser resultado de possíveis modificações na resposta do sistema imunológico do paciente durante o curso da infecção pelo *T. cruzi* (BORGES-PEREIRA *et al.*, 1985; CHIARI & GALVÃO, 1997). Observamos uma relação direta entre o número de hemoculturas positivas e a faixa etária, com elevada positividade a partir dos 50 anos de idade, corroborando com os dados que mostraram a influência da idade no grau de

parasitemia dos pacientes (SILVA *et al.*, 1995; CASTRO *et al.*, 1999) e divergem daqueles que relataram declínio no número de formas tripomastigotas do parasito circulantes em relação à idade (CASTRO *et al.*, 2005).

A parasitemia dos pacientes também pode ser avaliada pelo número de tubos positivos na hemocultura mostrando que eles podem ser classificados como, baixa, média e elevada parasitemia (CASTRO, 2002). Nossos resultados mostraram que 56,0% dos pacientes positivaram um ou dois tubos na hemocultura, enquanto 20,0% tiveram três a quatro tubos positivos e 24,0% deles cinco a sete, indicando que a maioria dos pacientes apresenta baixa parasitemia, como demonstrado por Castro *et al.* (2002). Em um grupo de pacientes na faixa etária de 4 a 20 anos o número de tubos positivos por paciente variou de um a seis e a maioria das hemoculturas foram positivas em 60 dias (FERNANDES *et al.*, 1999). Esses achados reforçam a utilização deste parâmetro para a avaliação da parasitemia nos pacientes chagásicos crônicos sugerindo que mesmo com a realização de uma única hemocultura o número de tubos positivos pode ser um forte indicador da parasitemia.

Outro parâmetro a ser considerado é a positividade em relação ao período de exame das hemoculturas, independente da forma clínica do paciente, a maioria foi positiva entre 30-60 dias. Em relação aos portadores da forma indeterminada a positividade foi comprovada aos 30 e 90 dias, e em pacientes com a forma cardíaca a positividade ocorreu entre 30-45 dias. A positividade da hemocultura na maioria dos pacientes chagásicos crônicos foi demonstrada entre 30-60 dias (FERNANDES *et al.*, 1999; CASTRO, 2002) e divergente de outros autores que encontraram elevada positividade dos pacientes entre 60-120 dias (MORA, 1996). Apesar de não ter sido elevada, observamos hemoculturas positivas após o período de 120 dias. Este tempo prolongado pode estar relacionado à escassa parasitemia dos pacientes e à capacidade de adaptação do parasito e, poderá ocorrer um aumento da positividade do método com a manutenção entre 120-150 dias (GALVÃO, 1990; CASTRO, 2002).

A importância da manutenção da hemocultura por até seis meses tem sido relatada devido ao aumento da positividade em até três vezes quando comparado às hemoculturas mantidas por 60 dias. A proporção de positividade das hemoculturas pode estar relacionada à produção *in vitro* de formas amastigotas não móveis, durante períodos prolongados, até a detecção de formas móveis, pois, em pequena quantidade essas amastigotas podem passar despercebidas (BRENER & CHIARI, 1965; MINTER-GOEDBLOED, 1978). As diferenças nas formas do parasito presente na hemocultura podem estar diretamente relacionadas às

características das cepas, em hemoculturas de alguns pacientes podem ser visualizadas amastigotas não móveis por um período mais longo, outras podem apresentar formas epimastigotas ou formas com padrão intermediário (BRENER & CHIARI, 1965).

A variabilidade na positividade da hemocultura relatada ao longo dos anos pode ser explicada por vários fatores tais como, o aumento do volume de sangue coletado que possibilita a obtenção de formas íntegras do parasito, manutenção das amostras em banho de gelo ou a 4°C logo após a coleta, remoção imediata do plasma, a rapidez no processamento das amostras (CHIARI & BRENER, 1966; CHIARI *et al.*, 1989; GALVÃO *et al.*, 1993), a qualidade dos meios de cultura e a execução do método corretamente (MOURÃO & CHIARI, 1975). Apesar de pouco citado na literatura outro fator extremamente importante a ser considerado é a experiência técnica ao examinar a hemocultura, pois, o *T. cruzi* pode crescer de diferentes formas, com a formação de grumos ou rosáceas ou formas arredondadas (MINTER-GOEDBLOED, 1978; BRENER & CHIARI, 1965).

O kDNA do *T. cruzi* foi detectado pela PCR em praticamente todos pacientes chagásicos crônicos e a expressiva positividade provavelmente esta relacionada a baixa imunidade dos pacientes acima de 50 anos de idade (GINALDI *et al.*, 1999; PRELOG, 2006; WENG *et al.*, 2006; GRAHAM, *et al.*, 2006). A positividade da PCR no sangue de pacientes chagásicos na fase crônica é bastante variável 45-100%, (ÁVILA *et al.*, 1993; JUNQUEIRA *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1998; LAGES-SILVA *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2002; MEIRA *et al.*, 2002; MARCON *et al.*, 2002; MEIRA *et al.*, 2004) e, independente do protocolo empregado, é superior àquela obtida com os métodos de hemocultura e/ou xenodiagnóstico, quando realizados conjuntamente, sendo atualmente indicada como a técnica que pode substituí-los. As diferenças nesta variabilidade podem ser explicadas por níveis de parasitemia variáveis em indivíduos infectados vivendo em diferentes áreas endêmicas e também estar relacionadas com a complexidade do ciclo biológico do *T. cruzi*. Por exemplo, os pacientes chagásicos que vivem em Virgem da Lapa, Minas Gerais, apresentaram elevados níveis de parasitemia baseados em xenodiagnósticos positivos quando comparados com indivíduos de outras áreas (BORGES-PEREIRA *et al.*, 1996). A presença do *T. cruzi* na circulação periférica no determinado momento da coleta de sangue depende do ciclo de vida do parasito assim como, sobre o equilíbrio imunológico entre parasito e hospedeiro (CASTRO & PRATA, 2000) e, o tempo decorrido entre a coleta do sangue e o processamento da amostra (CHIARI *et al.*, 1989; GALVÃO, 1990). O volume de sangue (5mL) coletado

neste trabalho parece não influenciar na positividade da PCR, amostras com o mesmo volume de sangue obtidas de pacientes chagásicos procedentes do triângulo mineiro foram submetidas à PCR e relatada elevada positividade (LAGES-SILVA *et al.*, 2001). Outra hipótese seria a possibilidade da infecção com o *Trypanosoma rangeli*, mas foi excluída uma vez que a infecção por este protozoário foi descrita somente em animais no estado de Minas Gerais (RAMIREZ *et al.*, 2002).

Os estudos realizados em diferentes áreas endêmicas têm sugerido que a diferença genética entre as cepas do parasito pode influenciar a parasitemia no paciente e a positividade da PCR (BRITTO, 2009). Esta positividade pode ainda estar relacionada ao número transiente de formas do parasito circulantes no momento da coleta do sangue, as condições adequadas de conservação das amostras, os procedimentos de extração do DNA, alvos de amplificação, uso do mesmo termociclador, a capacidade de detectar mínimas quantidades do DNA do parasito, (GOMES *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 2002; SCHIJMAN *et al.*, 2011).

A PCR é mais vantajosa que a hemocultura, pois requer a coleta de pequeno volume de sangue, o tempo de processamento mais curto, além de permitir a análise de diversas amostras ao mesmo tempo (CHIARAMONTE *et al.*, 1999). No entanto, não é possível usar a PCR para isolar o *T. cruzi* para posterior estudos biológicos, bioquímicos e/ou moleculares de populações deste protozoário. Neste sentido a hemocultura é um método mais eficiente, especialmente se repetida, para o isolamento e amplificação do parasito em meio de cultura LIT (CASTRO *et al.*, 2002).

