

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

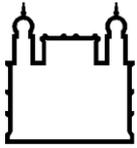
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DA CARGA
PARASITÁRIA DE AMOSTRAS DE INSETOS TRIATOMÍNEOS INFECTADOS
POR *Trypanosoma cruzi*

PAULA FINAMORE ARAUJO

RIO DE JANEIRO – BRASIL

2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Paula Finamore Araujo

Aplicação de Técnicas Moleculares para Avaliação da Carga Parasitária de Amostras de Insetos Triatomíneos Infectados por *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Dr. Otacilio da Cruz Moreira
Dra. Constança Felícia De Paoli de Carvalho Brito

RIO DE JANEIRO

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

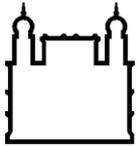
A663 Araujo, Paula Finamore

Aplicação de técnicas moleculares para avaliação da carga parasitária de amostras de insetos Triatomíneos infectados por *Trypanosoma cruzi* / Paula Finamore Araujo. – Rio de Janeiro, 2016.
xvi, 77 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.
Bibliografia: f. 59-77

1. Doença de Chagas. 2. *Rhodnius prolixus*. 3. *Trypanosoma cruzi*.
4. qPCR. 5. RT-qPCR. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: PAULA FINAMORE ARAUJO

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DA CARGA
PARASITÁRIA DE AMOSTRAS DE INSETOS TRIATOMÍNEOS INFECTADOS
POR *Trypanosoma cruzi*

ORIENTADOR (ES): DR. OTACILIO DA CRUZ MOREIRA
DRA. CONSTANÇA FELÍCIA DE PAOLI DE CARVALHO BRITO

Aprovada em: ___/___/___

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Rafaela Vieira Bruno - Presidente

Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez

Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque

Prof. Dr. Suzete Araujo Oliveira Gomes (Suplente)

Prof. Dr. Mariana Caldas Waghabi (Suplente)

Prof. Dr. Peter Josef Waniek (Revisor)

Rio de Janeiro, 11 de julho de 2016

À minha família. Meus eternos mestres.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dr. Otacilio, pela preciosa orientação, pela disposição e por compartilhar ensinamentos que vão além dos adquiridos ao longo do mestrado. E à Dra. Constança, pela preocupação, carinho e também dedicação com o projeto. Obrigada por contribuírem, com tanta dedicação, em meu crescimento profissional desde a minha iniciação científica.

Aos membros que compõem a banca de avaliação, Dra. Rafaela Bruno, Dr. Marcelo Gonzalez, Dr. André Roque, Dra. Suzete Gomes e Dra. Mariana Waghbi. Ao Dr. Peter Waniek, especialmente por toda atenção em revisar esta dissertação.

À Dra Patricia Azambuja pela colaboração e suporte. Às Dras. Daniele Castro e Cecília Stahl pela colaboração, pela ajuda incansável acompanhada de estimados conselhos e, principalmente, pela amizade. Aos colegas do LABFISI pela disposição ao me receberem, especialmente à Kate, que me recebeu tão bem e me ajudou tantas vezes. À Dra. Catarina Araújo pela atenção e toda ajuda prestada neste projeto.

Aos colegas do LABIMDOE, pela convivência incrível ao longo da minha formação. Eu aprendo muito com vocês. Aos amigos do laboratório, Myllena, Hanna, Geovane, Ronald, Leticia, Camila e Raquel, pelos risos e conversas que sempre amenizaram o tom de sobriedade do trabalho, pela ajuda e pelos conselhos diários. Aos amigos da pós-graduação, especialmente ao Fabricio, Alan e Ícaro, pelo companheirismo e amparo, principalmente nas horas do sufoco.

À toda equipe do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular à CAPES, CNPq, FAPERJ, por tornar tudo isso possível.

Agradeço principalmente aos meus pais, Beatriz e Enio pelo carinho, pelo apoio e amor incondicional. Por fazerem de mim, o que sou hoje. Sem vocês, nada disso faria sentido.

Aos meus irmãos maravilhosos, Patty e Ivan. Muitíssimo obrigada por ouvirem meus desabafos e por compartilharem algumas de suas vivências com a caçula. Aos meus cunhados Wellington e Lais, pela amizade, risadas e apoio

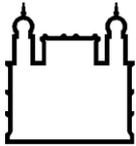
Ao meu namorado, José, por sempre estar ao meu lado, mesmo em momentos complicados. Obrigada pelas palavras de incentivo e carinho e por acreditar no meu potencial!

À toda minha família, grande não só no tamanho, mas também no coração. Obrigada por me concederem assistência nesse caminho que estou trilhando, por tornarem os altos e baixos da vida mais fáceis de lidar. Especialmente agradeço a Helena, minha prima quase-irmã, obrigada por tudo, pelas risadas, pelas broncas e pelos conselhos, desde sempre e para sempre. E ao meu primo e grande amigo Arthur, no qual sou muito agradecida por me ajudar a tornar diversos momentos difíceis em aprendizado.

Aos amigos que a vida fez questão de colocar para iluminar o meu caminho, Mariana, Laura, Luke, Lilian, Wolguemuth, Chico, Júlia, Marcella, Daniel, Conrado, Luiz, Sarah, Esther. Obrigada por me ouvirem contar entusiasmadamente sobre os meus projetos e meu futuro, pelo apoio e pelo carinho.

"O filósofo do rei dizia que todo homem é uma ilha. (...) Que é necessário sair da ilha para ver a ilha, que não nos vemos se não nos saímos de nós."

José Saramago



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Aplicação de Técnicas Moleculares para Avaliação da Carga Parasitária de Amostras de Insetos Triatomíneos Infectados por *Trypanosoma cruzi*

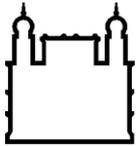
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Paula Finamore Araujo

A doença de Chagas constitui a quarta mais importante doença tropical, suplantada somente pela malária, tuberculose e esquistossomose. A análise por microscopia é o método clássico para descrição de infecção natural de triatomíneos por *Trypanosoma cruzi* e apresenta algumas limitações como baixa sensibilidade e reprodutibilidade, dificuldade de exame nos diferentes estágios evolutivos dos vetores, necessidade da análise em insetos frescos, além de ser um procedimento extremamente laborioso. Nesse contexto, a utilização da PCR em Tempo real (qPCR) para o diagnóstico de *T. cruzi* apresenta várias vantagens, como maior sensibilidade, rapidez e reprodutibilidade, possibilitando investigar o desenvolvimento do parasito no vetor. Neste trabalho, foi desenvolvido um ensaio *multiplex* de qPCR pelo sistema TaqMan com alvos para o gene correspondente à região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos e para o DNA nuclear satélite de *T. cruzi*, capaz de estimar a carga parasitária em amostras de insetos positivas para infecção por *T. cruzi*. Além disso, padronizamos uma qPCR com transcrição reversa (RT-qPCR), com alvo para o gene *T. cruzi* GAPDH, capaz de quantificar parasitos viáveis em amostras de triatomíneos. A reação de qPCR *multiplex* apresentou uma detecção linear para *T. cruzi* na faixa de 10^5 a 0,5 equivalentes de parasitos e para triatomíneo na faixa de 3 a $1,5 \times 10^4$ equivalentes de triatomíneo. Além disso, foi possível determinar um Limite de Detecção em 0,41 eq. Parasitos. Para validação clínica da PCR quantitativa, 13 amostras de triatomíneos coletados em campo, positivas para infecção por *T. cruzi*, foram quantificadas e apresentaram cargas variadas, cuja mediana foi de 10^5 eq. parasito/eq. triatomíneo. Posteriormente, para acompanhar o desenvolvimento do *T. cruzi* (Dm28c) em *Rhodnius prolixus*, ao longo de todo o trato digestivo e das suas diferentes porções, RNA e DNA total foram extraídos de insetos em diferentes períodos após a alimentação com sangue contendo *T. cruzi*. Foi possível observar que, a partir de 9 dias pós-alimentação dos insetos, ocorre uma diminuição da quantidade de parasitos viáveis (detectados por RNAm) em todo o trato digestivo do vetor, que não é acompanhada pela diminuição da quantidade de parasitos totais (detectados por DNA). Sendo que, avaliando separadamente o conteúdo intestinal, esta diminuição ocorre principalmente na porção anterior do intestino médio do inseto. Em paralelo, foi observado através de uma RT-qPCR com alvo no gene TcS5, altamente expresso nas formas tripomastigotas, detecção destas formas apenas na quarta semana após alimentação. Os ensaios de qPCR e RT-qPCR desenvolvidos neste estudo contribuirão para determinar a taxa de infecção de triatomíneos silvestres, além de auxiliar em estudos sobre competência vetorial de triatomíneos e a incidência da doença de Chagas.

Palavras chave: Doença de Chagas, *Rhodnius prolixus*, qPCR, RT-qPCR



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Application of molecular techniques based methodology for quantification of parasite load in triatomines samples infected with *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Paula Finamore Araujo

Chagas disease constitutes the fourth most important tropical disease, supplanted only by malaria, tuberculosis, and schistosomiasis. Microscopical examination is a classic method to describe the natural infection of triatomines by *Trypanosoma cruzi*, but it presents some limitations. Therefore, the development of molecular assays to quantify with high sensitivity and precision the parasite load in the triatomines is important to further study the vectorial competence of these insects. In this context, this study aims to develop a quantitative Real Time PCR (qPCR) assay to monitor the parasite load in triatomine samples, which is capable to detect and quantify absolute levels of *T. cruzi* in triatomine samples, differentiating total parasites from viable parasites by DNA and mRNA detection with high sensitivity, specificity and reproducibility, in order to investigate the development of distinct strains of *T. cruzi* in insect vectors. In this work, we developed a qPCR TaqMan *multiplex* assay targeting the *T. cruzi* nuclear satellite DNA and the triatomines 12S rRNA gene, which is capable to detect and quantify distinct strains of the parasite and species of triatomines. Also, to quantify only viable parasites, a RT-qPCR was developed, targeting the *T. cruzi* GAPDH and triatomines 12S rRNA genes. Our *multiplex* qPCR reaction presented a linearity ranging from 10^5 to 0.5 parasite equivalents, for the *T. cruzi* target, and from 3 to 0.00015 triatomine equivalents, for the vector insect target. It was also possible to determine that qPCR Limit of Detection (LOD) was 0,41 parasite equivalents. To validate the assay, 13 samples from field triatomines, positive for *T. cruzi* infection, were evaluated by qPCR, with variations in parasite load. Furthermore, to follow *T. cruzi* (Dm28c) development in *Rhodnius prolixus* total digestive tract and its different portions, total DNA and RNA were extracted from insect samples under increasing periods after feeding with blood containing *T. cruzi*. Nine days after feeding, it was possible to observe a time-dependent decreasing on the viable parasite quantity during the time course of the experiment, in which this decreasing occurs mainly in the anterior midgut portion. At the same time, was also observed in a RT-qPCR targeting TcS5 gene, highly expressed in trypomastigotes forms, besides the development of trypomastigotes forms inside the insect vector four weeks after feeding. The qPCR and RT-qPCR assays developed in this study are suitable to determine the infection rate of sylvatic triatomines and they can contribute to understand the vectorial competence of triatomines as well as the incidence of Chagas disease.

Key words: Chagas Disease, *Rhodnius prolixus*, qPCR, RT-qPCR

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS-----	xii
ÍNDICE DE FIGURAS-----	xiv
ÍNDICE DE TABELAS-----	xvi
1. INTRODUÇÃO-----	1
1.1. Doença de Chagas-----	1
1.2. Aspectos epidemiológicos da Doença de Chagas-----	2
1.3. Inseto Vetor -----	6
1.4. Biologia do Parasito-----	9
1.4.1. Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	11
1.5. Diagnóstico da Infecção por <i>T. cruzi</i> em Triatomíneos-----	13
JUSTIFICATIVA-----	16
2. OBJETIVOS-----	17
2.1. Objetivo Geral-----	17
2.2. Objetivos Específicos-----	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS-----	18
3.1. Manutenção da Colônia de <i>Rhodnius prolixus</i> -----	18
3.2. Obtenção de Amostras Biológicas-----	18
3.3. Cultivo de Células de <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	19
3.4. Cultivo de Células VERO e Obtenção das Formas Tripomastigotas-----	19
3.5. Infecção Experimental de Insetos Triatomíneos-----	20
3.6. Reconstituição de Amostras: DNA do Triatomíneo+ <i>T. cruzi</i> -----	20
3.7. Extração de DNA Genômico-----	20
3.8. Extração de RNA e Síntese de cDNA -----	21
3.9. Obtenção da Curva Padrão -----	22

3.10. PCR Quantitativo (PCR em Tempo real) -----	23
3.11. RT-PCR Quantitativo (RT-PCR em Tempo real)-----	24
3.12 PCR Gradiente-----	25
3.13. Eletroforese em Gel de Agarose-----	25
3.14. Análises Estatísticas-----	26
4. RESULTADOS-----	27
4.1. Padronização da PCR em Tempo real <i>multiplex</i> , Sistema TaqMan-----	27
4.1.1 Seleção da Temperatura de Anelamento/Extensão -----	27
4.1.2. Seleção da Concentração das Sondas em <i>singleplex</i> -----	30
4.1.3. Seleção da Concentração dos Iniciadores em <i>singleplex</i> -----	31
4.1.4. Seleção da Concentração dos Iniciadores em <i>multiplex</i> -----	32
4.1.5. Extensão Dinâmica (Linearidade)-----	35
4.1.6. Ensaio de Limite de Detecção -----	35
4.1.7. Ensaio de Inclusividade e Exclusividade-----	36
4.2. Validação do Ensaio de PCR em Tempo real <i>multiplex</i> -----	37
4.3. Quantificação de Parasitos Viáveis em Amostras de Insetos Experimentalmente Infectadas -----	38
4.4. Monitoramento da Infecção de <i>T. cruzi</i> em <i>R. prolixus</i> após alimentação-----	40
4.5. Monitoramento da Infecção de <i>T. cruzi</i> em Diferentes Porções do Trato Digestivo de <i>R. prolixus</i> -----	43
4.6. Padronização RT-qPCR para Diferenciar Epimastigotas de Tripomastigotas-----	44
4.7. Avaliação da Metaciclogênese em Amostras de <i>Rhodnius prolixus</i> -----	47
5.DISCUSSÃO-----	49
6. CONCLUSÃO-----	57
PERSPECTIVAS -----	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BHI: Brain Heart Infusion

BOD: Demanda Bioquímica de Oxigênio

cm: centímetros

Ct: Ciclo Threshold

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DP: Desvio Padrão

EDTA: ácido etilenodietildinitrotetracético

ENSP: Escola Nacional de Saúde Pública

Eq. Par: Equivalentes de parasito

Eq. Triat: Equivalentes de triatomíneo

h: hora

FIOCRUZ/RJ: Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

kDNA: DNA do cinetoplasto

LIT: Liver Infusion Triptose

LOD: Limite de Detecção

M: Molar

min: minutos

mL: Mililitros

mM: milimolar

MM: Marcador de Massa Molecular

nM: Nanomolar

NTC: *No Template Control* (controle negativo)

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan Americana da Saúde

pb: Pares de Base

PBS: Tampão Salino-Fosfato

PCR: Polymerase Chain Reaction

pH: potencial hidrogeniônico

qPCR: PCR quantitativa (PCR em Tempo real)

RT-qPCR: PCR quantitativa com transcrição reversa

RNA: Ácido Ribonucléico

RPM: Rotação por Minuto

TBE: Solução Tampão Tris/Borato/EDTA

Threshold: Limiar

UR: Umidade Relativa

UV: Ultravioleta

WHO: World Health Organization

μL: Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribuição da Doença de Chagas-----	4
Figura 1.2. Mapa de imigrantes infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> morando em países não endêmicos-----	5
Figura 1.3. Estádios de desenvolvimento do ciclo de vida de <i>Panstrongilus megistus</i> .-----	7
Figura 1.4. Distribuição Geográfica dos principais vetores de <i>T. cruzi</i> nas Américas.-----	8
Figura 1.5. Principais formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	10
Figura 1.6. Esquema do desenvolvimento de <i>Trypanosoma cruzi</i> ao longo do hospedeiro invertebrado-----	12
Figura 1.7. Doença de Chagas: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	13
Figura 4.1. Curvas de amplificação dos primers para DNA nuclear satélite de <i>T. cruzi</i> e 12S do RNA ribossomal, no ensaio para detecção de <i>T. cruzi</i> e triatomíneos por qPCR <i>multiplex</i> . -----	28
Figura 4.2. Curva de amplificação das sondas para detecção do DNA nuclear satélite de <i>T. cruzi</i> (em verde) e 12S do RNA ribossomal de triatomíneos (em azul) por qPCR <i>singleplex</i> -----	30
Figura 4.3. Curva de amplificação dos primers para detecção do DNA nuclear satélite de <i>T. cruzi</i> (em verde) e 12S do RNA ribossomal de triatomíneos (em azul) por qPCR <i>singleplex</i> .-----	31
Figura 4.4. Curva de amplificação dos primers para detecção simultânea do DNA nuclear satélite de <i>T. cruzi</i> e 12S do RNA ribossomal de triatomíneos por qPCR <i>multiplex</i> .-----	33
Figura 4.5. Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de <i>T. cruzi</i> e <i>Rhodnius prolixus</i> por PCR em Tempo real <i>multiplex</i> .-----	35
Figura 4.6. Quantificação da carga parasitária por PCR em Tempo real <i>multiplex</i> de triatomíneos coletados em diferentes regiões do Brasil-----	38
Figura 4.7. (A) Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de <i>T. cruzi</i> por RT-PCR em Tempo real (B) Curvas de dissociação do ensaio para o GAPDH----	39
Figura 4.8. (A) Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de <i>R. prolixus</i> por RT-PCR em Tempo real (B) Curvas de dissociação do ensaio para o 12s do RNA ribossomal de triatomíneos-----	40

Figura 4.9. Comparação de três métodos para quantificação da carga parasitária em amostras de triatomíneos infectados experimentalmente. (A) Contagem ao microscópio através da Câmara de Neubauer (B) Quantificação de parasitos através da detecção do RNA por RT-qPCR (C) Quantificação de parasitos através da detecção do DNA por qPCR *multiplex*-----42

Figura 4.10. Quantificação da carga parasitária em diferentes porções do trato digestivo de triatomíneos infectados experimentalmente. (A) Detecção do DNA por PCR em Tempo real *multiplex*. (B) Detecção do RNA por RT-qPCR-----44

Figura 4.11. Produtos do ensaio de RT-cPCR A) Ensaio da especificidade do gene correspondente à proteína trans-sialidase (TcS5) B) PCR gradiente para seleção da melhor temperatura de anelamento para os iniciadores com alvo no gene TcS5---45

Figura 4.12. (A) Curvas de amplificação dos primers TcS5 no ensaio de RT-qPCR. B) Curvas de dissociação do TcS5.-----46

Figura 4.13. (A) Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de *T. cruzi* por RT-PCR em Tempo real (B) Curvas de dissociação do ensaio para o TcS5-----47

Figura 4.14. Quantificação da carga parasitária em amostras de triatomíneos infectados experimentalmente. (A) Quantificação de parasitos através da detecção do RNA por RT-qPCR com alvo no gene GAPDH do *T. cruzi* (B) Quantificação de parasitos através da detecção do RNA por RT- qPCR com alvo no gene TcS5-----48

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Iniciadores utilizados para a síntese de cDNA-----	22
Tabela 4.1. Ensaio para seleção das temperaturas de anelamento/extensão Valores de Ct observados para detecção de diferentes amostras por qPCR-----	28
Tabela 4.2. Ensaio em <i>singleplex</i> para seleção das concentrações das sondas empregadas para a qPCR (média dos valores de Ct e Desvio Padrão - DP)-----	31
Tabela 4.3. Ensaio em <i>singleplex</i> para seleção das concentrações dos primers empregados para a qPCR (média dos valores de Ct e Desvio Padrão - DP)-----	32
Tabela 4.4 Ensaio em <i>multiplex</i> para seleção das concentrações dos primers com alvo para o DNA de triatomíneos -----	34
Tabela 4.5. Ensaio de estimativa pro Limite de Detecção de <i>T. cruzi</i> através da qPCR <i>multiplex</i> -----	36
Tabela 4.6. Ensaio de inclusividade e exclusividade para a detecção de triatomíneos por PCR em tempo real <i>multiplex</i> -----	37
Tabela 4.7 Ensaio de especificidade dos primers selecionados para a reação de RT-qPCR, capaz de detectar diferenciadamente as formas tripomastigotas (valores de Ct \pm DP)-----	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas, também denominada Tripanossomíase Americana, foi descrita pela primeira vez em 1909 por Carlos Chagas, quando este supervisionava uma campanha contra a Malária no Estado de Minas Gerais (Vicente Amato Neto, 2008). Durante a investigação, Carlos Chagas não só descobriu a doença, como também conseguiu estabelecer seu agente etiológico e o ciclo parasitário, identificando os insetos vetores e definindo vários outros aspectos clínicos e epidemiológicos relacionados à mesma (Chagas, 1909; Chagas-Filho, 1974).

O agente etiológico da doença, *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), é um protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae, caracterizado pela existência de um único flagelo e do cinetoplasto, uma organela contendo DNA e localizada na mitocôndria. Sua transmissão se dá, principalmente, por intermédio do inseto vetor, hemíptero hematófago da família Reduviidae (Chagas, 1909; Lent & Wygodzinsky, 1979), popularmente conhecido como "barbeiro", devido ao seu hábito de picar o rosto das pessoas. No entanto, a transmissão do protozoário pode ocorrer também pela ingestão de alimentos contaminados com as fezes de triatomíneo, transfusão sanguínea, transplante de órgãos (Wendel & Dias, 1992; Schmunis, 2007; Coura, 2015), congênita ou transplacentária (Brutus et al., 2008; Gontijo et al., 2009) e em acidentes de laboratório (Dias, 1997; Coura et al., 2005). A dinâmica e a ocorrência dos diferentes mecanismos de transmissão irão variar conforme as condições e circunstâncias de cada região, garantindo a propagação da Doença de Chagas para outras áreas do mundo, inclusive para regiões consideradas não endêmicas (Coura & Viñas, 2010).

Uma vez adquirida a infecção pelo protozoário, em pouco tempo ela se generaliza no hospedeiro vertebrado, acarretando em manifestações clínicas que variam desde infecções assintomáticas até sintomas como febre, mal estar, anorexia e cefaléia. Além disso, o indivíduo infectado pode apresentar edema localizado ou generalizado, aumento dos linfonodos, hepatomegalia, esplenomegalia, manifestações nervosas, bem como comprometimento cardíaco (Prata, 2001; Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003; Dias, 2006a; Coura & Viñas, 2010). Este período inicial consiste na fase aguda da

doença e caracteriza-se por parasitemia detectável através de exame direto, considerável parasitismo celular, assim como intensa reação inflamatória local. (Rey, 2011; Vicente Amato Neto, 2008).

Embora a fase aguda da infecção seja potencialmente fatal, a infecção pelo *T. cruzi* é frequentemente assintomática e, com a regressão das manifestações desta fase, instala-se a fase crônica da doença, que também pode ser letal ao indivíduo. Nesta fase, a parasitemia sofre acentuada redução, assim como o parasitismo celular e a intensidade do processo inflamatório, devido à resposta imunológica do hospedeiro. Após este período de alta parasitemia, o hospedeiro infectado pode apresentar pelo resto da vida a forma indeterminada da doença, não apresentando nenhum tipo de sinais e sintomas, apenas a sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi* (Vicente Amato Neto, 2008; Coura, 2007). No entanto, depois deste período ou gradativamente após a fase aguda, os indivíduos infectados podem apresentar diversas alterações sistêmicas. Os órgãos predominantemente acometidos são o coração, o esôfago, e o cólon, o que vai caracterizar as diferentes formas clínicas da fase crônica (Prata, 2001). No caso da forma cardíaca, as manifestações clínicas agrupam-se em três síndromes: arritmia, insuficiência cardíaca e tromboembolismo. As manifestações digestivas são representadas pelo megaesôfago e megacólon e estas caracterizam a forma digestiva da fase crônica. O acometimento de algum órgão do aparelho digestivo e do coração simultaneamente pode ocorrer e caracteriza a forma clínica mista da Doença de Chagas (Gomes, 1996; Prata, 2001; Coura, 2007).

A prevalência e a gravidade das diferentes formas clínicas da doença de Chagas estão especialmente relacionadas à extensa diversidade genética das cepas de *T. cruzi*, além da resposta imunológica e constituição genética do hospedeiro vertebrado (Andrade & Andrews, 2005; Teixeira et al., 2011; Fernandes & Andrews, 2012).

1.2 ASPECTOS ECOEPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS

Reconhecida como uma das 13 doenças tropicais negligenciadas mais importantes, a Doença de Chagas vem acometendo a humanidade desde a antiguidade e continua representando um grande problema social e econômico em muitos países da América Latina até os dias de hoje (Moncayo & Silveira, 2009; Rassi Jr et al., 2010). Estudos relacionados a paleoparasitologia sugerem, através da presença de DNA de *T.*

cruzi encontrados em múmias humanas, que a Doença de Chagas já afligia o homem há cerca de 9000 anos atrás (Aufderheide, 2004).

A parasitose causada pela infecção pelo *T. cruzi* evoluiu a partir de uma enzootia primitiva e passou a constituir um problema de saúde humana, devido as crescentes alterações antrópicas sobre o meio. A destruição gradativa dos biótipos naturais, o aparecimento de habitações próximas aos ecótopos silvestres, bem como outros fatores bioecológicos e político-sociais viabilizaram o processo de adaptação de espécies de triatomíneos silvestres a colonizarem os ambientes domiciliar e peridomiciliar (Ponce, 2007; Coura & Junqueira, 2012).

Originalmente circunscrita nas Américas, a Doença de Chagas apresenta uma ampla distribuição e constitui uma das principais endemias no continente americano. As regiões endêmicas compreendem países da América do Sul como Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Brasil, Bolívia, Chile, Uruguai, os países da América Central e o México (Guhl et al., 2007; Ponce, 2007; Coura & Viñas, 2014) (Figura 1.1). Atualmente, estima-se que cerca de seis a sete milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi*, principalmente nas áreas consideradas endêmicas (WHO, 2016). Na década passada, porém, a Doença de Chagas foi classificada como a doença parasitária mais séria na América do Sul e Central em termos de impacto social e econômico (Schofield & Dias, 1999).



Figura 1.1. Distribuição da Doença de Chagas (WHO/TDR, 2003).

Devido a migração de indivíduos infectados de países endêmicos para outras regiões do mundo em busca de melhores condições de vida, um novo quadro epidemiológico, socioeconômico e político surgiu com a disseminação da Doença de Chagas (Schmunis, 2007; Coura & Viñas, 2010). Por conta disso, regiões consideradas não endêmicas como países da Europa, América do Norte, Ásia e Oceania, principalmente Estados Unidos, Canadá, Espanha, França, Japão e Austrália passaram a apresentar casos de infecção por *T. cruzi*; (Garraud et al., 2007; Kirchhoff & Pearson, 2007; Coura et al., 2009) (Figura 1.2). Em função deste alto fluxo migratório, principalmente de pessoas infectadas, que podem se tornar potenciais doadores de sangue e órgãos para os grandes centros urbanos, e da ineficiência no controle das transfusões e dos bancos de sangue, a transmissão transfusional e via transplante de órgãos ganhou certa importância epidemiológica nas duas últimas décadas (Dias, 1997; Kirchoff et al., 2006; Lunardelli et al., 2007; Coura & Borges-Pereira, 2010).



Figura 1.2. Mapa de imigrantes infectados com *Trypanosoma cruzi* morando em países não endêmicos. Dados obtidos do Canadá, Austrália e Japão em 2006, dos EUA em 2005, da Espanha em 2008, e de outros países europeus em 2004-06 (Rassi Jr et al., 2010)

No início da década de 90, teve-se o marco do combate à Doença de Chagas na América do Sul, onde países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) adotaram medidas para o controle do vetor e em testes nos bancos de sangue (Briceño-Leon, 2009; Molyneux & Morel, 1998). A implementação de programas para a eliminação do inseto vetor em países da América Latina resultou no controle da transmissão vetorial da doença em diversas áreas endêmicas pelo seu principal vetor e em uma diminuição significativa da incidência de novos casos (Silveira & Vinhaes, 1999, Dias et al., 2002; Costa et al., 2003a; Hashimoto & Schofield, 2012). As iniciativas empregadas por parte dos governos latino-americanos foram fundamentais para a determinação do cenário da doença.

O risco de transmissão vetorial, porém, ainda existe uma vez que o protozoário circula entre outras espécies de triatomíneos, e entre diversos mamíferos, em vários ambientes silvestres nos quais há atividade humana (Oliveira Filho, 1999; Dias, 2009; Hashimoto & Schofield, 2012). Além disso, vários surtos de infecção por via oral,

geralmente relacionados à presença de vetores e reservatórios infectados pelo parasito nas proximidades, têm sido registrados (Valente, 2005; Steindel et al., 2007; Steindel et al., 2008; Nobrega et al., 2009), sendo que a transmissão oral da doença de Chagas pode ocorrer pelo consumo de alimentos contaminados pela presença dos triatomíneos ou suas fezes, ou por ingestão de carne crua de mamíferos silvestres infectados (Dias, 2006).

Casos recentes notificados no Brasil para a atual emergência dos casos de doença de Chagas aguda estão relacionados, na maioria dos casos, ao consumo do suco de açaí fresco contaminado com o parasito, e também existem relatos de surtos associados ao consumo de caldo de cana e suco de bacaba (Shikanai-Yasuda et al., 1991; Tatto et al., 2007; ANVISA, 2008). A contaminação dos alimentos com *T. cruzi* é acidental e pode ocorrer durante a colheita, armazenamento, transporte ou até mesmo na etapa de preparação (ANVISA, 2008).

1.3 O INSETO VETOR

Os vetores da Doença de Chagas são insetos denominados triatomíneos e são pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Estes insetos possuem desenvolvimento hemimetábolo, ou seja, sofrem metamorfose incompleta. Seu ciclo de vida compreende as fases de ovo, passando por cinco estádios ninfais até a fase adulta (Lent & Wygodzinsky, 1979; Jurberg & Galvão, 2006) (Figura 1.3)

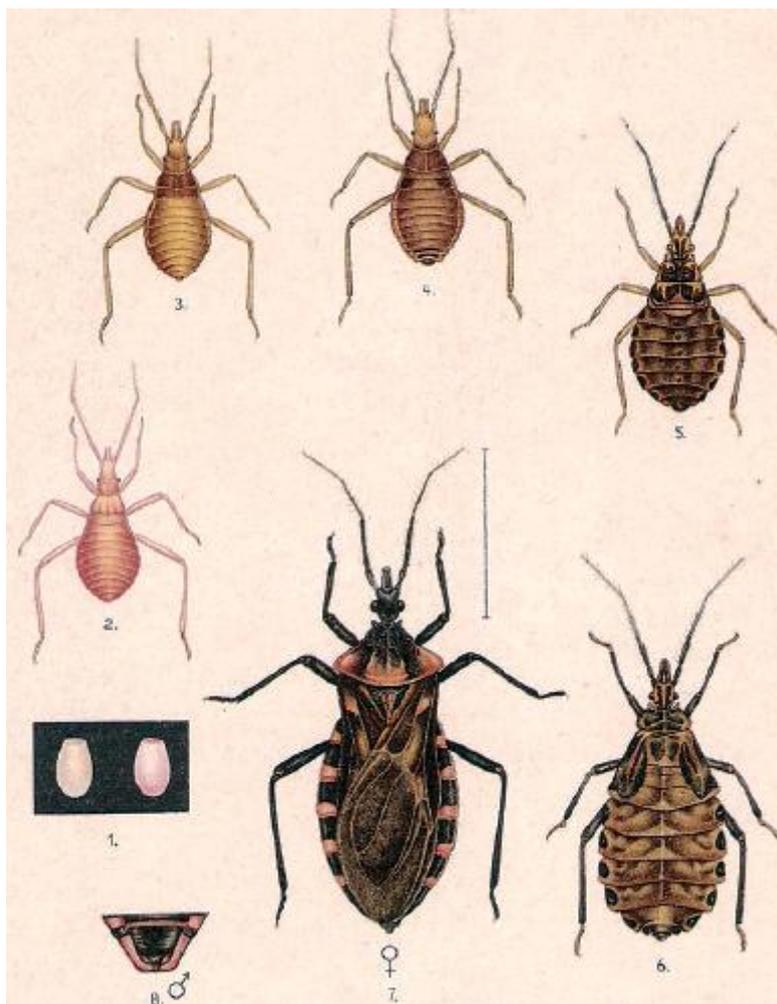


Figura 1.3. Estádios de desenvolvimento do ciclo de vida de *Panstrongilus megistus*. 1. Ovos; 2-6. Ninfas; 7. Adulto fêmea. (Jurberg & Galvão, 2006)

A transmissão do *T. cruzi* está relacionada com o hábito de vida hematófago destes insetos, uma vez que todas as fases de seu ciclo de vida alimentam-se de sangue (Jurberg & Galvão, 2006). Portanto, a competência vetorial das diferentes espécies de triatomíneos depende amplamente do grau de associação com os humanos e o motivo de maior relevância na transmissão vetorial consiste no comportamento que estes vetores têm de defecar durante ou após o repasto sanguíneo, sendo comum a deposição de suas fezes contaminadas com a forma infectante do *T. cruzi* expondo, dessa forma, o hospedeiro vertebrado ao parasito (Coura, 2005; Argolo et al., 2009; Gourbière et al., 2012).

Os triatomíneos possuem ampla distribuição geográfica em diferentes ecótopos naturais de regiões tropicais e subtropicais. (Figura 1.4) (Moncayo, 2009; Coura, 2015). Atualmente, a subfamília Triatominae compreende mais de 140 espécies, todas com possível competência vetorial. No entanto, das espécies descritas, a maioria se encontra

no ambiente silvestre e apenas poucas espécies dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* são relevantes vetores de *T. cruzi* a seres humanos, uma vez que apenas as espécies de triatomíneos que colonizam o domicílio e/ou o peridomicílio reúnem condições necessárias para transmitir a doença de Chagas aos humanos (Schofield & Galvão, 2009; Rassi Jr. et al., 2010; Gourbière et al., 2012).

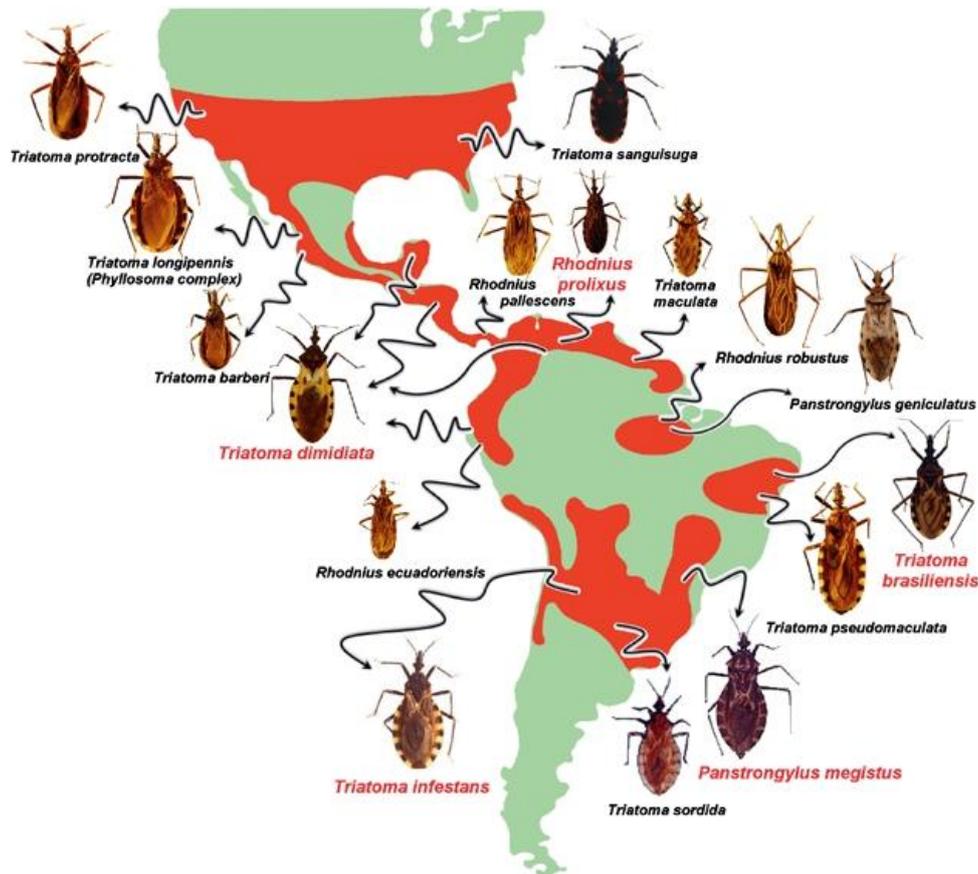


Figura 1.4. Distribuição geográfica dos principais vetores de *T. cruzi* nas Américas. (Gourbière et al., 2012). As áreas em vermelho no mapa indicam a distribuição geográfica aproximada das espécies indicadas. Espécies com nomes destacados em vermelho são consideradas como os principais transmissores do parasito.