Diferentes padrões na intensidade dos fragmentos amplificados pela PCR na região de 330pb foram observados confirmando dados na literatura, mas não tem sido descrita correlação com o número de tripomastigotas no sangue coletado (MOSER *et al.*, 1989; ÁVILA *et al.*, 1993; CASTRO *et al.*, 2002). Dentro deste contexto, avaliamos dois métodos de extração de DNA com o objetivo de aumentar a positividade da PCR, e observamos divergências entre eles, à extração do DNA usando fenol-clorofórmio apresentou resultados superiores a do *kit* comercial *Qiagen*. Entretanto, nossos achados diferiram dos obtidos por Schijman *et al.* (2011) que relataram um melhor desempenho do *kit* comercial ao padronizar a técnica de PCR entre diferentes laboratórios. Por outro lado, Ramirez *et al.* (2009) ao comparar a extração por fenol-clorofórmio e por um *kit* comercial demonstraram maior eficácia pelo primeiro método e relataram que a concentração de DNA obtida por fenol-clorofórmio foi superior a obtida usando o *kit*. Moreira *et al.* (2013) ao comparar os mesmos

métodos de extração de DNA empregados em nosso trabalho demonstram que o fenol-clorofórmio resultou na recuperação de maiores quantidades de DNA.

Devido às características da doença de Chagas na fase crônica, a hemocultura e PCR dificilmente alcançarão uma elevada sensibilidade, pois estão sob a influência de vários fatores intrínsecos dos hospedeiros vertebrados e a heterogeneidade das populações do parasito que circulam nas diferentes regiões endêmicas. Com base nisto, a adequação da PCR para fins diagnósticos na rotina de laboratório é importante na detecção da infecção em pacientes com baixos índices de parasitemia ou ainda naqueles com sorologia inconclusiva (CASTRO *et al.*, 2002; LAGES-SILVA *et al.*, 2006) e, dados recentes demonstraram a padronização e validação desta reação no diagnóstico da doença de Chagas crônica (SCHIJMAN *et al.*, 2011).

O aumento da positividade dos métodos de diagnóstico parasitológico do *T. cruzi* em pacientes chagásicos crônicos tem sido relatado quando comparados à hemocultura e o xenodiagnóstico (CHIARI & BRENER, 1966; CHIARI *et al.*, 1989; BRONFEN *et al.*, 1989; PEREIRA *et al.*, 1989; JUNQUEIRA *et al.*, 1996). Nossos achados demonstraram que a associação da hemocultura e a PCR possibilitou a detecção do *T. cruzi* em praticamente todos os pacientes chagásicos crônicos, reforçando que a associação aumenta a chance de comprovar o parasito e/ou seus fragmentos genômicos, no diagnóstico da doença de Chagas crônica e corroborando dados previamente descritos (LAGES-SILVA *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2002).

A variabilidade genética de 36 isolados do *T. cruzi* obtidos de pacientes na fase crônica da doença de Chagas, sem tratamento prévio e portadores de formas clínicas bem caracterizadas foram analisados por três marcadores genéticos. O perfil genético da maioria dos isolados está associado à DTU II que tem sido relatada como a causa primária da doença de Chagas aguda e crônica severa nas regiões central e da mata atlântica do Brasil. A distribuição geográfica do TcII está relacionada a manifestações cardíacas com concomitantes registros de megaesôfago e megacólon. Esta DTU tem sido frequentemente isolada no ciclo domiciliar de transmissão e é agente etiológico na região do Cone Sul da América do Sul onde o *T. infestans* é o principal vetor doméstico, entretanto a verdadeira dimensão geográfica desta DTU não é amplamente conhecida (MILES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012).

O entendimento da estrutura populacional do *T. cruzi* é fundamental devido aos elos entre os ciclos de transmissão do parasito e doença. A DTU I é a mais abundante e

amplamente dispersa nas Américas encontrada em triatomíneos e humanos (ZINGALES *et al.*, 2012) e, em geral está associada ao ciclo silvestre de transmissão e mamíferos arbóreos. A sua distribuição é ao norte da bacia Amazônica enquanto a DTU II está associada ao ciclo doméstico e ao nicho terrestre (FERNANDES *et al.*, 1998; ZINGALES *et al.*, 1998; YEO *et al.*, 2005; STURM & CAMPBELL, 2010) e aos triatomíneos vetores associados (GAUNT & MILES, 2000) no Brasil e em outros países sul-americanos. A complexidade dos ciclos de transmissão do *T. cruzi* é bastante elevada e ainda não está bem compreendida. Na Bolívia, o megacólon está associado predominantemente com a DTU V e, em escala menor com DTU II (VIRREIRA *et al.*, 2006). Estudos brasileiros têm revelado a presença de TcI-VI com prevalência das DTUs I, III e IV no Norte e Leste da Amazônia (COURA *et al.*, 2002). No sudeste do Brasil, as formas clínicas cardíaca, digestiva com megacólon e megaesôfago da doença de Chagas são associados ao *T. cruzi* II (LAGES-SILVA *et al.*, 2006).

Nossos achados estão de acordo com os da literatura que associa o TcII à infecção humana na área endêmica do estado de Minas Gerais (FREITAS *et al.*, 2005; LAGES-SILVA *et al.*, 2006; D'ÁVILA *et al.*, 2009). A predominância do TcII no coração, esôfago e cólon foi demonstrada com a utilização de uma *hemi-nested* PCR em tempo real diretamente em tecidos de pacientes chagásicos de Minas Gerais (FREITAS *et al.*, 2005). No presente estudo, não observamos associação entre as formas clínicas indeterminada e cardíaca com os fatores genéticos do parasito, corroborando com autores que utilizando os marcadores LSSP-PCR e rDNA 24S $\alpha$  demonstraram a DTU II em todos os isolados dos pacientes com as formas indeterminada, cardíaca, digestiva e mistas, naturais do sudeste de Minas Gerais (LAGES-SILVA *et al.*, 2006). A avaliação de 102 amostras do *T. cruzi* isoladas de 44 pacientes com as formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas, oriundos de Minas Gerais e Goiás, utilizando os marcadores moleculares, 24S $\alpha$ , CO II, SL-IR e análise do polimorfismo de microssatélites evidenciou a DTU II praticamente em todos os isolados sem associação com forma clínica (D'ÁVILA *et al.*, 2009). Uma elevada frequência de TcII foi demonstrada usando os mesmos marcadores em 50% de triatomíneos e 91,7% dos isolados de indivíduos sororreativos no semiárido do Rio Grande do Norte (CÂMARA *et al.*, 2010). Estudos taxonômicos têm como alvo identificar ligações entre as DTUs infectantes e as manifestações clínicas da doença, mas nenhuma evidência de associação tem sido comprovada até o presente. A pesquisa por associações poderá conduzir o critério final para a definição do

número clinicamente significativo de subdivisões biológicas dentro desta espécie (ZINGALES *et al.*, 2012).

Neste trabalho, um isolado obtido de um paciente com a forma clínica indeterminada foi associado à DTU III ou V pelo marcador rDNA 24sα e DTU I por CO II, não havendo um consenso, mas com a tipagem dos genes SL-IRac foi confirmado que corresponde a DTU I. As metodologias aplicadas na caracterização genética de isolados de diferentes formas clínicas podem constituir um fator limitante e a tipagem das populações do *T. cruzi* baseadas na análise de um único marcador se mostra insuficiente, levando a interpretações errôneas (BRISSE *et al.*, 2001). Nossos resultados demonstraram que mesmo a utilização de dois marcadores moleculares podem não ser suficiente, e corroboram com outros autores que também relataram essa ineficiência (D'ÁVILA *et al.*, 2009; CÂMARA *et al.*, 2010). Câmara *et al.* (2010) demonstraram isolados correspondentes ao TcI pela amplificação do domínio D7 do gene 24Sα do DNA ribossomal (rDNA 24Sα). Com a utilização de CO II e SL-IRac estes isolados foram confirmados como TcIII. Ao analisar os fragmentos encontrados pelo rDNA 24Sα, vale ressaltar que os alelos rDNA 1 e 2 em um mesmo isolado não permite diferenciar com segurança se a amostra contém mais de uma população do parasito ou se corresponde a uma cepa híbrida (D'ÁVILA, 2008). A utilização do marcador molecular CO II permite distinguir a DTU I (haplogrupo A) e DTU II (haplogrupo C), todavia, esse marcador agrupa as demais DTUs em um mesmo haplogrupo (B) impossibilitando a classificação (FREITAS *et al.*, 2006). O SL-IRac foi desenvolvido com o objetivo de diferenciar as DTU III e IV da DTU I e das DTUs II, V e VI, inviabilizando o uso desse marcador isoladamente (BURGOS *et al.*, 2007). Com isso, a associação de pelo menos três marcadores genéticos que apresentem diferentes taxas evolutivas poderá garantir a correta tipagem dos isolados do parasito. Dados recentes relataram a DTU I em paciente portador da forma clínica indeterminada procedente do município de Januária, MG (ABOLIS *et al.*, 2011).