A capacidade de algumas espécies de triatomíneos de migrar para ambientes domiciliares e peridomiciliares, como fendas em casas de barro, madeira, galinheiros, paióis, etc, aumenta a proximidade com possíveis hospedeiros como cães e gatos, e principalmente o homem, que foi acidentalmente inserido no ciclo biológico do parasito, após a colonização de ambientes silvestres (Coura & Viñas, 2010; Rassi, 2010; Coura & Borges-Pereira, 2012).

1.4 BIOLOGIA DO PARASITO

Ao longo do complexo ciclo de vida do *T. cruzi*, podem ocorrer alterações consideráveis no ambiente em que o parasito se encontra, como variações na temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes. Estas mudanças desencadeiam transformações bioquímicas, metabólicas e principalmente morfogenéticas (Kollien & Schaub, 2000, Cordero et al., 2008; Nogueira et al., 2015) que irão conferir mecanismos de sobrevivência do *T. cruzi* ao estresse ambiental, durante todo o ciclo de vida.

O seu ciclo biológico pode apresentar quatro estágios principais de desenvolvimento, que podem ser encontrados tanto no hospedeiro vertebrado, quanto no invertebrado: epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos. No vertebrado, encontra-se sob a forma circulante denominada tripomastigota de tipo sanguícola e sob a forma multiplicativa intracelular, amastigota. Já no hospedeiro invertebrado podem ser encontradas as formas epimastigotas, e tripomastigotas metacíclicas, sendo esta a forma infectante ao hospedeiro vertebrado (Rey, 2011).

Estas diferentes formas evolutivas são diferenciadas morfologicamente pelo aspecto geral da célula, pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e pela região de emergência do flagelo (Brenner, 1997; De Souza, 2002). Na forma tripomastigota, estágio infectante do parasito, o cinetoplasto está localizado posteriormente ao núcleo, em posição terminal ou subterminal e o flagelo emerge da bolsa flagelar, de localização próxima ao cinetoplasto. As formas epimastigotas, estágios de multiplicação do parasita no vetor, apresentam o cinetoplasto e a bolsa flagelar em posição anterior ao núcleo. Por fim, as formas amastigotas, estágio evolutivo que se multiplica dentro das células hospedeiras, possuem um formato arredondado e apresentam flagelos imperceptíveis em microscopia óptica convencional. (Rey, 2011; Coura, 2005; De Souza 2002) (Figura 1.5).

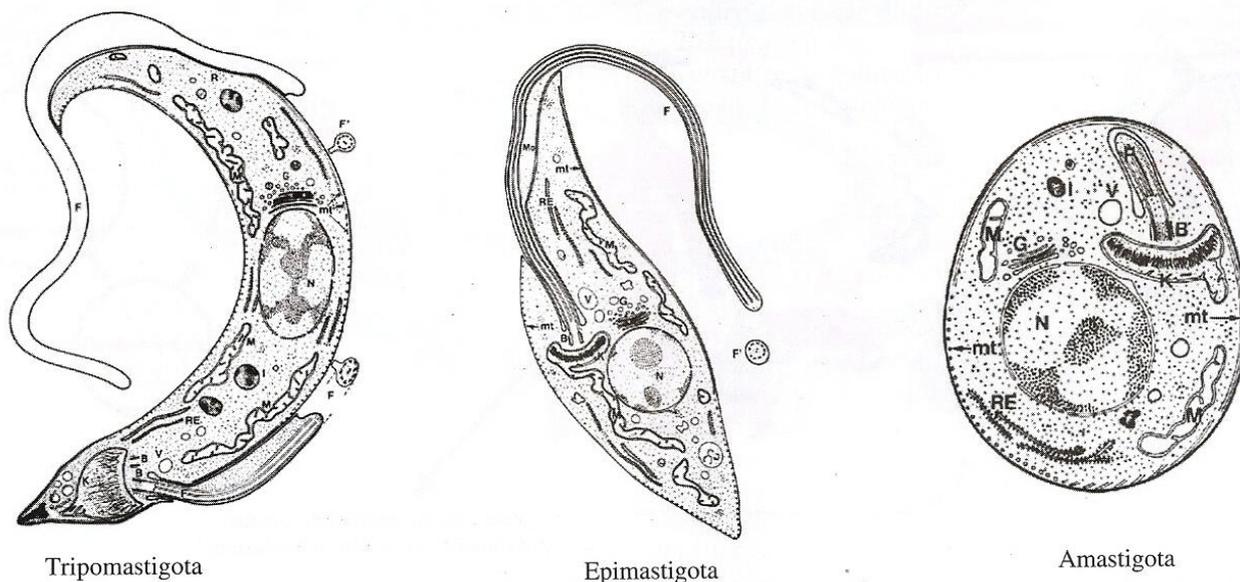


Figura 1.5. Principais formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* (Coura, 2005)

Além das diferenças morfológicas, ocorrem também, durante a metaciclo-gênese, diversas alterações no parasito, tais como modificações estruturais (Elias et al., 2007), mudanças na composição de carboidratos e na estrutura lipídica da membrana (Esteves et al., 1989; Serrano et al., 1995), remodelamento da cromatina e diferenças na estabilidade do mRNA e na expressão de alguns genes que são estágio-específico (Contreras et al., 1985; Ávila et al., 2003; Bayer-Santos et al., 2013). Estas alterações resultam em diferenças na expressão de proteínas (Parode-Talice, 2007), na morfologia celular, bem como na proliferação e infectividade do parasito (Kollien & Schaub, 2000; De Souza, 2002).

A capacidade do parasito de se adaptar às grandes mudanças no seu meio extracelular é devido à sua extensa plasticidade genômica (ganho, perda ou rearranjo de DNA), possibilitando a multiplicação do *T. cruzi* no intestino do inseto vetor, bem como a invasão e multiplicação em diferentes células de mamíferos burlando, de certa forma, o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado (Hall & Joiner, 1993; Vanhame & Pays, 1995; Rubin-de-Celis et al., 2006; Freire-de-Lima et al., 2012; Burgos et al., 2013; Sales-Campos et al., 2014). Esta plasticidade pode conferir mecanismos de sobrevivência do *T. cruzi* ao estresse ambiental, além de promover a elevada heterogeneidade genética observada entre as suas diferentes linhagens, podendo de certa forma, contribuir para a diversidade de espectro clínico relatado na doença de Chagas

(McDaniel & Dvorak, 1993).

O *T. cruzi* é representado por um conjunto de populações, denominados isolados ou cepas, que circulam em hospedeiros mamíferos e insetos vetores, apresentando grande diversidade de comportamento biológico tais como, diferenças nos níveis de patogenicidade para animais e humanos, variações na sensibilidade a drogas e prognóstico da doença (Macedo & Pena, 1998; Campbell et al., 2004), assim como na sua complexidade ecoepidemiológica (Miles et al., 2009). Desde a descoberta da doença em 1909, a heterogeneidade das cepas do parasito tem sido considerada como um fator importante para estudos de comportamento biológico e de relação vetor-parasito-hospedeiro (Brener, 1971)

O conhecimento da distribuição geográfica das populações de *T. cruzi* torna-se fundamental para melhor compreender os aspectos epidemiológicos da doença, uma vez que tem sido sugerido a associação entre os ciclos de transmissão do parasito (silvestre, peri-doméstico e doméstico) com as formas clínicas da doença de Chagas (Coura, 2007; Miles et al., 2009; Sturm & Campbell, 2010; Zingales et al., 2012).

1.4.1 CICLO EVOLUTIVO DO *T. cruzi*

Por desenvolver-se de modo cíclico entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, *T. cruzi* é classificado como um parasito heteroxênico. Quando os hospedeiros invertebrados ingerem as formas tripomastigotas do tipo sanguícola de *T. cruzi* presentes no sangue do hospedeiro vertebrado. Ao ser ingerido pelo vetor, o *T. cruzi* passa por uma sequência de transformações que se seguirá ao longo do tubo digestivo do inseto. No intestino médio anterior do triatomíneo desencadeiam-se as primeiras transformações do tripanossomatídeo, em um ciclo de multiplicação e permanência, formando-se epimastigotas e alguns esferomastigotas. Passando ao intestino médio posterior do vetor, processa-se a multiplicação dos epimastigotas que, ao atingirem o reto, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Este estágio constitui a forma infectante do parasito para o hospedeiro vertebrado e é eliminado para o meio externo através das fezes do inseto (Brener, 1997; Coura, 2005; Garcia et al., 2007; Rey, 2011; Ferreira et al., 2016) (Figura 1.6).

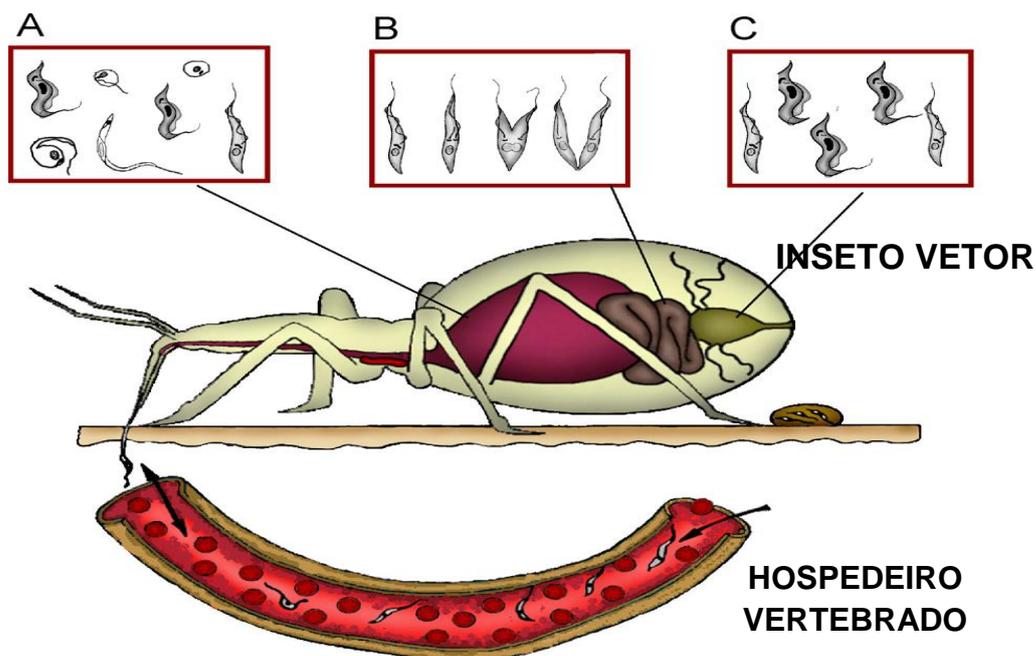


Figura 1.6. Esquema do desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* ao longo do hospedeiro invertebrado. (Modificado de Garcia et al., 2007). O inseto se alimenta de sangue infectado com as formas tripomastigotas que irão se transformar em formas epimastigotas e algumas esferomastigotas no estômago (porção dilatada do intestino médio) (A). Ao longo do trato digestivo as formas epimastigotas se multiplicarão (B) aumentando a população de parasitos. No reto, os epimastigotas irão se transformar em tripomastigotas metacíclicos (C) que serão eliminados com as fezes e urina do inseto.

Os hospedeiros vertebrados do *T. cruzi* envolvem mamíferos de diversas espécies, incluindo o homem (Coura, 2005). Durante ou após o repasto sanguíneo, o inseto defeca, eliminando as formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes. E, através de feridas e escoriações na pele, ou direto na mucosa, o parasita penetra na circulação do hospedeiro. Independente dos mecanismos e vias de transmissão, o tripomastigota necessita, obrigatoriamente, penetrar uma célula do hospedeiro a fim de cumprir seu ciclo evolutivo. Após a penetração na célula hospedeira há diferenciação do parasita para a forma amastigota e é nesse estágio que se inicia o processo de divisão binária intracelular. Saturada a célula de parasitos, inicia-se a diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas, sendo estas últimas as únicas formas viáveis quando se dá a ruptura da célula parasitada. Com o rompimento celular, formas em tripomastigotas circulam na corrente sanguínea até invadirem novas células ou até infectarem um hospedeiro invertebrado novamente, após um novo repasto sanguíneo (Coura, 2005; De Souza 2002; Brener, 1997) (Figura 1.7).

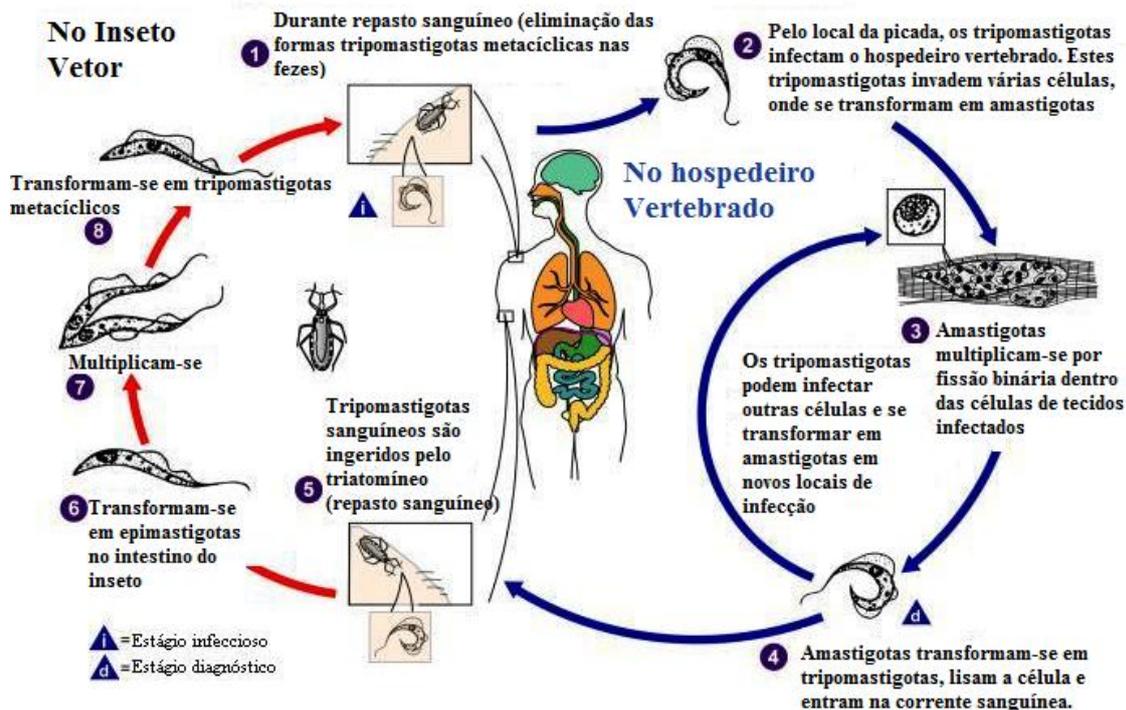


Figura 1.7. Doença de Chagas: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Modificado de CDC).

1.5 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *T. cruzi* EM TRIATOMÍNEOS

A aplicação de uma metodologia molecular pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que consiste na amplificação sequencial de fragmentos específicos de DNA previamente determinados (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986), permite a detecção a nível molecular de um agente patológico em variadas amostras. O uso da técnica de PCR inclui a possibilidade de se realizar ensaios qualitativos, para a detecção de um ou mais alvos em uma amostra, e ensaios quantitativos, capazes de monitorar o progresso da PCR enquanto ela ocorre (Burd, 2010). Neste último caso, os dados são coletados ao longo da PCR, ou seja em Tempo real, ao invés de serem obtidos apenas no final da reação. A PCR em Tempo real (qPCR) utiliza tecnologia de fluorescência para monitoramento contínuo de amplificação ao longo da reação (Higuchi et al., 1993) e é capaz de detectar e mensurar pequenas quantidades de ácido nucléico de diversas amostras de diferentes tipos de fontes (Bustin et al., 2009).

Em relação ao diagnóstico da doença de Chagas, a PCR tem apresentado uma alta sensibilidade e especificidade na amplificação de seqüências do DNA de *T. cruzi*

(Moser et al., 1989; Sturm et al., 1989; Diaz et al., 1992; Britto et al., 1993; Britto et al., 1995; Gomes et al., 1998), devido a grande diversidade observada no genoma deste parasito, que é caracterizado por apresentar variadas sequências de DNA repetitivo. A PCR, como ferramenta diagnóstica, apresenta maior sensibilidade, especificidade, rapidez e reprodutibilidade no diagnóstico (Cummings & Tarleton, 2003; Bustin et al., 2009; Burd, 2010), além de uma identificação mais precisa nos diferentes grupos populacionais ou linhagens do parasito, dependendo dos iniciadores e sondas empregados (Britto et al., 2001; Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003; Britto 2009).

Em contrapartida aos métodos parasitológicos indiretos, como o xenodiagnóstico e a hemocultura, que apresentam resultados após semanas ou até meses (Luquetti & Rassi, 2000; Yang & Rothman, 2004), os resultados provenientes da PCR são obtidos em um tempo mais curto (Russomando et al., 1996; Cumming & Tarleton, 2003). Além disso, sua execução ocorre de forma mais simples e é possível repetir os testes em caso de resultados inconclusivos, uma vez que esta técnica faz uso de pequenos volumes de amostra (Marin et al., 2002; Yang & Rothman, 2004).

Com isso, a PCR tem mostrado ser um método preciso para detecção acurada da carga parasitária em diversas amostras. Sendo assim, a técnica passou a ser estudada em pacientes com doença de Chagas crônica e congênita (Schijman et al., 2003; Virreira et al., 2003; Mora et al., 2005; Burgos et al., 2007), para a detecção da reativação em pacientes submetidos a transplante (Maldonado et al., 2004; Burgos et al., 2010) ou a outras situações imunossupressoras (Burgos et al., 2005, 2008; De Freitas et al., 2011), bem como para determinar a carga parasitária no sangue periférico de pacientes infectados (Piron et al., 2007; Duffy et al., 2009), para acompanhamento da parasitemia durante terapêutica específica (Britto et al., 2001; Britto, 2009; Moreira et al., 2013; Guedes-da-Silva et al., 2016), além do monitoramento da infecção de triatomíneos em áreas endêmicas (Brenière et al., 1995; Shikanai-Yasuda et al., 1996; Dorn et al., 2005; Braz et al., 2007; Cominetti et al., 2013).

O método clássico de descrição de infecção natural de triatomíneos por *T. cruzi* é o exame microscópico do conteúdo intestinal, ou do aparelho digestivo dissecado. (Mello et al., 1996; Kollien & Schaub, 1998). Contudo, o método apresenta algumas limitações, tais como baixa sensibilidade e reprodutibilidade, pois o resultado desta

metodologia empregada pode variar de observador para observador, dificuldade de exame nos diferentes estágios evolutivos dos insetos vetores, além da necessidade da análise em insetos frescos (Pizarro et al., 2007).

Com isso, ensaios moleculares baseados na PCR têm sido propostos como uma alternativa para a detecção mais precisa de *T. cruzi* em triatomíneos infectados (Sturm et al., 1989; Moser et al., 1989), uma vez que a análise por microscopia não somente pode subestimar o nível de infecção de triatomíneos coletados em campo, como também desconsidera a importância de ninfas na transmissão do parasito (Botto-Mahan et al., 2005). A detecção, por PCR, de *T. cruzi* em fezes ou urinas de insetos reduvídeos apresenta rapidez e sensibilidade para o diagnóstico parasitológico. Através do emprego desta metodologia é possível trabalhar com amostras degradadas ou de volumes pequenos (Moser et al., 1989).

Em países endêmicos, a coleta dos insetos é feita em áreas remotas e as espécies de triatomíneos precisam ser transportadas para análise que então ocorrerá dias ou semanas após a coleta. Dessa forma, o uso da PCR como ferramenta para diagnóstico, aumenta a eficiência na avaliação da infecção natural por *T. cruzi* em insetos triatomíneos. Além disso, diferente da microscopia, cuja análise precisa ser feita dentro de um curto período de tempo após coleta do material (Russomando et al., 1996; Shikanai-Yasuda et al., 1996; Dorn et al., 1999; Braz et al., 2007), na PCR as amostras podem ser processadas e analisadas mesmo depois de um longo período após a coleta dos insetos e a dissecação dos mesmos (Dorn et al., 2001; Pizarro, 2007).

JUSTIFICATIVA

A avaliação da infecção por *T. cruzi* em insetos vetores costuma ser avaliada pelo exame de microscopia óptica do conteúdo intestinal fresco de triatomíneos, buscando-se nelas a presença de *T. cruzi*, através da movimentação ativa do seu flagelo. Esta metodologia apresenta como desvantagens, além da necessidade de se transportar os insetos vivos até o laboratório e de trabalhar com o material fresco, o fato de não ser possível a identificação da espécie de tripanossomatídeo presente nas fezes dos triatomíneos, uma vez que outras espécies de protozoários flagelados, indistinguíveis de *T. cruzi* à microscopia óptica, podem estar presentes no conteúdo intestinal de triatomíneos, reduzindo assim a especificidade das técnicas parasitológicas tradicionais, neste caso a microscopia óptica.

Alvos moleculares dos ensaios de PCR têm sido representados tanto pelo genoma mitocondrial como pelo genoma nuclear do *T. cruzi* na detecção de DNA parasitário em triatomíneos vetores (Breniere et al., 1992; Breniere et al., 1995; Fernandes et al., 1998, Brisse et al., 2001; Brito et al., 2008). Desta forma, visando estabelecer o índice de infecção em triatomíneos, o desenvolvimento de um ensaio molecular baseado em PCR em Tempo real torna-se importante para uma maior compreensão do estudo sobre a doença de Chagas, sendo uma ferramenta capaz de identificar amostras positivas de intestino de triatomíneos infectados com *Trypanosoma cruzi*, além de quantificar a carga parasitária destes insetos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Desenvolvimento de uma metodologia baseada em PCR e RT-PCR em Tempo real para quantificar a carga parasitária total em amostras de insetos triatomíneos, detectar e quantificar parasitos viáveis, bem como diferenciar a população de tripomastigotas e epimastigotas em diferentes porções de seu tubo digestivo. Para isso, este projeto foi dividido em quatro objetivos específicos:

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Padronização da reação de PCR em Tempo real em sistema TaqMan *multiplex*, com um alvo no DNA nuclear satélite do *T. cruzi* e um alvo no gene correspondente a proteína ribossomal 12S, para quantificação da carga parasitária total de *T. cruzi*, em amostras do vetor.
- 2) Padronização de uma reação de RT-PCR em Tempo real, com alvos nos genes correspondentes à proteína trans-sialidase TcS5 (altamente expresso na forma tripomastigota metacíclica) e GAPDH (expresso constitutivamente em todas as formas evolutivas do parasito), capaz de quantificar diferencialmente as formas tripomastigotas e epimastigotas viáveis do parasito, em amostras de triatomíneos.
- 3) Validação dos ensaios com amostras de triatomíneos infectados experimentalmente e com amostras coletadas em campo.
- 4) Correlacionar a precisão da PCR em Tempo real com a contagem de parasitos por microscopia óptica, em Câmara de Neubauer, também utilizado para a quantificação da carga parasitária em amostras de triatomíneos.
- 5) Monitoramento da carga parasitária total, através da reação padronizada de RT-qPCR, bem como da viabilidade e metaciclogênese de *T. cruzi* em diferentes porções do trato digestivo de *R. prolixus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE INSETOS:

Os insetos utilizados, *Rhodnius prolixus*, foram gentilmente obtidos de colônias mantidas em insetário do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ, em colaboração com a Dra. Patrícia Azambuja. Antes dos experimentos, estes insetos eram mantidos em temperatura de 28°C de acordo com Garcia et al. (1975; 1984a, b) e a alimentação da colônia era normalmente efetuada com sangue desfibrinado de coelho, fornecido pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL). Destas colônias foram separadas ninfas de 5º estágio, mantidas em um cristalizador de vidro (15 cm de diâmetro x 30 cm de altura), fechado com tela de náilon. No interior, coloca-se papel de filtro sanfonado, com o objetivo de aumentar a superfície de contato e a possibilidade de refúgio, bem como retirar o excesso de umidade. Estas colônias foram então mantidas em estufa BOD a 28°C e 80% UR, com fotoperíodo de 12 horas.

3.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Os insetos utilizados para o ensaio de inclusividade foram gentilmente obtidos de colônias mantidas em insetário do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera (LIVEDIH) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ. Destas colônias foram separados adultos das espécies *Triatoma vitticeps*, *Triatoma pseudomaculata*, *T. sordida*, *Rhodnius neglectus* e *P. megistus*.

O sangue de mamíferos utilizados para o ensaio de exclusividade foram obtidos do Laboratório de Hantavirose e Riquetsioses e do Laboratório de Zoonoses Bacterianas. Foram coletados 5 mL de sangue de cachorro, gambá, morcego, gato e rato e adicionados imediatamente a 5 mL de Guanidina 6 N/EDTA 0,2 N (proporção 1:1). O sangue coletado destes mamíferos foi mantido a 4°C até o momento da extração de DNA destas amostras.

3.3 CULTIVO DE CÉLULAS DE *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (10^7 parasitos/mL), cepa Dm28c (TcI), foram cultivadas a 28°C, em BHI (Brain Heart Infusion – BD, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino. Na fase logarítmica de crescimento, as células foram recolhidas por centrifugação (3000 Xg por 10 min à temperatura ambiente), lavadas três vezes com PBS e ressuspensas em 500 µL na mesma solução. O crescimento celular foi estimado por contagem de células em Câmara de Neubauer.

3.4 CULTIVO DE CÉLULAS VERO E OBTENÇÃO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS

A linhagem de células VERO (1×10^6 células) foi cultivada em garrafas de 75 cm³, contendo meio RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino termodesativado. A cultura foi mantida a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. O repique das células VERO era feito após a formação de monocamada, a cada 7 dias, através da adição de Tripsina-EDTA (Tripsina 0,25% e EDTA 1mM - Gibco®) e agitação leve para o total desprendimento das células, que eram então ressuspensas em meio RPMI 1640.

As células VERO destinadas a infecção eram semeadas em garrafas de 75 cm³ (aproximadamente 3×10^5 células) contendo meio de cultura suplementado e, após apresentarem um perfil semi-confluyente (aproximadamente 48h após cultivo), a linhagem foi infectada (proporção 1:10) com epimastigotas da cepa Dm28c em fase estacionária de crescimento e envelhecidos por 14 dias em meio LIT (Liver Infusion Triptose) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Camargo, 1964). Após 5-6 dias de infecção, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 500 Xg por 5 min, e deixado em repouso a 37°C durante 30 min, para a migração das formas tripomastigotas para o sobrenadante, enquanto as formas amastigotas permaneceram no pellet. Após este procedimento, o sobrenadante foi coletado e centrifugado, a 3000 Xg por 10 min para coleta das formas tripomastigotas.

3.5 INFECCÃO EXPERIMENTAL DE INSETO TRIATOMÍNEO

Para infecção dos insetos, o sangue de coelho desfibrinado fornecido pelo CECAL/FIOCRUZ foi descomplementarizado através da separação do plasma por centrifugação à 1890 Xg por 15 min a 4°C e inativação do plasma pelo calor à 60°C por 1 hora em banho-maria, segundo Azambuja e Garcia (1997). Os eritrócitos foram então ressuspendidos com o plasma inativado e adicionado de formas epimastigotas de *T. cruzi* do clone Dm28c. Os parasitas obtidos em fase exponencial de crescimento passaram por centrifugação a 1890 Xg por 10 min a 4°C para eliminação do meio de cultura e o precipitado foi suspenso pelo sangue reconstituído de plasma inativado. A concentração final de epimastigotas foi de 10^7 parasitas/mL, estimado por contagem de células em Câmara de Neubauer.

A infecção foi realizada com ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* que se alimentaram através de uma membrana contendo sangue de coelho e epimastigotas Dm28c cultivados em meio BHI, conforme descrito por Cortez et al. (2002). Apenas os insetos que tiveram alimentação saturante com alta distensão abdominal foram separados para dar continuidade aos nossos ensaios. Os triatomíneos foram mantidos e infectados no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (FIOCRUZ), em colaboração com a Dra. Patrícia Azambuja.

3.6 RECONSTITUIÇÃO DE AMOSTRAS: TRIATOMÍNEO + *T. cruzi*

Para a padronização da PCR em Tempo real, foram realizados experimentos de reconstituição de amostras, no qual empregou-se pools contendo amostras de 5 tratos digestivos de triatomíneos não infectados. Diferentes concentrações de *T. cruzi* foram diluídas, sendo o pool de triatomíneos, o diluente. O DNA e o RNA das amostras reconstituídas foram recuperados por extração com os métodos descritos nos itens 3.7 e 3.8, respectivamente.

37 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Os tratos digestivos de triatomíneos foram extraídos em colunas de sílica, utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). Cada pool, contendo o

correspondente de 5 tratos digestivos de triatomíneos dissecados, foi transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 20 µL de proteinase K. As preparações foram incubadas (1 hora, 56°C) com agitações periódicas e a purificação do DNA total foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Todas as etapas do protocolo foram realizadas em câmara previamente irradiada com luz UV e todo o material utilizado nesta etapa foi devidamente descontaminado.

3.8 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA

O RNA foi extraído a partir de amostras contendo trato digestivo de triatomíneos infectados e não infectados por *T. cruzi*, utilizando um sistema que agrega as metodologias de purificação por fenol ácido (TRIzol) e o kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Cada pool, contendo o correspondente de 5 tratos digestivos de triatomíneos dissecados foi transferido para um eppendorf contendo 1 mL de TRIzol e 20 µL de tampão de lise (proteinase K) pré-aquecida. As preparações foram incubadas durante 1 hora à 56°C com agitações periódicas e posteriormente por 5 min à temperatura ambiente para dissociação do complexo nucleoprotéico. Para cada 1 mL de TRIzol, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas a 10000 Xg por 18 minutos (2°C a 8°C). Após a centrifugação, a mistura se separa em duas fases: fase inferior vermelha (fenol-clorofórmio – fase orgânica) e a fase superior incolor (fase aquosa), sendo que o RNA se encontra exclusivamente na fase aquosa. O RNA foi separado e um volume igual de Etanol 100% foi adicionado a amostra e homogeneizado. A partir disto, 700 µL da amostra foi transferida para uma coluna RNeasy, previamente acoplada a um tubo coletor de 2 mL, e centrifugada a 8000 RPMs por 30 segundos. O conteúdo do tubo coletor foi descartado. 700 µL de tampão RW1 foi adicionado à coluna, seguido de uma centrifugação a 8000 RPMs por 30 segundos para lavar a coluna. A coluna foi acoplada a um novo tubo coletor de 2 mL, descartando o tubo coletor contendo o filtrado. Com isso, 500 µL de tampão RPE foi adicionado à coluna, que foi então centrifugada a 8000 RPMs por 30 segundos, o tubo coletor foi desacoplado da coluna. Por fim, 30 µL de água DEPC foram aplicados diretamente no centro da membrana da coluna e as amostras foram centrifugadas a 8000 RPMs por 1 minuto para eluir o RNA.

O RNA total purificado foi dosado pelo espectrofotômetro Pico200 (Picodrop™) e convertido a cDNA utilizando o SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit (Life Technologies), seguindo o protocolo do fabricante. A transcrição reversa de 2 µg de RNA pré-tratado com RNase, utilizando o kit DNase-1 (Sigma-Aldrich), foi feita usando 2 µM de iniciadores específicos (primer reverse) (Tabela 3.1), 10 mM de dNTP e água DEPC para completar o volume final de 10 µL. As amostras foram incubadas à 65°C por 5 min e depois no gelo por pelo menos 1 min. Foram adicionados em cada amostra, então, 10 µL do MIX de síntese de cDNA contendo 2 µL de tampão RT 10X, 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de 0,1 M de DTT, 1 µL de RNaseOUT (40U/µL) e 1 µL da enzima Superscript III RT (200U/µL). As amostras foram cuidadosamente homogeneizadas e incubadas por 50 min à 50°C e então por 5 min à 85°C. Por fim, foi adicionado 1 µL de RNase H em cada tubo. Estes tubos foram incubados por 20 min à 37°C. O cDNA obtido foi estocado à -20°C até o momento da sua utilização.

Todas as etapas do protocolo foram realizadas em câmara previamente irradiada com luz UV e todo o material utilizado nesta etapa foram devidamente descontaminados.

Tabela 3.1: Iniciadores utilizados para a síntese de cDNA

Iniciadores (<i>Reverse</i>)	Sequência 5'-3'	Referência
TcGAPDH (<i>Reverse</i>)	AAAGACATGCCCGTCAGCTT	Silva-Gomes et al. (2014)
P6R (<i>Reverse</i>)	GCTGCACCTTGACCTGACATT	Uehara et al(2012)
TcS5 (<i>Reverse</i>)	CGTCTTATTCGGCACAAG	Freitas et al. (2011)

3.9 OBTENÇÃO DE CURVA PADRÃO

Para a quantificação de parasitos nas amostras de triatomíneos foram realizados ensaios de quantificação absoluta. Em cada placa de qPCR e RT-qPCR foram inseridas curvas padrão, que foram incluídas, em duplicata para cada ponto das curvas, em todos os ensaios quantitativos.

Para obtenção das curvas padrão de parasitos foram feitas diluições seriadas de DNA e cDNA extraído de amostras reconstituídas do trato digestivo de triatomíneo contaminadas artificialmente com epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c, com concentrações variando de 10^7 até 0,05 equivalentes de parasito. Para a curva padrão de triatomíneo foram feitas diluições seriadas de DNA e cDNA correspondente a um pool de 5 tratos digestivos de triatomíneos não infectados, com concentrações variando de 5 a 0,0032 equivalentes de triatomíneo. Para obtenção das curvas padrão de tripomastigotas foram feitas diluições seriadas de cDNA extraído de amostras reconstituídas de trato digestivo de triatomíneo contaminadas artificialmente com tripomastigotas de *T. cruzi* Dm28c, com concentrações variando de 10^5 equivalentes de parasito e finalizando com 0,05 equivalentes de parasito. Cada diluição foi correspondente a um ponto que compôs a curva padrão para quantificação absoluta da parasitemia dos insetos utilizados para este estudo.

3.10 PCR QUANTITATIVO (PCR EM TEMPO REAL)

Para a detecção e quantificação simultânea de *T. cruzi* nas amostras de triatomíneos, foram realizados ensaios de quantificação absoluta utilizando o sistema TaqMan (Life Technologies). Com este sistema tornou-se possível realizar, em um mesmo ensaio, uma PCR em Tempo real *multiplex* com alvo para o DNA nuclear satélite de *T. cruzi*, na presença do par de iniciadores Cruzi1F: 5'-AST CGG CTG ATC GTT TTC GA-3' e Cruzi2R: 5'-AAT TCC TCC AAG CAG CGG ATA-3' e sonda Cruzi3: 5' FAM -CAC ACA CTG GAC ACC AA - MGBNFQ, desenvolvidos para amplificar uma região de 166 pb no DNA nuclear satélite de *T. cruzi* (Piron et al., 2007) e, em paralelo, com alvo para a região 12S do gene do RNA ribossomal de triatomíneos, na presença do par de iniciadores P2b F 5'-AAA GAA TTT GGC GGT AAT TTA GTC T-3' e P6R 5'-GCT GCA CCT TGA CCT GAC ATT-3' (Uehara et al., 2012), e sonda TaqMan para triatomíneo, previamente desenvolvidos para amplificar a região 12S do gene do RNA ribossomal de triatomíneos. A sonda TaqMan para triatomíneo, desenhada a partir do alinhamento do gene ribossomal mitocondrial subunidade 12S das espécies de triatomíneos *R. prolixus*, *Triatoma sordida* e *Triatoma costalimai*, foi analisada pelo software Primer Express. Os ensaios quantitativos foram realizados no equipamento ABI Prism 7500 Fast (*Sequence Detector System – Applied Biosystems*), albergado pela plataforma PDTIS RPT-09A, com a seguinte programação: atividade inicial da enzima

amperase (1', 50°C), desnaturação inicial/ativação Taq Polimerase *Hot start* (10', 95 °C), 40 ciclos de desnaturação (15 s, 95 °C) e anelamento/extensão (1', 58 °C). As reações foram feitas em duplicata, usando 2 µL de DNA como *template* em um volume total de 20 µL. Todas as etapas do protocolo foram realizadas em câmara previamente irradiada com luz UV e tomados todos os cuidados necessários para se evitar contaminações na PCR.