Desta forma apesar de pouco relatado, o TcI foi isolado em um dos nossos pacientes, esta DTU se distribui nas Américas e é associada à infecção humana na Amazônia, na região Andina, América Central, México e área endêmica do sudeste e no nordeste do Brasil (BOSSENO *et al.*, 2002; MONTILLA *et al.*, 2002; AÑEZ *et al.*, 2004; HIGO *et al.*, 2004; SÁNCHEZ-GUILLÉN *et al.*, 2006; CÂMARA *et al.*, 2010). Casos agudos graves da doença de Chagas têm sido descritos na região Amazônica e a maioria deles por TcI (COURA, 2007).

As manifestações clínicas do TcI incluem cardiomiopatia chagásica e casos severos em indivíduos imunocomprometidos (ZINGALES *et al.*, 2012).

A caracterização de isolados do *T. cruzi* usando marcadores moleculares têm mostrado que os genótipos envolvidos na infecção humana na Colômbia e na Venezuela são diferentes dos encontrados no ciclo silvestre (GUHL & RAMIREZ, 2011). A associação do TcI tanto no ciclo silvestre quanto no doméstico na Venezuela pode estar ligada a re-invasão dos triatomíneos, devido a população utilizar folhas de palmeiras na cobertura de telhados (MILES *et al.*, 2009). Esta DTU foi identificada em 12 pacientes na fase aguda da infecção chagásica procedentes da mesma área rural de Montalvania, MG (LUQUETTI *et al.*, 1986). Embora a presença da DTU I em pacientes chagásicos crônicos seja rara no Brasil, existem evidências da sua presença em portadores de cardiopatia chagásica crônica (ZINGALES *et al.*, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 2006; SANCHEZ-GUILLEN *et al.*, 2006; HERRERA *et al.*, 2007; MARCILI *et al.*, 2009b; CURA *et al.*, 2012). A morte de pacientes chagásicos com populações do parasito isoladas e caracterizadas como DTU I tem sido relatada em regiões da Venezuela e Brasil, onde casos associados à DTU II são raros. Esses estudos indicam que a patogenia da doença também é uma propriedade inerente das cepas DTU I (STURM & CAMPBELL, 2010). Esses dados enfatizam que os aspectos epidemiológicos do TcI devem ser melhor estudados no Brasil. A diversidade regional da doença de Chagas, a gravidade da doença e a natureza da infecção crônica tem sido atribuída a um conjunto de interações complexas entre a composição genética do parasito, a imunogenética do hospedeiro e os fatores ambientais (CAMPBELL *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2004).

Nossos dados demonstraram que a hemocultura e a PCR foram eficientes com a coleta de apenas uma amostra de sangue e, quando são associados aumentam significativamente à sensibilidade no diagnóstico da doença de Chagas crônica. A PCR se mostrou superior na detecção do parasito, contudo, não é possível utilizá-la no isolamento de amostras do *T. cruzi*, salientando a importância da hemocultura para os estudos biológicos, bioquímicos e de variabilidade genética das populações do parasito. O perfil genético dos isolados do parasito não permitiu estabelecer associação com as formas clínicas dos pacientes chagásicos.



## 6 Conclusões

- ✚ A PCR foi mais eficaz que a hemocultura confirmando a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos crônicos.
- ✚ A positividade da hemocultura foi mais expressiva nos pacientes de faixa etária a partir dos 50 anos e não houve relação com a forma clínica;
- ✚ A positividade mais elevada da hemocultura ocorreu aos 30 e 45 dias nos pacientes portadores da forma cardíaca e aos 90 dias para a maioria daqueles com a forma indeterminada;
- ✚ A positividade de um tubo de hemocultura por paciente foi detectada na maioria dos pacientes chagásicos independente da forma clínica que é portador;
- ✚ A expressiva positividade da PCR parece estar relacionada ao elevado número de pacientes com a forma cardíaca, sugerindo que a parasitemia pode estar mais elevada nos portadores dessa forma clínica;
- ✚ A caracterização genética dos isolados do *Trypanosoma cruzi* demonstrou que a maioria das populações está relacionada ao rDNA tipo 1 e haplogrupo mitocondrial C, associada ao TcII. Apenas uma amostra de paciente com a forma indeterminada foi correspondente a DTU I;
- ✚ O perfil genético dos isolados do *Trypanosoma cruzi* não demonstrou associação com as formas clínicas dos pacientes chagásicos.

## 7 Referências Bibliográficas

- ABOLIS, N. G.; ARAUJO, S. M.; TOLEDO, M. J. O.; FERNANDEZ, M. A.; GOMES, M. L. *Trypanosoma cruzi* I-III in southern Brazil causing individual and mixed infections in human, sylvatic reservoirs and triatomines. *Acta Trop.*, v. 120, p. 167-172, 2011.
- ANDRADE S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Reconcavo Bahiano. *Rev. Patol. Trop.*, v. 3, p. 65-121, 1974.
- ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R. S.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 100, p. 163-172, 1999.
- ANDRADE, S. G. Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 18, p. 39-46, 1985.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 30, p. 27-53, 1997.
- AÑEZ, M.; CRISANTE, G.; SILVA, F. M.; ROJAS, A.; CARRASCO, H.; UMEZAWA, E. S.; STOLF, A. M.; RAMÍREZ, J. L.; TEIXEIRA, M. M. G. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop. Med. Int. Health*, v. 9; p. 1319-1326, 2004.
- ANONYMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, Suppl. II, p. 429-432, 1999.
- ANTAS, P. R. Z.; AZEVEDO, E. N.; LUZ, M. R. M. P.; MEDRANO-MERCADO, N.; CHAVES, A. C. L.; VIDIGAL, P. G.; VOLPINI, A. C.; ROMANHA, A. J.; ARAUJO-JORGE, T. C. A reliable and specific enzyme-linked immunosorbent assay for the capture of IgM from human chagasic sera using fixed epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.*, v. 86, p. 813-820, 2000.
- ARAUJO, F. G. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatid. *Infect. Immun.*, v. 53, 179-185, 1986.
- AVILA, H. A.; BORGES-PEREIRA, J.; THIEMANN, O.; PAIVA, E.; DEGRAVE, W.; MOREL, C. M.; SIMPSON, L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle

DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, p. 2421-2426, 1993.

ÁVILA, H. A.; SIGMAN, D. S.; COHEN, L. M.; MILLIKAN, R. C.; SIMPSON, L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolation from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 40: p. 211-222, 1991.

AVILA, H.; GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M.; SIMPSON, L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 42; p. 175-188, 1990.

BAPTISTA, C. S.; VÊNIO, R. Z. N.; ABDALA, S.; CARRANZA, J. C.; WESTENBERGER, S. J.; SILVA, M. N.; PEREIRA, C. A. B.; GALVÃO, L. M. C.; GONTIJO, E. D.; CHIARI, E.; ZINGALES, B. Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: Maxicircule NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patients isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 150, p. 236-248, 2006.

BARRET, T. V.; HOFF, R. H.; GODFREY, D. G.; TEIXEIRA, R.; SOUZA, J. A. A.; SHERLOCK, I. A. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia state, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 74, p. 84-89, 1980.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr. Mol. Med.*, v. 8, p. 510-518, 2008.

BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A. C. V.; SANTOS, L. C.; CASTRO, J. A. F.; ARAUJO, I. B.; COURA, J. R. Xenodiagnóstico na doença de Chagas crônica. I - Sensibilidade de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 29, p. 341-347, 1996.

BORGES-PEREIRA, J.; WILLCOX, H. P.; COURA, J. R. Morbidade da doença de Chagas. III. Estudo longitudinal de seis anos, em Virgem da Lapa, MG, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 80, p. 63-71, 1985.

BOSSENO, M. F.; BARNABÉ, C.; GASTÉLUM, E. M.; KASTEN, F. L.; RAMSEY, J.; ESPINOZA, B.; BRENIÈRE, F. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p. 627-632, 2002.

BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, supl III, p. 1-29, 2005.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: Morfologia e ciclo evolutivo. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: Uma abordagem Prática para o Clínico Geral. *Rio de Janeiro*: Ed. FIOCRUZ, cap. 2, p. 25-31, 1997.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. *J. Parasitol.*, v. 51, p. 922-926, 1965.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 5, p. 220-224, 1963.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 111, p. 95-105, 2000.

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J. Parasitol.*, v. 31, p. 1218-1226, 2001.

BRITTO C.; CARDOSO, M. A.; RAVEL, C.; SANTORO, A.; BORGES-PEREIRA, J.; COURA, J. R.; MOREL, C. M.; 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.*, v. 81, p. 462-471, 1995b.

BRITTO C.; CARDOSO, M. A.; VANNI, C.M.M.; HASSLOCHER-MORENO, A.; XAVIER, S. S.; OELEMANN, W.; SANTORO, A.; PIMEZ, C.; MOREL, C. M.; WINCKER, P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in blood samples as a tool for diagnosis and treatment evolution. *Parasitol.*, v.110, p.241-247, 1995a.

BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 122-135, 2009.

BRITTO, C.; CARDOSO, A.; SILVEIRA, C.; MACEDO, V.; FERNANDES, O. Polymerase chain reaction (PCR) as a laboratory tool for the evaluation of the parasitological cure in Chagas disease after specific treatment. *Medicina*, v. 59, Supl. II, p. 176-178, 1999.

BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; WINCKER, P.; MOREL, C. M. A simple protocol for cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerize chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 88, p. 171-172, 1993.

BRITTO, C.; SILVEIRA, C.; CARDOSO, M. A.; MARQUES, P.; LUQUETTI, A.; MACEDO, V.; FERNANDES, O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 823-826, 2001.

BRONFEN, E.; ROCHA, F. S. A.; BRANDÃO, G.; MACHADO, N.; PERILLO, M. M.; ROMANHA, A. J.; CHIARI, E. Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 84, p. 237-240, 1989.

BRUMPT, E. Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier de la trypanosomose de Chagas. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, v. 10, p.706-710, 1914.

BURGOS, J. M.; ALTCHER, J.; BISIO, M.; DUFFY, T.; VALADARES, H. M. S.; SEIDENSTEIN, M. E.; PICCINALI, R.; FREITAS, J. M.; LEVIN, M. J.; MACCHI, L.; MACEDO, A. M.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, A. G. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int. J. Parasitol.*, v. 37, p. 1319-1327, 2007.

CABALLERO, Z.; SOUSA, O. E.; MARQUES, W. P.; SAEZ-ALQUEZAR, A.; UMEZAWA, E. S. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 14, p. 1045-1049, 2007.

CASTLE, S. C. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin. Infect. Dis.*, v. 31, p. 578-585, 2000.

CÂMARA, A. C. J.; VARELA-FREIRE, A. A.; VALADARES, H. M. S.; MACEDO, A. M.; D'ÁVILA, D. A.; MACHADO, C. R., LAGES-SILVA, E., CHIARI, E., GALVÃO, L. M. C. Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. *Acta Trop.*, v. 115, p. 205-211, 2010.

CAMPBELL, D. A.; WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr. Mol. Med.*, v. 4, p. 549-562, 2004.

CAMPBELL, D. A.; WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Cur. Mol. Med.*, v. 4, 549-562, 2004.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 331-335, 1999.

CANO, M. I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; CORTÉS, A.; LEVIN, M. J.; GONZÁLEZ, A.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; ZINGALES, B.; RAMIREZ, J. L.; ALONSO, C.; REQUENA, J. M.; FRANCO DA SILVEIRA, J. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 71, p. 273-78 1995.

CARDINAL, M. V.; LAURICELLA, M. A.; CEBALLOS, L. A.; LANATI, L.; MARCET, P. L.; LEVIN, M. J.; KITRON, U.; GURTLER, R. E.; SCHIJMAN, A. G. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int. J. Parasitol.*, v. 38, p. 1533-1543, 2008.

CARNEIRO, M.; CHIARI, E.; GONÇALVES, A. M.; SILVA PEREIRA, A. A.; MOREL, C. M.; ROMANHA, A. J. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop.*, v. 47, p. 35-45, 1990.

CARNEIRO, M.; ROMANHA, A. J.; CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 387-393, 1991.

CASTRO, A. M. Avaliação de métodos laboratoriais para o estabelecimento de critério de cura da doença de Chagas humana. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, MG, 2002 (Tese de doutorado).

CASTRO, A. M.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; RASSI, G. G.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.*, v. 88, n. 10, p. 894-900, 2002.

CASTRO, C. Influência da parasitemia no quadro clínico da doença de Chagas. *Rev. Pat. Trop.*, v. 9, p. 73-136, 1980.

CASTRO C.; PRATA A. Absence of both circadian rhythm and *Trypanosoma cruzi* periodicity with xenodiagnosis in chronic chagasic individuals. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 33, p. 427-430, 2000.

CASTRO, C.; MACÊDO, V.; PRATA, A. Comportamento da parasitemia pelo *Trypanozoma cruzi* em chagásicos crônicos durante 13 anos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 32, p. 157-165, 1999.

CASTRO, C.; PRATA, A.; MACÊDO, V. Influência da parasitemia na evolução da doença de Chagas crônica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, p. 1-6, 2005.

CERISOLA, J. A.; ROHWEDER, R. W.; SEGURA, E. L.; DEL PRADO, C. E.; ALVAREZ, M.; MARTINI, G. J. W. El Xenodiagnostico. Monografia Instituto Nacional de Diagnostico e Investigacion de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatale Chaben". *Buenos Aires*, 1-111, 1974.

CHAGAS, C. Nova Tripanosomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico da nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHAPMAN, M. D.; BAGGALEY, R. C.; GODFREY-FAUSSET, P. F.; MALPAS, T. J.; CANESE, W. G.; MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzymes profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *J. Protozool.*, v. 31, p. 482-486, 1984.

CHIARAMONTE, M. G.; FRANK, F. M.; FURER, G. M.; TARANTO, N. J.; MARGNI, R. A.; MALCHIODI, E. L. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. *Acta Trop.*, v. 72, p. 295 - 308, 1999.

CHIARI, E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 299-300, 1999.

CHIARI, E.; BRENER, Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 8, p. 134-138, 1966.

CHIARI, E.; DIAS, J. C. P. Notas sobre uma nova técnica de hemocultura para diagnóstico na doença de Chagas a sua fase crônica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 9, p. 133-136, 1975.

CHIARI, E.; DIAS, J. C. P.; LANA, M.; CHIARI, C. A. Hemocultures for the parasitological diagnostic of human chronic Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 22, p. 19-23, 1989.

CHIARI E.; GALVÃO, L. M. C. Diagnóstico Parasitológico da doença de Chagas. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: Uma abordagem prática para o clínico geral. Ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, p. 85-98, 1997.

CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; LAGES-SILVA, E. Diagnóstico Parasitológico e Caracterização Biológica, Bioquímica e Genética de Tripanossomas Parasitos do Homem. In: COURA, J. R. Dinâmica das doenças infecciosas e Parasitárias. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 603-620, 2005.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed—A background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA J. R. Evolutive pattern in Chagas' disease and the life span of *Trypanosoma cruzi* in human infection. In: New approaches in American Tripanosomiasis research: Proceedings of an International Symposium, v. 318, p.378-386, 1975.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.*, v. 115, p. 5-13, 2010.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease—100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; ABREU, L. L.; PEREIRA J. B.; WILLCOX, H. Morbidity in Chagas disease. IV. Longitudinal study of 10 years in Pains and Iguatama, Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 80, p. 73-80, 1985.

COURA, J. R.; ANUNZIATO, N.; WILLCOX, H. P. F. Morbidade da doença de Chagas. I Estudo de casos procedentes de vários estados do Brasil, observados no Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 78, p. 363-372, 1983.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J.; ALVES-FILHO, F. I.; CASTRO, J. A.; CUNHA, R. V.; COSTA, W.; JUNQUEIRA, A. C. V. Morbidade da doença de Chagas em áreas do Sertão do Paraíba e da Caatinga do Piauí. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 29, p. 197-205, 1996.



COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A.; MILES, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.*, v. 18, p. 171-176, 2002.

CUMMUNGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 129, p. 53-59, 2003.