3.11 RT-PCR QUANTITATIVO (RT-PCR EM TEMPO REAL)

Foram realizados ensaios de quantificação absoluta por PCR em Tempo real com transcrição reversa, utilizando o fluoróforo SYBR Green (Life Technologies). Os iniciadores utilizados para esses ensaios foram TcS F (300 nmol): 5'-CGGCGTCACTTCTATTCT-3' e TcS5 R (300 nmol): 5'-CGTCTTATTCGGCACAAG -3' (Freitas et al., 2011), desenvolvidos para amplificar uma região de 144 pb no gene TcS5, que é altamente expresso na forma tripomastigota de *T. cruzi*. Para o alvo GAPDH, que é expresso de forma constitutiva em todos os estágios evolutivos do parasito, foram utilizados os iniciadores TcGAPDH F (300 nmol), 5'-GTGCGGCTGCTGTCAACAT-3'; e TcGAPDH R (300 nmol), 5'-AAAGACATGCCCGTCAGCTT- 3' (Silva-Gomes et al., 2014). Como normalizador da quantificação por RT-PCR em tempo real, foram utilizados os iniciadores P2b F (300 nmol) 5'-AAAGAATTTGGCGGTAATTTAGTCT-3' e P6 R (300 nmol) 5'-GCTGCACCTTGACCTGACATT-3', desenhados para o alvo 12S do gene do RNA ribossomal de triatomíneos (Uehara et al., 2012). Os ensaios quantitativos foram realizados no equipamento ABI Prism 7500 Fast (*Sequence Detector System – Applied Biosystems*), albergado pela plataforma PDTIS RPT-09A, com a seguinte programação: desnaturação inicial (10', 95°C), 40 ciclos de desnaturação (15'', 95°C) e anelamento/extensão (1', 60 °C). Para monitorar a especificidade dos iniciadores empregados, curvas de dissociação (curvas de melting) foram realizadas após cada experimento, resultando em uma curva de pico único. As reações foram feitas em duplicata, usando 2 µL de cDNA como *template* em um volume total de 20 µL. Todas as etapas do protocolo foram realizadas em câmara previamente irradiada com luz UV e tomados todos os cuidados necessários para se evitar contaminações na PCR.

3.12 PCR GRADIENTE

Amostras de 10 ng de cDNA de *R. prolixus* contendo tripomastigotas (Dm28c) foram testadas em duplicatas em uma PCR gradiente, a fim de selecionar a temperatura ótima de anelamento do par de iniciadores TcS5 F e TcS5 R. A reação de PCR consistiu em 0,3 µM de cada iniciador, 10 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X, que é um MIX pré-preparado contendo a enzima Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampão de reação em concentrações ótimas para amplificação das amostras de cDNA, 2µL de cDNA e água ultra-pura para completar o volume final de 20 µL. As condições de ciclagem térmica da PCR gradiente, realizada no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foram: 94 °C por 5 min (ativação da enzima), seguida de 40 ciclos a 94 °C por 10 s, gradiente de temperaturas de 59°C, 60°C, 61°C, 62°C e 63°C por 30 s (anelamento) e 72°C por 30 s (extensão), com uma etapa final de 10 min a 72°C.

Foram utilizados controles negativos (cDNA extraído do trato digestivo de *R. prolixus* não infectado e branco da reação contendo todos os reagentes da PCR sem a adição do cDNA). Os procedimentos para os ensaios de PCR obedeceram às Boas Práticas de Laboratório, quer pela divisão física das etapas pré e pós-reação, assim como a descontaminação prévia de micropipetas e plásticos, em geral, por luz ultravioleta e/ou o uso de hipoclorito de sódio a 0,5% nas bancadas e áreas de trabalho.

3.13 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os ensaios de eletroforese foram realizados em cuba horizontal empregando géis de agarose a 1,5% (Agarose [Sigma]+ LM SIEVE Agarose [BioAmerica] - proporção 1:1) preparados em TBE 1X [0,089 M Trizma base; 0,088 M Ácido Bórico; 0,0027 M EDTA, pH=8]. Os produtos da PCR foram aplicadas no gel e a eletroforese foi conduzida por 2 horas à 70V. O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado em comparação aos marcadores de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder- Invitrogen Life Technologies®) incluído nos géis. Os produtos de PCR foram visualizados sob luz ultravioleta, após coloração dos géis com corante Nancy-520® (Sigma Life Science) [5 µg/mL]. Os géis foram analisados e as imagens registradas através de um sistema fotográfico de documentação em gel – UVP *Bioimaging Systems* (Upland, CA, USA).

3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os experimentos foram realizados em três replicatas biológicas, no mínimo. Os dados foram expressos como médias aritméticas \pm desvio padrão. Foram utilizados o teste-*t* de *Student* ou o teste *Mann–Whitney Rank Sum* para analisar a significância estatística das diferenças observadas, de acordo com a distribuição paramétrica ou não paramétrica dos dados. Um valor de *p* (*p-value*) menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises foram conduzidas com o programa *Sigmaplot Windows* versão 13.0 (Systat Software, Inc., California, USA). A análise de correlação entre as técnicas foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson, com valores situados entre -1,0 e 1,0, sendo \pm 0.9 uma correlação muito forte; \pm 0.5 a 0.7 uma correlação moderada; \pm 0.3 a 0.5 uma correlação fraca; \pm 0 a 0.3 uma correlação desprezível entre os dados analisados.

4. RESULTADOS

A medida da carga parasitária é realizada por quantificação absoluta, baseada em curva padrão produzida pela diluição seriada de DNA extraído de amostras de triatomíneo infectado artificialmente com epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c). E a carga parasitária é normalizada pela quantificação de DNA do triatomíneo contido na amostra, utilizando a mesma curva padrão.

4.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL *MULTIPLEX*, SISTEMA TAQMAN

4.1.1 SELEÇÃO DA TEMPERATURA DE ANELAMENTO/EXTENSÃO

Para se estabelecer um ensaio de PCR em Tempo real *multiplex*, é necessário que os dois pares de iniciadores sejam capazes de detectar em um mesmo experimento DNA de *T. cruzi* e de triatomíneos. Para isso, eles precisam apresentar cinéticas de amplificação semelhantes. Portanto, foram feitos, a princípio, dois tipos de ensaios de PCR em Tempo real com sonda TaqMan, um em *singleplex*, com iniciadores para o alvo no DNA nuclear satélite de *T. cruzi* e, separadamente, com o alvo para DNA de triatomíneos, e outro em *multiplex*, onde os alvos foram DNA de triatomíneo + DNA de *T. cruzi*. Os experimentos foram realizados em diferentes temperaturas de anelamento/extensão (Tabela 4.1, Figura 4.1): 60°C (A), 58°C (B) e 55°C (C), a fim de testar a especificidade da sonda, testar os iniciadores, verificar a temperatura mais compatível e avaliar a eficiência das amplificações.

Tabela 4.1. Ensaio para seleção das temperaturas de anelamento/extensão Valores de Ct observados para detecção de diferentes amostras por qPCR. Em destaque (azul), a temperatura de anelamento/extensão selecionada de acordo com os melhores valores de Ct obtidos em *singleplex* e em *multiplex*.

	Singleplex						Multiplex					
	Alvo DNA <i>T. cruzi</i> (Ct médio± DP)			Alvo DNA Triatomíneo (Ct médio± DP)			Alvo DNA <i>T. cruzi</i> (Ct médio± DP)			Alvo DNA Triatomíneo (Ct médio± DP)		
	60°	58°	55°	60°	58°	55°	60°	58°	55°	60°	58°	55°
Triatomíneo Não Infectado	—	—	—	17,18±0,11	24,23±0,76	32,69±0,08	—	—	—	17,71±0,44	24,99±0,75	32,33±1,95
DNA Triatomíneo + <i>T. cruzi</i>	27,27±0,07	20,15±0,12	22,21±0,40	19,62±0,37	24,85±0,32	16,16±0,23	39,82±0,58	22,95±0,58	23,63±0,40	20,68±0,58	28,49±0,81	17,52±0,89
DNA <i>T. cruzi</i>	19,13±0,51	11,17±0,27	16,67±0,86	—	—	—	18,86±0,52	11,21±0,20	18,25±0,22	—	—	—
DNA <i>T. rangeli</i>	26,35±0,15	18,64±0,22	27,80±0,16	—	—	—	27,37±0,28	19,65±0,23	20,12±0,16	—	—	—

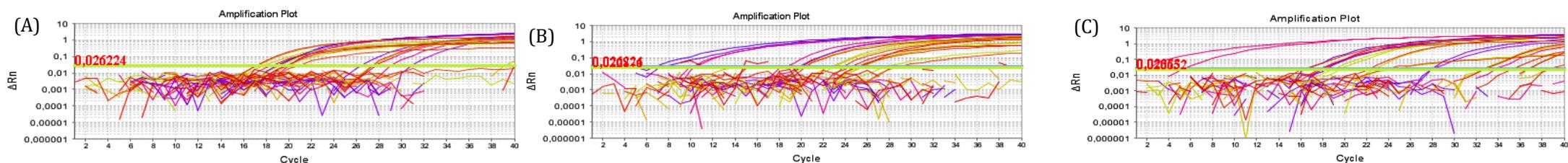


Figura 4.1. Curvas de amplificação dos primers para DNA nuclear satélite de *T. cruzi* e 12S do RNA ribossomal, no ensaio para detecção de *T. cruzi* e triatomíneos por qPCR *multiplex*. Nas temperaturas de (A) 60°C, (B) 58°C e (C) 55°C.

Na PCR em tempo real realizada com a temperatura de anelamento de 60°C, constatou-se que os valores médios de Ct (ciclo *threshold*) apresentaram diferenças consideráveis para o alvo de DNA de *T. cruzi*, quando as amostras contendo tubo digestivo de triatomíneo infectado artificialmente por este parasito foram submetidas ao ensaio *multiplex*. No ensaio em *singleplex*, a amostra contendo o tubo digestivo de triatomíneo infectado artificialmente com *T. cruzi* obteve um Ct médio de 27,27 para o alvo *T. cruzi*, no entanto esta mesma amostra, quando submetida ao ensaio em *multiplex*, apresentou para o mesmo alvo um aumento significativo no Ct médio de 39,82.

Na temperatura de 58°C, ocorreu uma melhora na amplificação de ambos os alvos em *multiplex*, podendo ser observada através de valores menores de Ct. Além disso, para as amostras contendo o tubo digestivo do inseto infectado artificialmente com *T. cruzi*, não foi observada variação considerável entre os valores médios de Ct, entre os ensaios em *singleplex* e *multiplex*, ou seja, as amostras apresentaram valores de Cts mais homogêneos.

Na temperatura de 55°C, os valores médios de Ct para o alvo de DNA de *T. cruzi* também apresentaram Cts menores quando comparados ao anelamento a 60°C, entretanto voltamos a observar um aumento dos valores de Ct para as amostras de tubo digestivo de triatomíneo não infectado por *T. cruzi* tanto nos ensaios em *singleplex* quanto em *multiplex*. Na temperatura de 58°C, a amostra de inseto não infectado apresentou uma amplificação a partir do 24º ciclo *threshold*, aproximadamente, em ambos os ensaios. No entanto, quando a mesma amostra foi submetida ao experimento com a temperatura de anelamento em 55°C, os Cts médios, com alvo para o DNA de triatomíneo, variaram para 32,69 e 32,33 nos ensaios *singleplex* e *multiplex* respectivamente. Tendo em vista as variações observadas nas diferentes amostras submetidas nos ensaios, tanto em *singleplex* quanto em *multiplex*, foi selecionada então a temperatura de anelamento de 58°C para os experimentos subsequentes.

Este ensaio permitiu, também, testar a especificidade da reação, uma vez que os iniciadores e sonda com alvo para DNA do triatomíneo mostraram amplificação apenas nas amostras que continham DNA do inseto. Por outro lado, os iniciadores e sonda com alvo para o DNA nuclear satélite de *T. cruzi*, apesar de não mostrarem amplificação nas amostras que continham apenas o tubo digestivo do inseto não infectado, amplificaram

tanto para *T. cruzi*, quanto para *T. rangeli*, em amostras contendo a mesma concentração de parasitos. Ou seja, apesar destes iniciadores não amplificarem para o triatomíneo, eles amplificam para a outra espécie de tripanossomatídeo sem apresentar nenhum tipo de variação.

4.1.2 SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS SONDAS EM *SINGLEPLEX*

Este experimento teve como propósito estabelecer a melhor concentração de sonda TaqMan a ser utilizada (Figura 4.2) Foram ensaiados DNA de amostras reconstituídas do tubo digestivo de triatomíneo infectadas artificialmente com DNA de *T. cruzi* em seis diferentes concentrações de sonda para seus respectivos alvos. Segundo os valores de Ct mostrados na tabela 4.2, foram selecionadas as concentrações 150 nM para a sonda com alvo em DNA de triatomíneos e 250 nM para a sonda com alvo em DNA de *T. cruzi*.

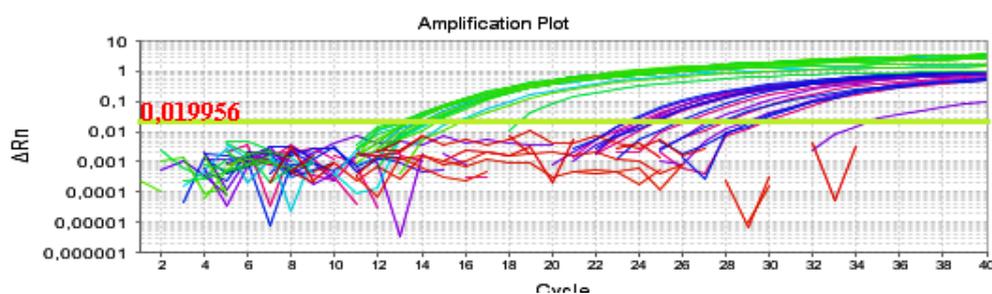


Figura 4.2. Curva de amplificação das sondas para detecção do DNA nuclear satélite de *T. cruzi* (em verde) e 12S do RNA ribossomal de triatomíneos (em azul) por qPCR *singleplex*.

Tabela 4.2. Ensaio em *singleplex* para seleção das concentrações das sondas empregadas para a qPCR (média dos valores de Ct e Desvio Padrão - DP). Em destaque, as concentrações de sonda de acordo com os melhores valores de Ct obtidos. Em azul, a concentração escolhida para a sonda com alvo no DNA de triatomíneo. Em verde, a concentração escolhida para a sonda com alvo no DNA de *T. cruzi*.

Sonda (nM)	<i>Singleplex</i>			
	Alvo DNA <i>T. cruzi</i>		Alvo DNA Triatomíneo	
	Ct Médio	± DP	Ct Médio	± DP
100	15,11	0,17	24,39	0,06
150	14,15	0,16	23,59	0,25
200	15,59	0,28	26,46	0,33
250	14,13	0,20	25,91	0,26
300	14,38	0,10	27,52	0,44
350	15,19	0,37	29,19	0,45

4.1.3 SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS INICIADORES EM *SINGLEPEX*

Uma vez definida a temperatura de anelamento ideal para os dois pares de iniciadores de interesse, foi feito um ensaio em *singleplex* para determinar a concentração ideal de iniciadores com alvo em DNA de *T. cruzi* e com alvo em DNA de triatomíneos (Figura 4.3). Foram ensaiados DNA de amostras reconstituídas do tubo digestivo de triatomíneo infectadas artificialmente com DNA de *T. cruzi* em diferentes concentrações de iniciadores para seus respectivos alvos. A tabela 4.3 indica as diferentes concentrações utilizadas neste experimento.

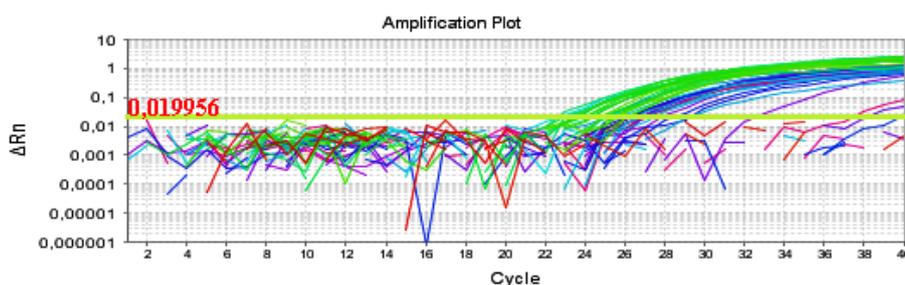


Figura 4.3. Curva de amplificação dos primers para detecção do DNA nuclear satélite de *T. cruzi* (em verde) e 12S do RNA ribossomal de triatomíneos (em azul) por qPCR *singleplex*.

Tabela 4.3. Ensaio em *singleplex* para seleção das concentrações dos primers empregados para a qPCR (média dos valores de Ct e Desvio Padrão - DP). Em destaque (vermelho), as concentrações dos pares de iniciadores escolhidos de acordo com os melhores valores de Ct obtidos.

Primers (nM)		<i>Singleplex</i>			
		Alvo DNA <i>T. cruzi</i>		Alvo DNA Triatomíneo	
Forward	Reverse	Ct Médio	± DP	Ct Médio	± DP
100	100	25,15	0,33	38,89	1,16
100	300	23,64	1,05	-	-
100	600	25,73	0,71	-	-
300	100	24,44	1,12	27,44	1,28
300	300	25,08	1,63	32,52	-
300	600	25,66	1,99	28,16	0,42
600	100	23,92	0,57	26,62	0,38
600	300	24,02	2,06	26,49	0,26
600	600	24,00	0,93	26,57	0,51

De acordo com os valores de Ct obtidos nesta PCR em tempo real em *singleplex*, pôde-se observar que a concentração 600 nM / 600 nM foi a que apresentou melhores resultados tanto para os iniciadores com alvo em DNA de *T. cruzi* quanto para os iniciadores com alvo em DNA de triatomíneo. Além disso, para a seleção dos iniciadores neste ensaio em *singleplex* buscou-se escolher também uma combinação em que a concentração dos iniciadores *forward* e *reverse* fossem iguais, caso não houvesse muita diferença nos valores de Ct.

4.1.4 SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS INICIADORES PARA PCR EM TEMPO REAL EM MULTIPLEX

A partir dos experimentos realizados em *singleplex* foi possível selecionar as concentrações ideais das duas sondas e dos dois pares de iniciadores de interesse. Uma vez estabelecidos esses valores, a fase seguinte do ensaio de padronização foi definir a melhor concentração para os iniciadores com alvo no DNA de triatomíneos em *multiplex* (Figura 4.4)

Para este ensaio, então, foram fixadas as seguintes concentrações obtidas anteriormente: 150 nM de sonda com alvo em DNA de triatomíneos; 250 nM de sonda com alvo em DNA de *T. cruzi*; 600 nM / 600 nM de iniciadores com alvo no DNA nuclear satélite de *T. cruzi*.

Para determinar a concentração ideal de iniciadores com alvo em DNA de triatomíneos no ensaio em *multiplex*, foram testadas e combinadas diferentes concentrações dos iniciadores *forward* e do *reverse*, como demonstrado na tabela 4.4.

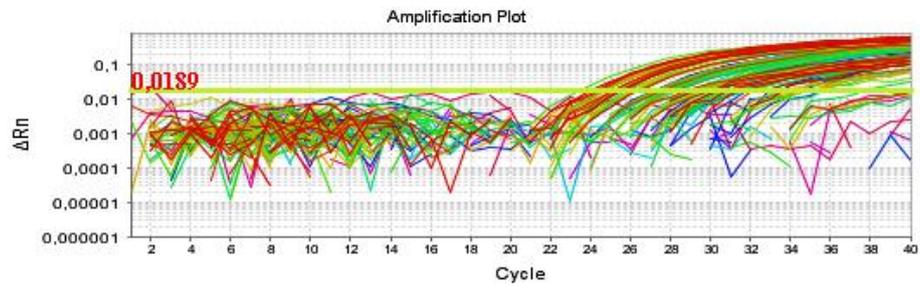


Figura 4.4. Curva de amplificação dos primers para detecção simultânea do DNA nuclear satélite de *T. cruzi* e 12S do RNA ribossomal de triatomíneos por qPCR *multiplex*.

Tabela 4.4 Ensaio em *multiplex* para seleção das concentrações dos primers com alvo para o DNA de triatomíneos (média dos valores de Ct e Desvio Padrão - DP). Em destaque (vermelho), as concentrações escolhidas do par de iniciadores de acordo com os melhores valores de Ct obtidos

Primers - Triatomíneo		<i>Multiplex</i>			
		Alvo DNA <i>T. cruzi</i>		Alvo DNA Triatomíneo	
		CT Médio	DP	CT Médio	DP
Forward	Reverse				
600	600	32,60	2,91	26,43	1,17
600	500	31,80	3,06	25,19	1,39
600	400	30,23	1,29	25,16	0,53
600	300	31,18	3,31	24,45	0,27
600	200	31,29	0,78	26,32	0,17
500	600	-	-	25,26	0,16
500	500	30,59	1,01	27,39	2,92
500	400	29,29	0,49	24,30	0,25
500	300	32,58	3,58	25,78	0,80
500	200	31,80	1,26	26,72	1,36
400	600	33,13	2,90	27,73	2,54
400	500	-	-	25,96	0,56
400	400	33,76	5,81	27,73	3,38
400	300	30,29	1,78	25,66	1,15
400	200	29,40	2,15	26,33	2,25
300	600	30,68	1,80	26,93	2,08
300	500	27,73	0,37	24,19	0,83
300	400	32,66	2,36	30,97	4,92
300	300	-	-	35,97	-
300	200	30,24	0,27	-	-
200	600	32,82	3,39	-	-
200	500	32,22	1,42	29,57	2,92
200	400	31,88	2,23	30,33	1,77
200	300	-	-	32,88	2,44
200	200	29,80	0,38	26,81	0,54

Os valores de Ct foram determinados em diferentes combinações de concentração de *primer* para o alvo em triatomíneos e foi observado que as concentrações que apresentaram os melhores resultados nas condições estabelecidas foram de 300 nM para o iniciador *forward* e 500 nM para o *reverse* com alvo no DNA de triatomíneos. Esta combinação de iniciadores *forward* (300 nM) e *reverse* (500 nM) apresentou Cts menores em amostras contendo o DNA de triatomíneo ao mesmo tempo que não apresentou grande perda na amplificação do DNA de *T. cruzi*, quando as amostras foram ensaiadas em *multiplex*.

4.1.5 EXTENSÃO DINÂMICA (LINEARIDADE) DA PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX

Para a quantificação da carga parasitária, foram realizados ensaios de quantificação absoluta baseada em curva padrão de DNA extraído de lisado de parasitos em triatomíneos. A curva padrão foi incluída em todos os ensaios quantitativos para calcular as frações de parasito obtidas a partir do lisado.

Com o objetivo de analisar a linearidade de detecção da amplificação de DNA de *T. cruzi* e de DNA de intestino de triatomíneo, foram ensaiadas, seguindo as concentrações de sonda e iniciadores definidas anteriormente nos ensaios de padronização da PCR em tempo real *multiplex*, duas curvas padrão independentes.

Através de análise de regressão linear, foi possível obter uma linearidade elevada para ambas as curvas ($R^2 = 0,99$ e $R^2 = 0,98$ para parasito e para triatomíneo, respectivamente) e slopes adequados (-3,18 e -3,36) para a quantificação do parasito e do triatomíneo (Figura 4.5).

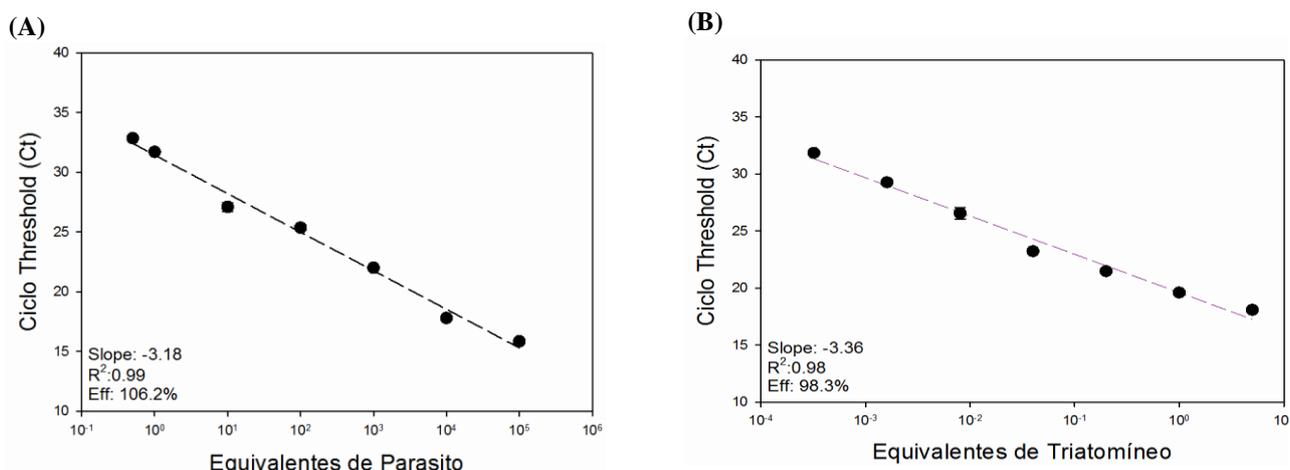


Figura 4.5. Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de *T. cruzi* e *Rhodnius prolixus* por PCR em tempo real *multiplex*. Amostras obtidas a partir de diluições seriadas de DNA extraído de epimastigotas, na faixa de 10⁵ a 0,5 e de DNA extraído de intestino de *R. prolixus*, na faixa de 5 até 0,00032.

4.1.6 ENSAIO DE LIMITE DE DETECÇÃO

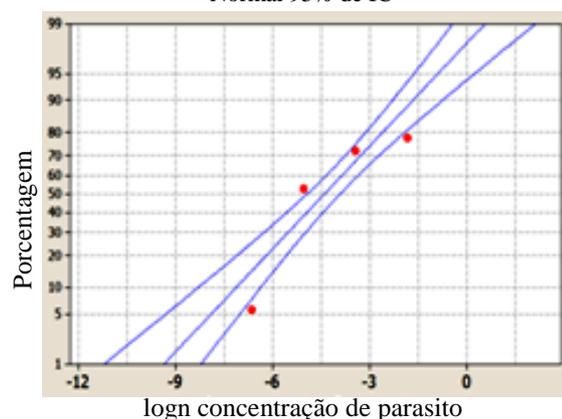
Para avaliar o limite de detecção alcançado após a padronização da PCR em tempo real, sistema TaqMan, foram ensaiadas amostras de lisados do tubo digestivo de triatomíneo reconstituídas experimentalmente contendo de 20 a 0,00128 equivalentes de parasitos, cada ponto representado em doze replicatas, durante três dias consecutivos (Tabela 4.5). Utilizamos o programa Mini Tab, através do método estatístico PROBIT

para determinar o limite de detecção, o qual foi de 0,41 equivalentes de parasito. Este limite corresponde à concentração de parasito onde há 95% de probabilidade de detecção pelo ensaio de PCR em tempo real.

Tabela 4.5. Ensaio de estimativa pro Limite de Detecção de *T. cruzi* através da qPCR multiplex. qPCR+ indica o número de replicatas positivas para cada ensaio testado, sendo que a positividade de cada concentração foi convertida e analisada também por porcentagem.

Concentração eq. par	Ensaio	qPCR +	Positividade (%)
20	1	12	100
	2	12	100
	3	12	100
4	1	12	100
	2	12	100
	3	12	100
0,8	1	12	100
	2	12	100
	3	12	100
0,16	1	10	83,3
	2	8	66,7
	3	10	83,3
0,032	1	11	91,7
	2	10	83,3
	3	5	41,7
0,0064	1	7	58,3
	2	6	50
	3	6	50
0,00128	1	1	8,3
	2	1	8,3
	3	0	0

Gráfico de probabilidade para Exitos
Normal 95% de IC



Análise de Probit: método estatístico utilizado para o cálculo e obtenção do limite de detecção de *T. cruzi*. O valor de LOD é encontrado a partir de uma progressão gerada pela análise de Probit, no qual extrapola as concentrações testadas que estão próximas ao valor que reflete 95% de chance de ser detectado pelo ensaio de qPCR.

4.1.7 ENSAIO DE INCLUSIVIDADE E EXCLUSIVIDADE

A fim de averiguar a capacidade do sistema TaqMan (iniciadores P2b e P6R e sonda TaqMan Triatomíneo) em reconhecer as diferentes espécies de triatomíneos, que possuem padrões distintos quanto à distribuição geográfica e ao desenvolvimento e transmissão de *T. cruzi*, foi feito um ensaio de inclusividade com seis espécies diferentes, de três gêneros distintos. Todas as espécies de triatomíneos testadas, *R. prolixus*, *Triatoma vitticeps*, *Triatoma pseudomaculata*, *T. sordida*, *Rhodnius neglectus* e *P. megistus*, apresentaram amplificação para o alvo no triatomíneo (Tabela 4.6).

Além disso, foi feito um ensaio de exclusividade, com diferentes espécies de mamíferos, para testar se os iniciadores P2b e P6R e a sonda TaqMan Triatomíneo amplificam para os diversos hospedeiros vertebrados. Pois, ao longo do seu ciclo biológico, o *T. cruzi* pode ser encontrado tanto no hospedeiro invertebrado quanto no hospedeiro vertebrado.

As espécies de mamíferos testadas foram de cachorro, gambá, morcego, gato, rato e humano. Como esperado, nenhuma destas amostras apresentaram amplificação para o alvo triatomíneo, confirmando que este ensaio TaqMan amplifica apenas para o inseto vetor (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Ensaio de inclusividade e exclusividade para a detecção de triatomíneos por PCR em tempo real *multiplex*. Valores de Ct para o DNA correspondente a 1 tubo digestivo de inseto adulto para as espécies de triatomíneo listadas. Valores de Ct correspondentes a 200 µL de sangue para as espécies de mamíferos listadas.

Ensaio Inclusividade			Ensaio Exclusividade		
Espécie	Ct médio	DP	Espécie	Ct médio	DP
<i>Rhodnius prolixus</i>	23,84	0,12	Humano	N/A	-
<i>Rhodnius neglectus</i>	27,54	0,22	Morcego	N/A	-
<i>Triatoma vitticeps</i>	23,57	0,26	Gato	N/A	-
<i>Triatoma sordida</i>	23,31	0,02	Cachorro	N/A	-
<i>Triatoma pseudomaculata</i>	29,28	1,52	Gambá	N/A	-
<i>Panstrongylus megistus</i>	31,69	0,04	Rato	N/A	-

4.2 VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL *MULTIPLEX*

A técnica padronizada de PCR em tempo real, sistema *multiplex*, foi validada com amostras de triatomíneos coletados em diferentes regiões do Brasil e que apresentaram positividade para a infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em uma PCR convencional *multiplex*. Estas amostras foram quantificadas para avaliação da carga parasitária de *T. cruzi* e normalizadas por intestino do inseto coletado (DNA *T. cruzi*/DNA Triatomíneo). Através da qPCR foi possível analisar, por detecção de DNA, a carga parasitária de treze amostras de triatomíneos coletados, que variou entre 10^2 e 10^{11} equivalentes de parasitos/triatomíneo e cuja mediana foi de 10^5 equivalentes de parasito/equivalentes de triatomíneo (Figura 4.6).

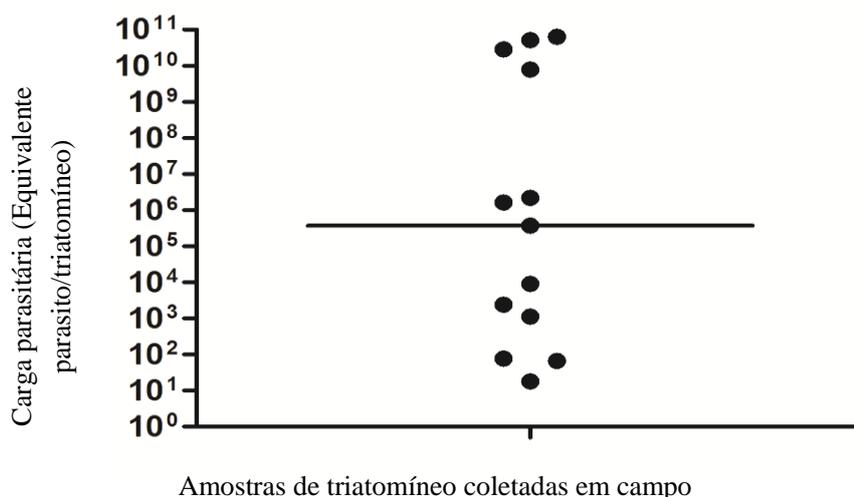


Figura 4.6. Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real *multiplex* de triatomíneos coletados em diferentes regiões do Brasil. Gráfico da carga parasitária normalizada de 13 triatomíneos de campo. A normalização da carga foi feita pela quantidade de DNA do trato digestivo do inseto presente na amostra. A mediana foi de 10^5 equivalentes de parasito/equivalentes de triatomíneo

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE PARASITOS VIÁVEIS EM AMOSTRAS DE INSETOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS

O RNA de *T. cruzi* foi escolhido como marcador de viabilidade celular para determinar e quantificar os parasitos viáveis em amostras de triatomíneos infectados. Para tanto, uma PCR em tempo real com transcrição reversa foi padronizada, tendo como alvo a região 12S do gene do RNA ribossomal de triatomíneos e o gene GAPDH do *T. cruzi*.

Nesta padronização, analisamos a linearidade de detecção da amplificação de cDNA de epimastigotas de *T. cruzi* seguindo as concentrações de iniciadores definidas previamente por Silva-Gomes et al (2014). Foram testadas amostras contendo diferentes concentrações de *T. cruzi*, que variaram de 10^7 a 10^2 equivalentes de parasito. Nestas condições, foi possível obter uma linearidade elevada ($R^2 = 0,99$) e um slope adequado (-3,35) para a quantificação de parasitos viáveis em amostras de triatomíneos (Figura 4.7). Este ensaio nos mostrou também a especificidade dos iniciadores com alvo para o gene constitutivo de *T. cruzi*, GAPDH, uma vez que eles não amplificaram para amostra contendo apenas cDNA do tubo digestivo do triatomíneo (Figura 4.7 B)

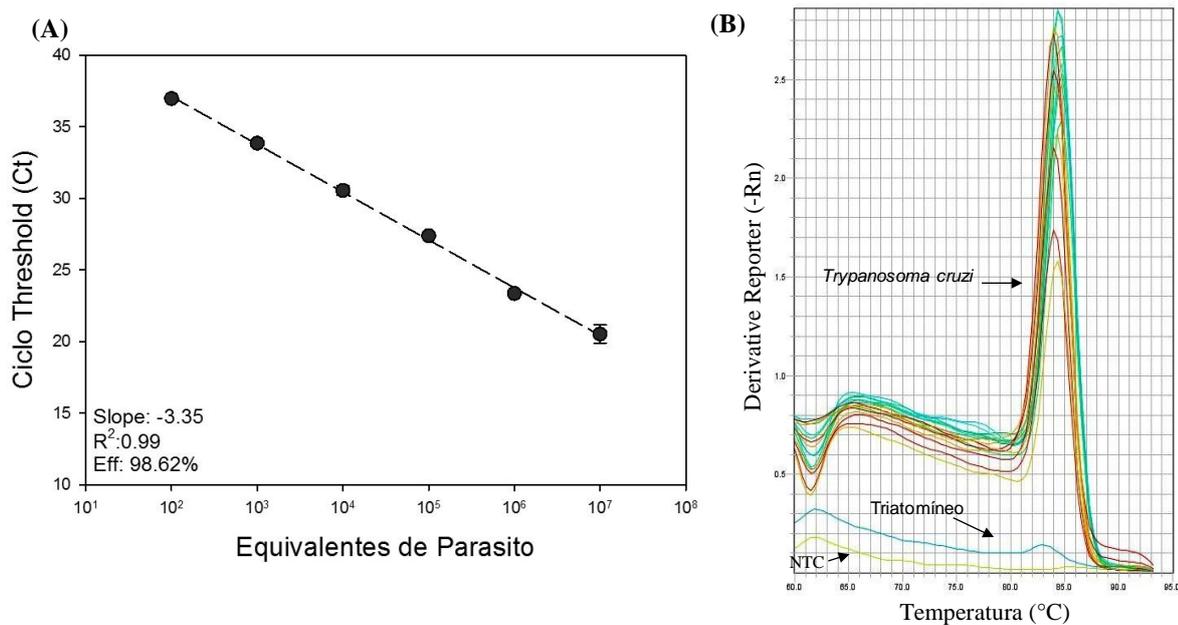


Figura 4.7. (A) Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de *T. cruzi* por RT-PCR em tempo real. Amostras obtidas a partir de diluições seriadas de cDNA extraído de epimastigotas, na faixa de 10^7 a 10^2 equivalentes de parasito. **(B) Curvas de dissociação do ensaio para o GAPDH.**

A linearidade da reação da amplificação de cDNA do tubo digestivo de triatomíneo também foi analisada, no qual foram testadas amostras de cDNA correspondentes a diferentes quantidades do trato digestório de *R. prolixus* não infectados que variaram de 5 até 0,00032 equivalentes de triatomíneo. Sendo assim, foi possível obter uma linearidade elevada ($R^2 = 0,98$) e um slope adequado (-3,26) para a quantificação de amostras de triatomíneos, com uma eficiência de 102,8% (Fig 4.8A). Da mesma forma, foi observado que os iniciadores com alvo para o inseto triatomíneo não amplificaram para amostras contendo apenas cDNA de *T. cruzi*, indicando a especificidade desta reação (Figura 4.8 B).