CURA, C. I.; LUCERO, R. H.; BISIO, M.; OSHIRO, E.; FORMICHELLI, L. B.; BURGOS, J. M.; LEJONA, S.; BRUSÉS, B. L.; HERNÁNDEZ, D. O.; SEVERINI, G. V.; VELAZQUEZ, E.; DUFFY, T.; ANCHART, E.; LATTES, R.; ALTICHEH, J.; FREILIJ, H.; DIEZ, M.; NAGEL, C.; VIGLIANO, C.; FAVALORO, L.; FAVALORO, R. R.; MERINO, D. E.; SOSA-ESTANI, S.; SCHIJMAN, A. G. *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology*, v. 139, p. 516-521, 2012.

D'ÁVILA, D. A. Avaliação da dinâmica populacional do *Trypanosoma cruzi* durante a fase crônica da doença de Chagas humana. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, MG, 2008 (Tese de doutorado).

D'ÁVILA, D. A.; MACEDO, A. M.; VALADARES, H. M. S.; GONTIJO, E. D.; CASTRO, A. M.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C. Probing Population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J. Clin. Microbiol.*, v. 47, n. 6, p. 1718-1725, 2009.

DEANE, M. P.; SOUZA, M. A.; PEREIRA, N. M.; GONÇALVES, A. M.; MOMEN, H.; MOREL, C. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analysis. *J. Protozool.*, v. 31, p. 276-280, 1984.

DEGRAVE, W.; FRAGOSO, S. P.; BRITTO, C.; VAN HIEUVERSWYN, H.; KIDEANE, G. Z.; CARDOSO, M. A. B.; MUELLER, R. U.; SIMPSON, L.; MOREL, C. M. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 27, p. 63-70, 1988.

DEVERA, R.; ILLARRAMENDI, X.; MONTOYA-ARAUJO, R.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 35, p. 323-330, 2002.

DIAS, J. C. P. Acute Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 79, Suppl., p. 85-91, 1984.

DIAS, J. C. P. Natural history of Chagas' disease. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 65, p. 359-366, 1995.

DIEZ, M.; FAVALORO, L.; BERTOLOTTI, A.; BURGOS, J. M.; VIGLIANO, C.; LASTRA, M. P.; LEVIN, M. J.; ARNEDO, A.; NAGEL, C.; SCHIJMAN, A. G.; FAVALORO, R. R. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. *Am. J. Transplant.*, v. 7, p. 1633-1640, 2007.

DUFFY, T.; BISIO, M.; ALTCHER, J.; BURGOS, J. M.; DIEZ, M.; LEVIN, M. J.; FAVALORO, R. R.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, A. G. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *Plos Neg. Trop. Dis.*, v. 3, p. 1-10, 2009.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v. 309, p. 409-415, 2005.

FERNANDES, O.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; PINHO, A. P.; MOREL, C. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; JANSEN, A. M. 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. *Parasitology*, v. 118, p. 161-166, 1999.

FERNANDES, O.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; BORGES-PEREIRA, J.; FERNANDES, N. C.; JUNQUEIRA, A. C. V.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 56, p. 807-811, 1998.

FLORES-CHAVES, M.; FUENTES, I.; GÁRATE, T.; CAÑAVATE, C. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v. 3, p. 29-37, 2006.

FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V. F.; TEIXEIRA, S. M.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A. C.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D. J. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.*, 2: e24 p. 226-235, 2006.

FREITAS, J. M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int. J. Parasitol.*, v. 35, p. 411-417, 2005.

GALVÃO, L. M. C. Contribuição ao critério de cura da doença de Chagas humana, após tratamento específico através de testes sorológicos e parasitológicos. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, MG, 1990 (Tese de doutorado).

GALVÃO, L. M. C.; CHIARI, E.; MACEDO, A. M.; LUQUETTI, A. O.; SILVA, S. A.; ANDRADE, A. L. S. S. PCR Assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, p. 5066-5070, 2003.

GALVÃO, L. M. C.; NUNES, R. M. B.; CANÇADO, J. R.; BRENER, Z.; KRETTLI, A. R. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 87, 220-223, 1993.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomines bugs (Triatominae) and their associated trypanosomaes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 557-565, 2000.

GINALDI, L.; DE MARTINIS, M.; D'OSTILIO, A.; MARINI, L.; LORETO, M. F.; QUAGLINO, D. The immune system in the elderly. *Immunol. Res.*, v. 20, p. 117-126, 1999.

- GOMES, M. L.; GALVÃO, L. M. C.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J.; CHIARI, E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic molecular, and serologic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 60, p. 205-210, 1999.
- GOMES, M. L.; MACEDO, A. M.; VAGO, A. R.; PENA, S. D. J, GALVÃO, L. M. C.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp. Parasitol.*, v. 88, p. 28-33, 1998.
- GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 115-121, 2009.
- GRAHAM, J. E.; CHRISTIAN, L. M.; KIECOLT-GLASER, K. Stress, age and immune function: toward a lifespan approach. *J. Behav. Med.*, v. 29, n. 4, p. 389-400, 2006.
- GUHL, F; RAMIREZ, J. D. *Trypanosoma cruzi* I diversity: towards the need of genetic subdivision? *Acta Trop.*, v. 119, p. 1-4, 2011.
- HERRERA, C.; BARGUES, M. D.; FAJARDO, A.; MONTILLA, M.; TRIANA, O.; VALLEJO, G. A.; GUHL, F. Identify four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect. Genet. Evol.*, v. 7, p. 535-539, 2007.
- HIGO, H.; MIURA, S.; HORIO, M.; MIMORI, T.; HAMANO, S.; AGATSUMA, T.; YANAGI, T.; CRUZ-REYES, A.; UYEMA, N.; ARIAS, A. R.; MATA, V.; AKAHANE, H.; HIRAYAMA, K.; TAKEUCHI, T.; TADA, I.; HIMENO, K. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitol. Int.*, v. 53, p. 337-344, 2004.
- JUNQUEIRA, A. C. V., CHIARI, E., WINCKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of northeastern Brazil. *Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg.*, v. 90, p. 129-132, 1996.
- JUNQUEIRA, A. C. V.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends Parasitol.*, v. 21, p. 270-272, 2005.
- KIERSZENBAUM, F. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. *Acta Parasitol.*, v. 52, p. 1-12, 2007.

KRETTLI, A. U. The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 142-151, 2009.

KRETTLI, A. U.; CANÇADO, J. R.; BRENER, Z. Criterion of cure of human Chagas' disease after specific chemotherapy: recent advances. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 79, p. 157-164, 1984.

LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L. E.; PEDROSA, A. L.; CREMA, E.; GALVÃO, L. M. C.; PENA, S. D. J. 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.*, v. 44, p. 2167-2171, 2006.

LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L. E.; SILVA-VERGARA, M. L.; CHIARI, E. Chagasic Meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: diagnosis, follow-up, and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Infect. Dis.*, v. 34, p. 118-123, 2002.

LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIREZ, L. E.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D.; CHIARI, E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.65, n. 5, p.435-441, 2001.

LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NOBREGA, G.; MIRANDA, A. Chagas' disease: a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*, v. 14: p. 1035-1060, 1956.

LUQUETTI, A. O.; SCHMUNIS, G. A. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. In: American Trypanosomiasis Chagas Disease: one hundred years of research. TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. *Elsevier Insights*, p. 743-780, 2010.

LUQUETTI, A. O.; DIAS, J. C. P.; PRATA, A. Diagnostico y tratamiento de La infección congénita por *T. cruzi* en Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, n. II, p. 27-28, 2005.

LUQUETTI, A. Q.; MILES, M. A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M.; SOUZA, A. A.; POVOA, M. M.; RODRIGUES, I. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 80, p. 462-470, 1986.

MACÊDO, V. Forma Indeterminada da Doença de Chagas. In DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: Uma abordagem prática para o clínico geral. Ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, p. 135-152, 1997.