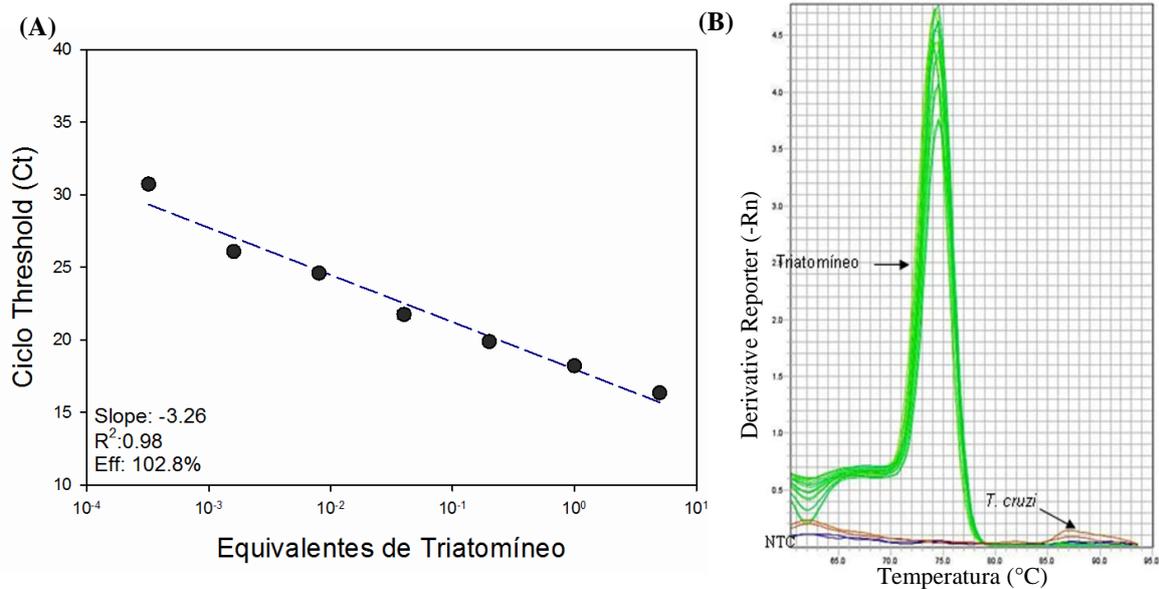


Figura 4.8. (A) Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de *R. prolixus* por RT-PCR em tempo real. Amostras obtidas a partir de diluições seriadas de cDNA extraído de um pool de 5 intestinos, na faixa de 5 até 0,00032 equivalentes de triatomíneo (B) **Curvas de dissociação do ensaio para o 12S do RNA ribossomal de triatomíneos.**

4.4 MONITORAMENTO DA INFECÇÃO DE *T. cruzi* EM *Rhodnius prolixus* APÓS ALIMENTAÇÃO

Uma vez definidos os parâmetros para quantificação da carga parasitária, tanto por DNA quanto por RNA, foi avaliada então, a cinética temporal da infecção do *T. cruzi* em *R. prolixus* durante três alimentações utilizando sangue de coelho contendo as formas epimastigotas do parasito. Para determinar a quantidade de parasitos nas amostras de triatomíneos e para comparar as duas técnicas de quantificação por PCR em tempo real, todo o trato digestivo destes insetos foi dissecado e analisado nos dias 5, 9, 15 e 29 após a alimentação. Além disso, correlacionou-se as técnicas moleculares de quantificação abordadas com a contagem da infecção por microscopia, utilizando câmara de Neubauer. A carga parasitária do *T. cruzi* de DNA, cDNA ou parasitos foi normalizada pela quantidade de DNA, cDNA ou do tubo digestivo de triatomíneo presente em cada amostra.

Ao fazer uma análise estatística de Pearson, não foi possível estabelecer uma correlação significativa entre os dados gerados pelas três metodologias abordadas neste

ensaio ($P > 0,050$). Ou seja, foram observadas diferenças nos resultados obtidos entre a quantificação por detecção de DNA, RNA e microscopia (Figura 4.9).

Em relação à contagem pela câmara de Neubauer, os valores se mostraram menores quando comparados as outras duas técnicas (Figura 4.9 A). Em contrapartida, quando comparamos os resultados obtidos pelas duas técnicas moleculares para quantificação, observamos que ambas mostraram uma diminuição da carga parasitária ao longo dos dias após alimentação, todavia o RNA (Figura 4.9 B) apresentou uma queda mais acentuada do parasito a partir do 9º dia após a alimentação enquanto o DNA (Figura 4.9 C) não apresentou uma alteração significativa do dia 9 para o dia 15 após alimentação. Além disso, os valores da quantificação por detecção do RNA nos dias 15 e 29 (médias de 14316,3 equivalentes de parasito/triatomíneo e 19030,6 equivalentes de parasito/triatomíneo, respectivamente) são menores que os valores observados na quantificação por detecção de DNA (médias de 53116 equivalentes de parasito/triatomíneo e 21316,4 equivalentes de parasito/triatomíneo, respectivamente).

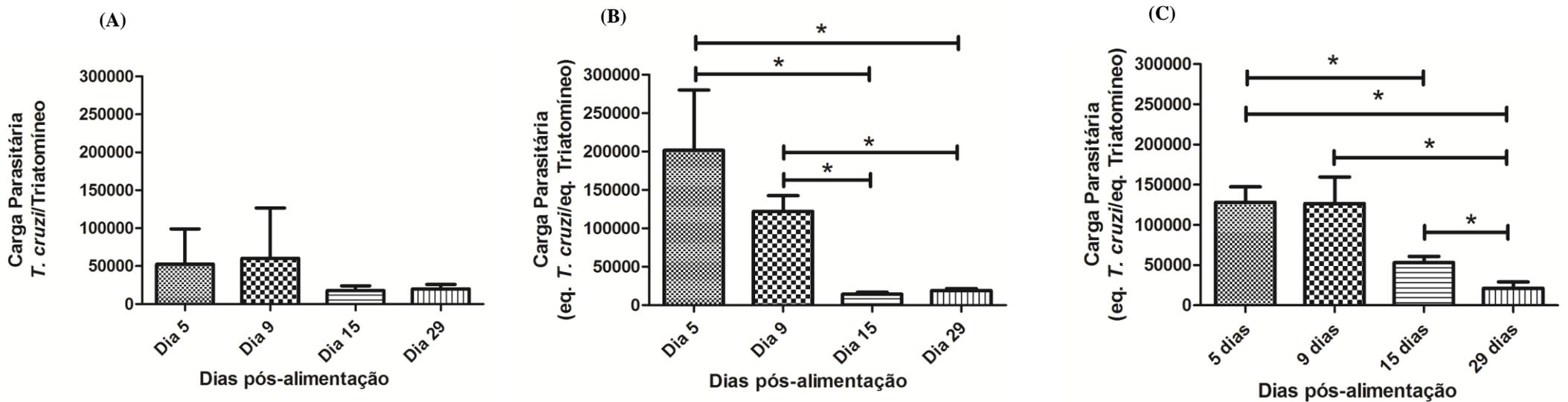


Figura 4.9. Comparação de três métodos para quantificação da carga parasitária em amostras de triatomíneos infectados experimentalmente. (A) Contagem ao microscópio através da Câmara de Neubauer (B) Quantificação de parasitos através da detecção do RNA por RT-qPCR (C) Quantificação de parasitos através da detecção do DNA por qPCR multiplex Dados de três alimentações com sangue de coelho contendo as formas epimastigotas do parasito (n = 3). Análise feita com um pool de 5 tubos digestivos inteiros de *R. prolixus* 5, 9, 15 e 29 dias após alimentação.

4.5 ANÁLISE DA INFECCÃO DE *T. cruzi* EM DIFERENTES PORÇÕES DO TRATO DIGESTIVO DE *R. prolixus*

Após analisar o desenvolvimento do *T. cruzi* em todo o trato digestivo do vetor, foi feita então uma avaliação da cinética temporal da infecção deste parasito em diferentes porções do trato digestivo de triatomíneos, a fim de avaliarmos mudanças na carga parasitária em dois segmentos do sistema digestório do triatomíneo ao longo da infecção.

O tubo digestivo de *R. prolixus* foi dissecado e separado em duas porções distintas, intestino médio anterior e intestino médio posterior + reto, que foram analisadas nos dias 9 e 29 após a alimentação utilizando sangue de coelho contendo epimastigotas. A quantificação da carga parasitária foi feita tanto por detecção de DNA quanto por RNA e foi normalizada pela quantidade de DNA e cDNA de triatomíneo presente em cada amostra.

Através da detecção por DNA (Figura 4.10 A) observamos que o *T. cruzi* permanece na porção anterior média do intestino até o 29º dia após alimentação, mesmo havendo uma queda na quantidade de parasitos neste segmento do dia 9 (média de 13842,8 equivalentes de parasito/triatomíneo – 92,1 %) para o dia 29 (média de 200,37 equivalentes de parasito/triatomíneo – 1,34 %). Opostamente, há um aumento da carga parasitária do dia 9 (média de 102,82 equivalentes de parasito/triatomíneo – 0,71 %) para o dia 29 (média de 1089,25 equivalentes de parasito/triatomíneo – 7,25 %) quando analisamos o intestino médio posterior + reto do triatomíneo (Figura 4.10 A).

Na quantificação da carga parasitária através da detecção por RNA (Figura 4.10 B), também observamos que o *T. cruzi* permanece na porção anterior média do intestino até o 29º dia após alimentação. No entanto, a queda na quantidade de parasitos no segmento anterior médio no dia 9 (média de 81623,60 equivalentes de parasito/triatomíneo – 100%) para o dia 29 (média de 10799,80 equivalentes de parasito/triatomíneo – 4,65 %) foi menor do que a observada no ensaio de quantificação por DNA. Na porção média posterior + reto observa-se um aumento da carga parasitária do dia 9 (média de 6653 equivalentes de parasito/triatomíneo – 8,16 %) para o dia 29 (média de 20825,50 equivalentes de parasito/triatomíneo – 25,52 %) (Figura 4.10 B).

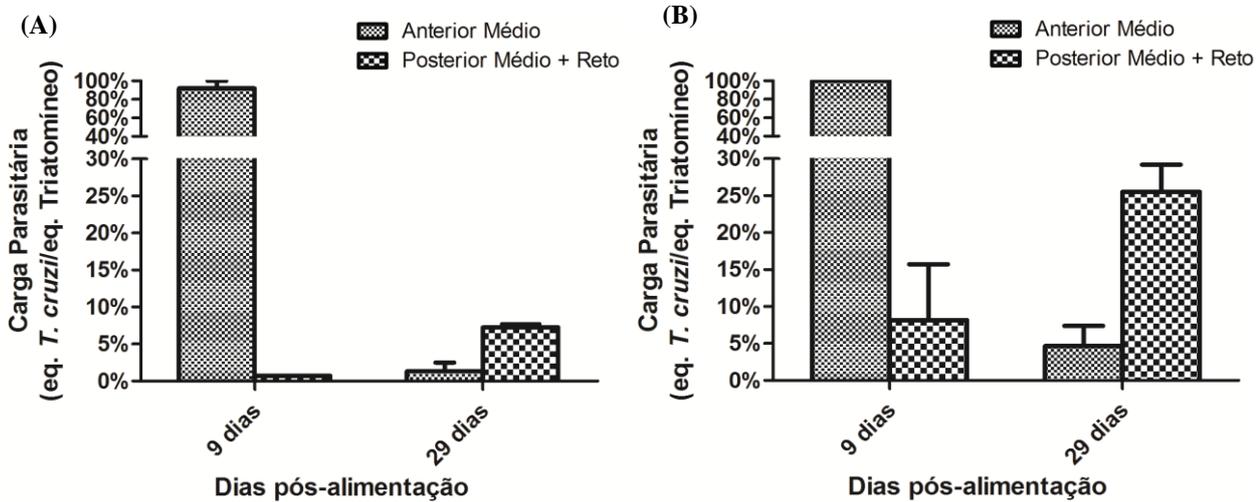


Figura 4.10. Quantificação da carga parasitária em diferentes porções do trato digestivo de triatomíneos infectados experimentalmente. (A) Detecção do DNA por qPCR *multiplex*. (B) Detecção do RNA por RT-qPCR. Dados em porcentagem de uma alimentação com sangue de coelho contendo as formas epimastigotas do parasito (n = 1). Análise feita com um pool de 5 intestinos médio anterior e um pool de 5 intestinos médio posterior + reto de *R. prolixus*.

4.6 PADRONIZAÇÃO RT-qPCR PARA DIFERENCIAR EPIMASTIGOTAS DE TRIPOMASTIGOTAS

Para a diferenciação das formas tripomastigotas e epimastigotas em amostras de insetos infectados, avaliamos a expressão do gene *Tcs5* que corresponde a um grupo de enzimas trans-sialidase, altamente expressas em formas tripomastigotas metacíclicas.

O primeiro ensaio para a esta padronização, foi feito com o objetivo de testar se o par de iniciadores selecionados com alvo para o gene *TcS5* seria capaz de detectar de forma diferenciada as formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Para tanto, foi realizado uma RT-PCR convencional onde os alvos foram cDNA de epimastigota, cDNA de tripomastigota, cDNA de amastigota, cDNA de triatomíneo, e cDNA de triatomíneo infectado experimentalmente com formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Os produtos deste ensaio foram analisados em gel de agarose 2,5% e nos permitiu testar a especificidade da reação, uma vez que os iniciadores com alvo para o gene *TcS5* não mostraram amplificação da banda de 144 pb para amostras de cDNA de epimastigota ou cDNA de triatomíneo, mas apresentaram uma forte banda na amostra correspondente a formas tripomastigotas (Figura 4.11 A).

O próximo experimento consistiu na seleção de uma temperatura de anelamento para o par de iniciadores com alvo para o gene TcS5. Foi realizada uma PCR gradiente, com amostras reconstituídas do tubo digestivo de triatomíneos contendo tripomastigotas (Dm28c) obtidos a partir de infecção de células VERO. Nesta PCR, testou-se as seguintes temperaturas de anelamento: 59°C, 60°C, 61°C, 62°C e 63°C. Observamos que a temperatura de anelamento de 60°C apresentou uma banda de amplificação do produto de 144 pb mais forte que as bandas das demais temperaturas (Figura 4.11 B).

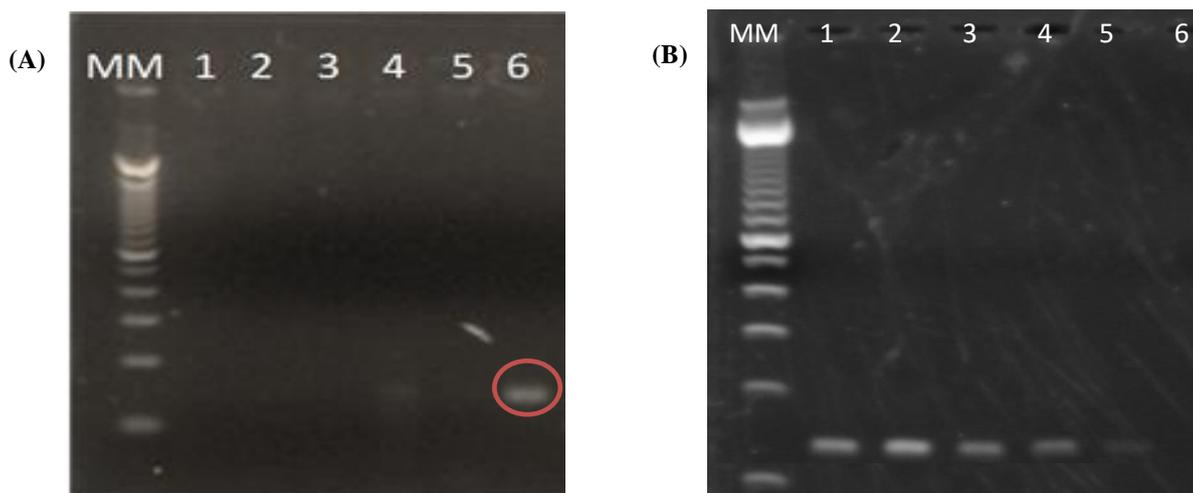


Figura 4.11. Produtos do ensaio de RT-PCR convencional A) Ensaio da especificidade do gene correspondente à proteína trans-sialidase (TcS5). MM: Marcador Molecular 100 pb; 1 – 6: TcS5 (1. DNA *T. cruzi* epimastigota; 2. DNA inseto; 3. DNA *T. cruzi* epimastigota+Triatomíneo; 4. cDNA Amastigota; 5. cDNA Epimastigota; 6. cDNA Tripomastigota (círculo vermelho) B) PCR gradiente para seleção da melhor temperatura de anelamento para os iniciadores com alvo no gene TcS5. MM: Marcador Molecular; 1. 59°C; 2. 60°C; 3. 61°C; 4. 62°C; 5. 63°C; 6. Controle negativo da reação.

Partindo para a padronização de uma RT-PCR em tempo real, sistema SYBR Green, capaz de amplificar distintivamente amostras contendo as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, foi feito um ensaio com o objetivo de testar a especificidade dos iniciadores selecionados para a reação. Para tanto, foi realizado uma RT-qPCR, utilizando os iniciadores com alvo na região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos, para o GAPDH e para o gene TcS5 e foram submetidas amostras contendo cDNA de triatomíneo não infectado, 10 ng de cDNA de *T. cruzi* epimastigotas e 10 ng de cDNA de *T. cruzi* tripomastigotas.