- MACÊDO, V. Indeterminate form of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 311-316, 1999.
- MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas' disease. *Parasitol. Today*, v. 14, p. 119-124, 1998.
- MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 1-12, 2004.
- MACEDO, A. M.; MARTINS, M. S.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 55, p. 147-154, 1992.
- MANOEL-CAETANO, F. S.; SILVA, A. E. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad. Saude Publ.*, v. 23, p. 2263-2274, 2007.
- MARCILI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; BATISTA, J. S.; JUNQUEIRA, A. C. V.; SOUZA, A. I.; ROSA, J.; CAMPANER, M.; LEWIS, M. D.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIc: New hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect. Genet. Evol.*, v. 9, p. 1265-1274, 2009a.
- MARCILI, A., VALENTE, V. C., VALENTE, S. A., JUNQUEIRA, A. C., DA SILVA, F. M., PINTO, A. Y., NAIFF, R. D., CAMPANER, M., COURA, J. R., CAMARGO, E. P., MILES, M. A., TEIXEIRA, M. M. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol.*, v. 39, p. 615-623, 2009b.
- MARCON, G. E. B.; ANDRADE, P. D.; ALBUQUERQUE, D. M.; WANDERLEY, P. D.; ALMEIDA, E. A.; GUARIENTO, M. E.; COSTA, S. C. B. Use of 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.*, v. 43, p. 39-43, 2002.
- MEIRA, W. S. F.; GALVÃO, L. M. C.; GONTIJO, E. D.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; NORRIS, K. A.; CHIARI, E. Use of the *Trypanosoma cruzi* recombinant complement

regulatory protein to evaluate therapeutic efficacy following treatment of chronic chagasic patients. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, 707-712, 2004.

MEIRA, W. S.; GALVÃO, L. M. C.; GONTIJO, E. D.; MACHADO-COELHO, G. L.; NORRIS, K. A.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 10, p. 3735-40, 2002.

MELLO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.*, v. 64, p. 475-482, 1978.

MILES, M. A.; LLEWELLYN, M. S.; LEWIS, M. D.; YEO, M.; BALEELA, R.; FITZPATRICK, S.; GAUNT, M. W.; MAURICIO, I. L. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*, v. 136, p. 1509-1528, 2009.

MILES, M.; CEDILLOS, R.; POVOA, M.; DE SOUZA, A.; PRATA, A.; MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? *The Lancet*, v. 317, p. 1338-1340, 1981.

MILES, M. A.; SOUZA, S. M.; POVOA, A. A. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 74, p. 221-237, 1980.

MILES, M. A.; TOYE, P. J.; OSWALDO, S. C.; GODFREY, D. C. 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.*, v. 71, p. 217-225, 1977.

MINTER-GOEDBLOED, E. Hemoculture compared with xenodiagnosis for the detection of *Trypanosoma cruzi* infection in man and in animal. In: New approaches in American Tripanosomiasis research: Proceedings of an International Symposium, v. 318, p.245-249, 1975.

MINTER-GOEDBLOED, E. The primary isolation by haemoculture of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* from animals and from man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 72, p. 22-30, 1978.

MINTER-GOEDBLOED, E.; MINTER, D. M.; MARSHALL, T. F. C. Quantitative comparison between xenodiagnosis and harmoculture in the detection of *Trypanosoma*

(*Schizotrypanum*) *cruzi* in experimental and natural chronic infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.72, 217-225, 1978.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease I Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 17-30, 2009.

MONTILLA, M. M.; GUHL, F.; JARAMILLO, C.; NICHOLLS, S.; BARNABE, C.; BOSSENO, M. F.; BRENIERE. Isoenzyme clustering of *Trypanosomatidae* colombian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 66, p. 394-400, 2002.

MORA, M. X. C. Avaliação de uma técnica modificada de hemocultura para *T. cruzi*, na forma crônica da doença de Chagas em uma área endêmica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 29, p. 515-516, 1996.

MOREIRA, O. C.; RAMÍREZ, J. D.; VELÁZQUEZ, E.; MELO, M. F. A. D.; LIMA-FERREIRA, C.; GUHL, F.; SOSA-ESTANI, S.; MARIN-NETO, J. A.; MORILLO, C. A.; BRITTO, C. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop.*, v. 125, p. 23-31, 2013.

MOREL, C. M.; DEANE, M. P.; GONÇALVES, A. M. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol. Today*, v. 2, p. 97-101, 1986.

MOREL, C.; CHIARI, E.; PLESSMAN C. E.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; 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*, v. 77, p. 6810-6814, 1980.

MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, p. 1477-1482, 1989.

MOURÃO, O. G.; CHIARI, E. Comprovação parasitológica na fase crônica da doença de Chagas por hemoculturas seriadas em meio LIT. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 5, p.215-219, 1975.

MOURÃO, O. G.; MELLO, O. C. Hemoculturas para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 9, p. 183-188, 1975.



MULLINS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, v. 155, p. 225-350, 1987.

MURCIA, L.; CARRILERO, B.; MUÑOZ, M. J.; IBORRA, M. A.; SEGOVIA, M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 65, p. 1759-1764, 2010.

OPAS-Organizacion Panamericana de la Salud. Estimacion cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Americas. Montevideo, Uruguay: *Organizacion Panamericana de la Salud*, 2006 (in Spanish).

PACHECO, R. S.; BRITO, C. M. M. Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: Heterogeneity versus plasticity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 199-201, 1999.

PEREIRA, V. L.; LEVY, A. M. A.; BOAINAIN, E. Xenodiagnóstico, Hemocultura e teste de lise mediada pelo complemento como critérios de seleção de pacientes chagásicos crônicos para quimioterapia. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 5, p. 301-307, 1989.

PIFANO, C. F. El diagnostico parasitologico de la enfermedad de Chagas cronica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnostico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. *Arch. Venez. Patol. Parasitol. Med.*, v. 21, p. 20-55, 1977.

PIRON, M.; FISA, R.; CASAMITJANA, N.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; PUIG, L.; VERGÉS, M.; GASCÓN, J.; PRAT, J. G.; PORTÚS, M.; SAULEDA, S. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.*, v. 103, p. 195-200, 2007.

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

PRELOG, M. Aging of the immune system: A risk factor for autoimmunity? *Autoimmun. Rev.*, v. 5, n. 2, p. 136-139, 2006.

RAMIREZ, L. E.; LAGES-SILVA, E.; ALVARENGA-FRANCO, F.; MATOS, A.; VARGAS, N.; FERNANDES, O.; ZINGALES, B. High prevalence of *Trypanosoma rangeli*

and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta Trop.*, v. 84, p. 189-198, 2002.

RASSI Jr, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RIBEIRO, A. L. P.; ROCHA, M. O. C. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 31, p. 301-314, 1998.

ROCHA, M. O.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M.M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci*, v. 8, p. 44-54, 2003.

ROMANHA, A. J. Heterogeneidade Enzimática em *Trypanosoma cruzi*. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, MG, 1982 (Tese de doutorado).

ROMANHA, A. J.; PEREIRA, A. A. S.; CHIARI, E.; KILGOUR, V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 62, p. 139-142, 1979.

ROTTENBERG, M. E.; SPORRONG, L.; PERSSON I.; WIGZELL H.; ORN, A. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. *Scand. J. Immunol.*, v.41, p. 164-170, 1995.

RUSSOMANDO, G.; FIGUEIRO, A.; ALMIRON, M.; SAKAMOTO, M.; MORITA, K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, p. 2864-2868, 1992.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SANCHEZ-GUILLEN, M. C.; BERNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; ZAVALA-CASTRO, J.; TOTOLHUA, J. L.; MÉNDEZ-LOPEZ, J.; GONZÁLEZ-MEJÍA, M. E.; TORRES-RASGADO, E.; LÓPEZ-COLOMBO, A.; PÉREZ-FUENTES, R. *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 585-590, 2006.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.*, v. 90, p. 655-656, 1993.

SCHENONE, H. Xenodiagnosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 289-294, 1999.

SCHIJMAN, A. G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; JARAMILLO, A. M. M.; CURA, C. AUTER, F.; VERON, V.; QVARNSTROM, Y.; DEBORGGRAEVE, S.; HIJAR, G.; ZULANTAY, I.; LUCERO, R. H.; VELAZQUEZ, E.; TELLEZ, T.; LEON, Z. S.; GALVÃO, L.; NOLDER, D.; RUMI, M. M.; LEVI, J. E.; RAMIRES, J. D.; ZORRILLA, P.; FLORES, M.; JERCIC, M. I.; CRISANTE, G.; AÑEZ, N.; CASTRO, A. M. De; GONZALES, C. I.; VIANA, K. A.; YACHELINI, P.; TORRICO, F.; ROBELLO, C.; DIOSQUE, P.; CHAVEZ, O. T.; AZNAR, C.; RUSSOMANDO, G.; BUSCHER, P.; ASSAL, A.; GUHL, F.; ESTANI, S. S.; DaSILVA, A.; BRITTO, C.; LUQUETTI, A.; LADZINS, L. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 5, p. 1-10, 2011.

SCHIJMAN, A. G.; VIGLIANO, C.; BURGOS, J.; FAVALORO, R.; PERRONE, S.; LAGUENS, R.; LEVIN, M. J. L. Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. *J. Heart Lung Transplant.*, v. 19, 1115-1117, 2000.

SILVA, I. G.; SILVA, H. H. G.; LUQUETTI, A. O.; REZENDE, J. M. Positividade do xenodiagnóstico de acordo com a faixa etária, o sexo e a forma clínica da doença de Chagas. *Rev. Pat. Trop.*, v. 24, p. 193-197, 1995.

SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens of serological diagnosis. *Trends Parasitology*, v. 17, p. 286-291, 2001.

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

SIMPSON, L.; SILVA, A. Isolation and characterization of kinetoplast DNA from *Leishmania tarentolae*. *J. Mol. Biol.*, v. 56, p. 443-473, 1971.

SOLARI, A. S.; ORTÍZ, S.; SOTO, A.; ARANCIBIA, C.; CAMPILLAY, R.; CONTRERAS, M.; SALINAS, P.; ROJAS, A.; SCHENONE, H. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected

children with nifurtimox a 3 year follow-up by PCR. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 48, p. 515-519, 2001.

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

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 83, p. 141-152, 1996.

SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 89-100, 2009.

STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; PEDROSO, A.; ZINGALES, B. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 126, p. 73-80, 2003.

STUART, K.; FEAGIN, J. E. Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int. Rev. Citol.*, v. 141, p. 65-68, 1992.

STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.*, v. 115, p. 35-43, 2010.

STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 33, p. 205-214, 1989.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol. Today*, v. 15, p. 94-99, 1999.

TEIXEIRA, A. R. L.; HECHT, M. M.; GUIMARO, M. C.; SOUSA, A. O.; NITZ, N. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite persistence and autoimmunity. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 24, p. 592-630, 2011.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p.463-491, 2006.

TEIXEIRA, M. G.; SILVA, F. M.; MARCILI, A.; UMEZAWA, E. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CUNHA-NETO, E.; KALIL, J.; STOLF, N.; STOLF, A. M. S. Short

communication: *Trypanosoma cruzi* lineage I in endomyocardial biopsy from a north-eastern Brazilian patient at end-stage chronic chagasic cardiomyopathy. *Trop. Med. Int. Health*, v. 3, p. 294-298, 2006.

TIBAYRENC, M. Beyond strain typing and molecular epidemiology: Integrated genetic epidemiology of infectious diseases. *Parasitol. Today*, v. 14, p. 323-329, 1998.

TIBAYRENC, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol. Dis.*, v. 2, p. 1-6, 2003.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Evolutionary genetics of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Microbes Infect.*, v. 1, p. 465-472, 1999.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 83, p. 115-119, 1986.

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; REIS, D. D.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; TOSTES JR, S.; MOREIRA, M. C. V.; FILHO, G. B.; PENA, S. D. J. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. *Am. J. Pathol.*, v. 156, p. 1806-1809, 2000.

VIRREIRA, M., SERRANO, G., MALDONADO, L., SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub) lineages in megacolon samples from bolivian patients. *Acta Trop.*, v. 100, p. 252-255, 2006.

WENG, N. P. Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? *Immunity*, v. 24, n. 5, p. 495-499, 2006.

WESTENBERGER, S. J.; CERQUEIRA, G. C.; EL-SAYED, N. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and possess a conserved element in the non-coding region. *BMC Genomics*, v. 7, p. 60, 2006.

WINCKER, P.; BRITTO, C.; BORGES-PEREIRA, J.; CARDOSO, M. A.; OELEMANN, W.; MOREL, C. M. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples patients in a rural endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 51, p. 771-777, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *WHO Technical Reports Series*, p. 1-116, 2012.

World Health Organization. World Health Report. Control of Chagas Disease. *Technical Report Series*, p. 1-120, 2002.

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SÁNCHEZ, H; ADAMSON, S.; MILES, G. A. J.; LÓPEZ, E.; GONZÁLEZ, N.; PATTERSON, J. S.; GAUNT, M. W.; ARIAS, A. R.; MILES, M. A. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int. J. Parasitol.*, v. 35, p. 225-233, 2005.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M. G.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C. R.; ANDRADE, S. G.; STURM, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.*, v.12, p. 240-253, 2012.

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

ZINGALES, B.; STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M. R. S. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 159-164, 1999.

ZULANTAY, I.; APT, W.; VALENCIA, C.; TORRES, A.; SAAVEDRA, M.; RODRÍGUEZ, J.; SANDOVAL, L.; MARTÍNEZ, G.; THIEME, P.; SEPÚLVEDA, E. Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 10.1093, p. 1-3, 2011.

ZULANTAY, I.; HONORES, P.; SOLARI, A.; APT, W.; ORTIZ, S.; OSUNA, A.; ROJAS, A.; LÓPEZ, B.; SÁNCHEZ, G. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization

assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with intraconazole or allopurinol. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 48, p. 253-257, 2004.

## **8 Anexo**

**8.1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG**

**8.2 Carta de aprovação do Hospital das Clínicas da UFMG**

**8.3 Termo de consentimento livre e esclarecido submetido aos pacientes participantes do estudo**

**8.4 Protocolo de hemoculturas dos pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca, representando níveis diferentes parasitemia e quadros demonstrando a positividade em relação ao número de tubos e ao período de exame**





**Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas**

**Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão**

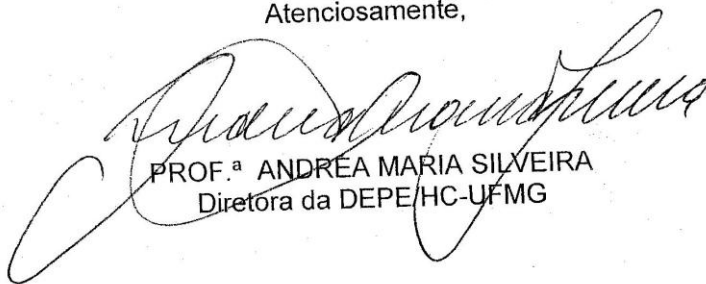
Belo Horizonte, 28 de março de 2012.

**PROCESSO: Nº 012/12 "CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DO TRYPANOSOMA CRUZI RECÉM ISOLADAS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS PORTADORES DE DIERENTES FORMAS CLÍNICAS"**

SR(A) PESQUISADOR(A):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 08/02/2012, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE **relatório** parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,



PROF.ª ANDREA MARIA SILVEIRA  
Diretora da DEPE/HC-UFMG

Ao Sr.  
Prof. Egler Chiari  
Dpto. Parasitologia  
Instituto de Ciências Biológicas- UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais

Hospital das Clínicas

Parecer da Unidade Funcional de Clínica Médica

Comissão de análise de Projetos de Pesquisa, Ensino,  
Extensão e Especialização

**Nome do Projeto:** CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DO *Trypanosoma cruzi* RECÊM-ISOLADAS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS PORTADORES DE DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS.

**Local:** Unidade Funcional Clínica Médica – Serviço Especial de Diagnóstico e Tratamento de DIP- Doenças Infecciosas e Parasitárias – Ambulatório Orestes Diniz - Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

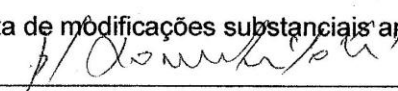
**Autores:** Egler Chiari e colaboradores.

**Descrição breve do projeto:** O projeto tem como objetivo avaliar o perfil genético de populações do *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma indeterminada e cardíaca. Os resultados dos testes genéticos serão confrontados com os dados clínicos dos hospedeiros. Os sujeitos incluídos terão 02 amostras de sangue coletadas (5ml e 30ml) para realização de PCR e hemocultura em laboratório do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG). A coleta de sangue será realizada na sala de procedimentos do próprio ambulatório CTR-Orestes Diniz por profissional habilitado. Os recursos financeiros necessários para custear os procedimentos serão obtidos junto a agências de fomento de pesquisa.

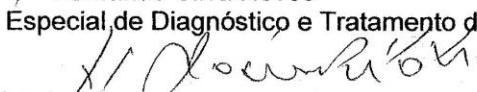
**Sugestões/esclarecimentos:** Trata-se de projeto exequível e meritório não implicando em despesas extras para instituição.

**Conclusão:**

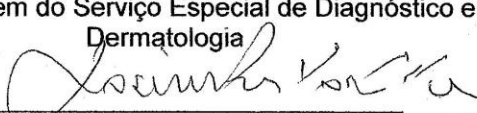
1. Aprovado sem ressalvas (X). Poderá ser iniciado imediatamente.
2. Aprovado com ressalvas ( ). Poderá ser iniciado, mas os esclarecimentos deverão ser encaminhados para UFCLM, no máximo em uma semana para aprovação definitiva, sob pena de não aprovação.
3. Não aprovado ( ). Necessita de modificações substanciais antes de ser iniciado.

  
Fernando Silva Neves

Coordenação do Serviço Especial de Diagnóstico e Tratamento de Psiquiatria

  
Vera Lúcia de Araújo Nogueira Lima

Coordenação de enfermagem do Serviço Especial de Diagnóstico e Tratamento de Dermatologia

  
José Roberto Siqueira Castro – Gerência da Unidade Funcional Clínica Médica  
Belo Horizonte, 30 de janeiro de 2012.

José Roberto Siqueira Castro  
Insc. 10440X CRM: 11260  
Gerente da Unidade Funcional  
Clínica Médica - HC/UFMG

José Roberto Siqueira Castro  
Insc. 10440X CRM: 11260  
Gerente da Unidade Funcional  
Clínica Médica - HC/UFMG

José Roberto Siqueira Castro  
Insc. 10440X CRM: 11260  
Gerente da Unidade Funcional  
Clínica Médica - HC/UFMG

## TERMO DE CONSENTIMENTO

Fui convidado a participar do estudo que tem o título “Caracterização molecular de amostras do *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos portadores de diferentes formas clínicas” que tem como objetivo avaliar se existe relação entre as características do parasito e os grupos de pacientes chagásicos sem evidências de comprometimento cardíaco (forma indeterminada) ou com alteração cardíaca. Recebi informações que os dados obtidos poderão contribuir para o melhor entendimento da possível relação das características do parasito e do humano.

Fui informado (a) que, para realizar este projeto, será utilizado, apenas sangue de pacientes com a doença de Chagas e que a pesquisa será realizada em laboratório, sem a participação direta dos pacientes envolvidos.

A minha participação será voluntária e está relacionada somente à doação de amostras de sangue. Estou consciente de que a minha participação como voluntário (a) não me dará qualquer benefício ou privilégio, seja financeiro ou no tratamento (se for o caso). Concordo em ceder uma amostra de sangue (35mL), que será colhida em tubos estéreis à vácuo com apenas um único acesso ao vaso sanguíneo, para a realização do trabalho de pesquisa. Fui informado (a) sobre os possíveis riscos associados com a coleta de sangue, como, a formação de um pequeno hematoma no local da coleta de sangue, por meio de tubos a vácuo, que este acontecimento é pouco freqüente e não trará problemas clínicos importantes.

Fui informado (a) ainda que, não devo esperar resultados imediatos e nem pessoais e, que a qualquer momento poderei desistir de participar do projeto de pesquisa por qualquer motivo, sem que isto acarrete prejuízo ao prosseguimento de meu acompanhamento médico.

Em caso de qualquer dúvida, sei que poderei consultar o Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) ou aos pesquisadores no projeto referidos abaixo:

Prof. Dr. Manoel Otávio Costa Rocha

Telefone: 9977-6773

Prof. Dr. Egler Chiari

Telefone: 3409-2847

Profa. Dra. Lúcia Maria da Cunha Galvão

Telefone: 3409-2968

Fabiana Caroline Zempulski Volpato

Telefone: 9392-3781

Comitê de Ética da UFMG- Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – Sala 2005 – Cep: 31270-901 BH – MG – e-mail: [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br) Telefone: 3409-4592

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Egler Chiari

\_\_\_\_\_  
Fabiana Volpato

### Hemocultura

Nº do Prontuário:

Nº Amostra:009

Nome do Paciente: H.J.P.

Sexo: Masculino

Idade/DN: 15/05/1953

Naturalidade: Prosperpi - MG

Forma da Clínica: **Indeterminada**

Período do exame (dias)	Tubo SB	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
30 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
45 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
60 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
90 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<b>Pos.</b>	Neg.
120 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Neg.

Neg. = Negativo

Pos. = Positivo

### Hemocultura

Nº do Prontuário:

Nº Amostra: 016

Nome do Paciente: A.S.S.C

Sexo: Feminino

Idade/DN: 15/08/1965

Naturalidade: Francisco Sá - MG

Forma da Clínica: **Cardiopatia Chagásica Crônica 4**

Período do exame (dias)	Tubo SB	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
30 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
45 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
60 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	<b>Pos.</b>	Neg.
90 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Neg.
120 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Neg.

Neg. = Negativo

Pos. = Positivo

**Hemocultura**

Nº do Prontuário:

Nº Amostra: 017

Nome do Paciente: M.A.C.  
Sexo: Feminino

Idade/DN: 03/08/1953

Naturalidade: Virgem da Lapa - MG

Forma da Clínica: **Cardiopatia Chagásica Crônica 1**

Período do exame (dias)	Tubo SB	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
30 dias	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
45 dias	Neg.			Neg.			Neg.
60 dias	Neg.			Neg.			Pos.
90 dias	Neg.			Neg.			
120 dias	Neg.			Neg.			

Neg. = Negativo

Pos. = Positivo

### Hemocultura

Nº do Prontuário:

Nº Amostra: 046

Nome do Paciente: F.S.S.

Sexo: Masculino

Idade/DN: 20/08/1950

Naturalidade: Minas Novas - MG

Forma da Clínica: **Cardiopatia Chagásica Crônica 5**

Período do exame (dias)	Tubo SB	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
30 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
45 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.
60 dias	Neg.	Neg.	Neg.		Neg.	Pos.	Pos.
90 dias	Neg.	Neg.	Neg.		Neg.		
120 dias	Pos.	Neg.	Neg.		Neg.		

Neg. = Negativo

Pos. = Positivo

**Hemocultura**

Nº do Prontuário:

Nº Amostra: 048

Nome do Paciente: F.A.P.

Sexo: Feminino

Idade/DN: 20/11/1973

Naturalidade: Gorotuba - MG

Forma da Clínica: **Indeterminada**

Período do exame (dias)	Tubo SB	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
30 dias	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
45 dias		Pos.				Pos.	Pos.
60 dias							
90 dias							
120 dias							

Neg. = Negativo

Pos. = Positivo



### Hemocultura

Nº do Prontuário:

Nº Amostra: 065

Nome do Paciente: M.R.C.

Sexo: Feminino

Idade/DN: 10/09/1958

Naturalidade: Itapanhoacanga - MG

Forma da Clínica: **Cardiopatia Chagásica Crônica 4**

Período do exame (dias)	Tubo SB	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
30 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
45 dias	<b>Pos.</b>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
60 dias		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
90 dias		Neg	<b>Pos.</b>	<b>Pos.</b>	<b>Pos.</b>	<b>Pos.</b>	<b>Pos.</b>
120 dias		Neg					

Neg. = Negativo

Pos. = Positivo

### Hemocultura

Nº do Prontuário:

Nº Amostra: 067

Nome do Paciente: M.H.M.N.

Sexo: Feminino

Idade/DN: 08/10/1941

Naturalidade: Gorotuba - MG

Forma da Clínica: **Indeterminada**

Período do exame (dias)	Tubo SB	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
30 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
45 dias	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
60 dias	Neg.	<b>Pos.</b>	<b>Pos.</b>	Neg.	Neg.	Neg.
90 dias	Neg.			Neg.	Neg.	Neg.
120 dias	Neg.			Neg.	Neg.	Neg.

Neg. = Negativo

Pos. = Positivo