Este experimento (Tabela 4.7; Figura 4.12) nos mostrou que o par de iniciadores com alvo para a região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos amplifica apenas para amostras contendo cDNA do inseto, que os iniciadores com alvo no gene GAPDH de *T. cruzi* não apresentam diferenças significativas de Cts nas amostras com a mesma concentração de cDNA de tripomastigotas (Ct médio de 16,98) e epimastigotas (Ct médio de 16,67). Entretanto, em relação ao TcS5, as amostras de cDNA de tripomastigotas (Ct médio de 17,33) apresentaram uma diferença de 16 Cts das amostras de cDNA de epimastigotas (Ct médio de 33,61).

Tabela 4.7 Ensaio de especificidade dos primers selecionados para a reação de RT-qPCR, capaz de detectar diferenciadamente as formas tripomastigotas (valores de Ct \pm DP). Foram ensaiadas amostras com cDNA de intestino de inseto não infectado (10 ng), cDNA de *T. cruzi* tripomastigotas (10 ng) e cDNA de *T. cruzi* epimastigotas (10 ng).

	Alvo TcS5 (Ct médio \pm DP)	Alvo TcGAPDH (Ct médio \pm DP)	Alvo 12s (Ct médio \pm DP)
Intestino Triatomíneo (5) 10ng	—	—	5,31 \pm 0,23
Tripomastigota 10ng	17,33 \pm 0,02	16,98 \pm 0,55	—
Epimastigota 10ng	33,61	16,67 \pm 0,20	—

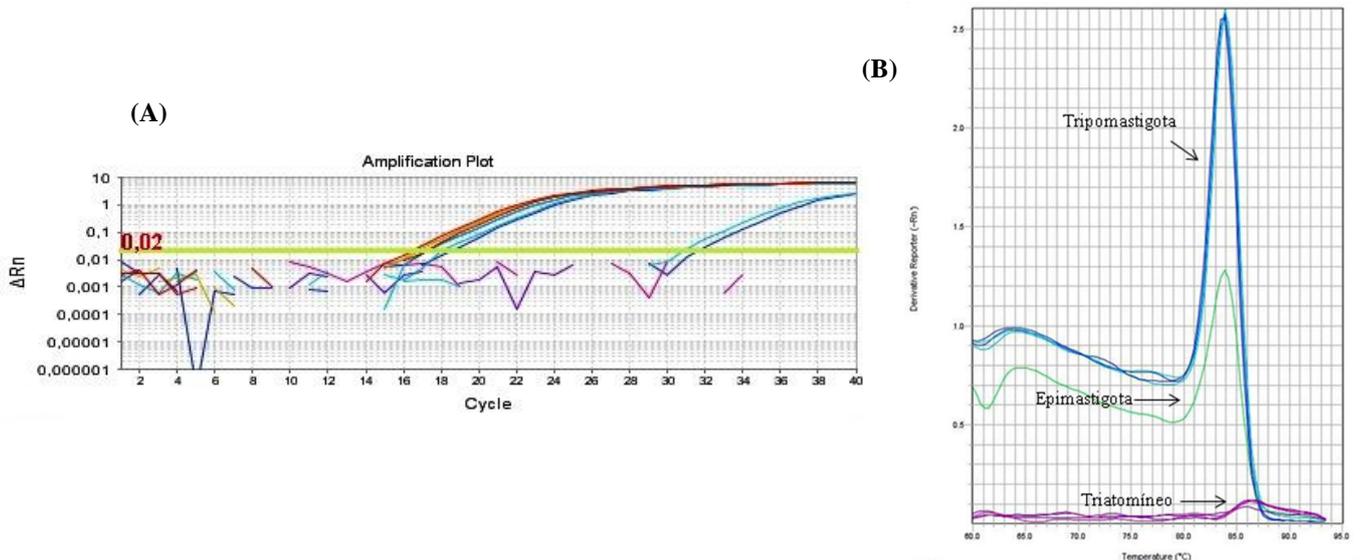


Figura 4.12. (A) Curvas de amplificação dos primers TcS5 no ensaio de RT-qPCR. Amostras de cDNA de triatomíneo não infectado, 10 ng de cDNA de *T. cruzi* epimastigotas e 10 ng de cDNA de *T. cruzi* tripomastigotas para o alvo TcS5. **(B) Curvas de dissociação do TcS5.**

Nesta padronização também analisamos a linearidade de detecção da amplificação de cDNA de tripomastigotas de *T. cruzi*. Foram testadas amostras contendo diferentes concentrações de tripomastigotas de *T. cruzi* obtidos em cultura de células VERO, que variaram de 10^7 a 10^3 equivalentes de parasito. Desta forma, foi possível obter uma linearidade elevada ($R^2 = 0,98$) e um slope adequado (-3,36) para a quantificação de parasitos viáveis em amostras de triatomíneos (Figura 4.13).

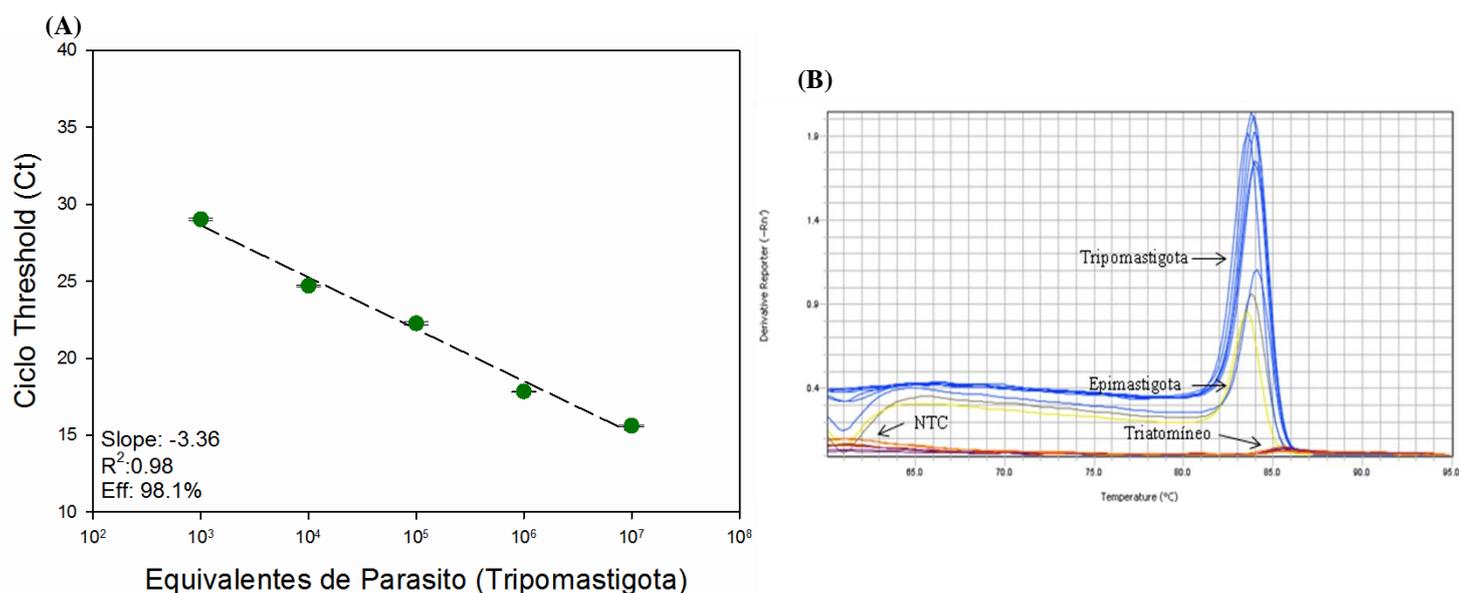


Figura 4.13. (A) Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de *T. cruzi* por RT-PCR em Tempo real. Amostras obtidas a partir de diluições seriadas de cDNA extraído de tripomastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtidos em cultura de célula VERO. **(B) Curvas de dissociação do ensaio para o TcS5**

4.7 AVALIAÇÃO DA METACICLOGÊNESE EM AMOSTRAS DE *R. Prolixus*

A partir da padronização desta RT-qPCR para quantificação diferenciando tripomastigotas de epimastigotas, foi avaliada então, a carga parasitária de uma infecção experimental de *T. cruzi* em *R. prolixus* durante uma alimentação utilizando sangue de coelho contendo as formas epimastigotas do parasito. Para determinar a quantidade de parasitos viáveis totais e de tripomastigotas nas amostras de triatomíneos, todo o trato digestivo destes insetos foi dissecado e analisado nos dias 5, 9, 15 e 29 após a alimentação.

Neste experimento observamos uma queda gradativa na quantidade de *T. cruzi* no trato digestivo do inseto ao longo dos dias após alimentação (média de 24330,3

equivalentes de parasito/triatomíneo no dia 5; 14665,3 equivalentes de parasito/triatomíneo no dia 9; 11587,8 equivalentes de parasito/triatomíneo no dia 15; 10048 no dia 29 pós alimentação). No entanto, ao analisarmos a metaciclogênese do *T. cruzi* em todo o trato digestivo do inseto vetor, observamos a detecção de formas tripomastigotas (média de 205,91 equivalentes de parasito/triatomíneo) pela RT-qPCR apenas no 29º dia após alimentação (Figura 4.14).

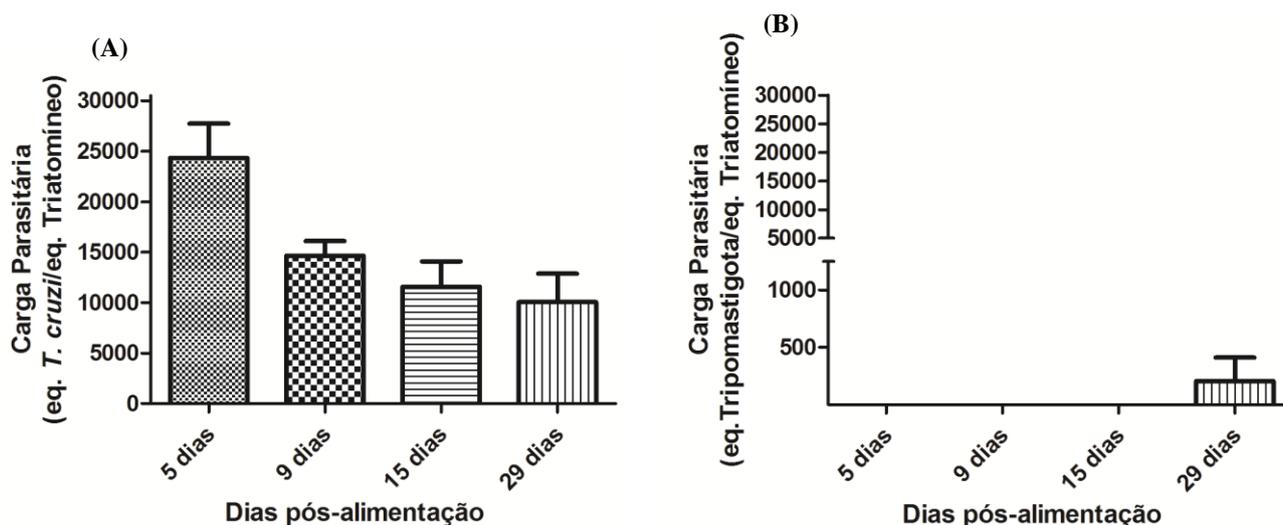


Figura 4.14. Quantificação da carga parasitária em amostras de triatomíneos infectados experimentalmente. (A) Quantificação de parasitos através da detecção do RNA por RT-qPCR com alvo no gene GAPDH do *T. cruzi* (B) Quantificação de parasitos através da detecção do RNA por RT-qPCR com alvo no gene TcS5. Dados de uma alimentação com sangue de coelho contendo as formas epimastigotas do parasito (n = 1). Análise feita com um pool de 5 intestinos de *R. prolixus* 5, 9, 15 e 29 dias após alimentação.

5. DISCUSSÃO

O método clássico de descrição de infecção natural de triatomíneos por *T. cruzi* é o exame microscópico do conteúdo intestinal dissecado. As doenças emergentes e re-emergentes necessitam de diagnósticos mais rápidos, sensíveis e específicos. Porém, o diagnóstico convencional apresenta certas limitações, com resultados inconclusivos e discordantes (Brasil, 2005). Com o advento da PCR em tempo real, foi possível desenvolver protocolos para quantificar patógenos nas mais variadas amostras, como sangue (Piron, 2007; Duffy et al., 2013; Moreira et al., 2013), tecidos (Cummings & Tarleton, 2003) e fezes, tornando viável a elaboração de um protocolo para avaliar de forma acurada a carga parasitária em triatomíneos infectados com *T. cruzi* (Uehara et al., 2012; Dias et al., 2015).

Comparando-se a metodologia de PCR convencional com a PCR em tempo real, a primeira requer uma maior manipulação, o que eventualmente pode gerar contaminação cruzada entre amostras, além do resultado mais demorado, considerando a etapa posterior de detecção e visualização dos produtos amplificados por eletroforese em gel. Em contrapartida, a PCR em tempo real apresenta vantagens como por exemplo, a rápida análise dos resultados, pois a amplificação e a detecção do alvo ocorre em um mesmo passo do ensaio.

Com as vantagens oferecidas pela tecnologia baseada na PCR, ensaios moleculares para detectar agentes infecciosos têm sido amplamente utilizados em muitos laboratórios clínicos para diagnóstico e monitoramento da progressão de uma doença diante de uma terapia específica. E, embora esteja muito difundido, ainda existe muita divergência acerca dos requisitos necessários para se padronizar um teste molecular para diagnóstico (Bustin et al., 2009; Burd, 2010). Em 2011, pesquisadores da América Latina reconheceram a necessidade de se estabelecer uma padronização, através de laboratórios de diferentes países para o desenvolvimento destes testes visando diagnóstico e tratamento da doença de Chagas (Schijman et al., 2011). Para este trabalho, a padronização da PCR em tempo real foi feita seguindo os requisitos exigido pela CLIA - *Clinical Improvement Amendments* (Burd, 2010), cujo principal objetivo das regulamentações é garantir precisão, confiabilidade e adequação dos resultados gerados, independente de qual laboratório estejam sendo realizados. Para tanto, o CLIA estabelece testes de padronização que devem ser minimamente cumpridos para a

validação de um ensaio clínico, tais como de acurácia, precisão, sensibilidade (Limite de Detecção) e especificidade (inclusividade e exclusividade) analítica e linearidade da reação.

Em 2012, Uehara e colaboradores publicaram o desenvolvimento de uma metodologia de PCR em Tempo real quantitativa, sistema SYBR Green, usando como alvos o DNA nuclear satélite de *T. cruzi* e a região 12S do gene do RNA ribossomal de triatomíneo. Com esta técnica de PCR em tempo real, foi possível quantificar com precisão a carga parasitária em *Rhodnius prolixus* infectados por *T. cruzi*. Com base no desenho dos iniciadores para o triatomíneo publicados por Uehara e colaboradores, foi desenvolvida uma sonda para o mesmo alvo da região 12S do gene do RNA ribossomal de triatomíneo, o que permitiu que padronizássemos, no presente trabalho, uma reação de PCR em Tempo real, *multiplex*, usando o sistema TaqMan.

Uma importante possibilidade oferecida pela PCR é a realização de técnicas conhecidas como *multiplex*, que permite a amplificação de diferentes sequências alvos dentro de uma única amostra através da detecção de sinais de fluorescência em canais óticos distintos. Uma vantagem no uso do sistema TaqMan está relacionada à esta possibilidade de se executar uma reação em *multiplex*, no qual é realizável, por exemplo, a amplificação concomitante de vários patógenos infecciosos ou de mais de um marcador genético em um mesmo tubo de reação. Diversos trabalhos relatam a importância dos ensaios baseados no sistema *multiplex*, uma vez que permitem assegurar quanto a qualidade do ensaio molecular (Piron et al., 2007; Moreira et al., 2013; Duffy et al., 2013).

A amplificação, por PCR, do DNA de amostras do trato digestório de insetos triatomíneos pode apresentar inibição na reação, uma vez que já na etapa de extração do DNA pode ocorrer a copurificação de diversos potenciais inibidores de PCR (Schrader et al., 2012). Dentre estes inibidores tem-se, por exemplo polissacarídeos produzidos pela microbiota presente no inseto, fragmentos de hemoglobina liberados durante a hemólise na porção anterior do intestino médio (Azambuja et al., 2005), hemozoina produzida na porção posterior do intestino médio (Oliveira et al., 1999), heparina usada como anticoagulante, entre outros. A ausência de elementos inibidores nestas amostras evita, portanto, resultados de diagnóstico falso negativos para detecção do *T. cruzi*; o que pode ocorrer quando se trabalha com material de alta complexidade, como é o caso de intestino dissecado de insetos triatomíneos.

A inclusão de um controle interno de amplificação visa a eliminação destes falso-negativos que ocorrem devido à presença de inibidores da reação de amplificação, já o uso de genes normalizadores permite uma análise de materiais que apresentam muita variação devido ao seu tamanho, quantidade, bem como qualidade empregados. Para corrigir estas variações entre as amostras e certificar a qualidade das amostras de DNA extraídas a partir dos triatomíneos, nós utilizamos o DNA de inseto como controle interno da reação e simultaneamente como normalizador da carga parasitária. Nogueira e colaboradores (2015) também utilizam como normalizador da PCR em tempo real, o DNA do triatomíneo, empregando iniciadores com alvo para um gene de proteína transmembrana em *Rhodnius prolixus*, que codifica uma proteína semelhante a aquaporina. Já Dias e colaboradores (2015) usaram como normalizador da carga parasitária um DNA exógeno (plasmídeo contendo pLew82).

Para a detecção e quantificação da carga parasitária nós escolhemos os iniciadores e sonda que amplificam para o DNA nuclear satélite de *T. cruzi*, visto que estudos prévios mostraram que o uso destes iniciadores apresentaram uma alta sensibilidade e especificidade em amostras de sangue infectados com *T. cruzi* que foram analisadas através de PCR em tempo real (Piron et al., 2007; Ramírez et al., 2009; Schijman et al., 2011; Duffy et al., 2013; Moreira et al., 2013). Os resultados dos nossos testes de padronização, usando amostras de intestino de triatomíneos, foram concordantes com os resultados apresentados para amostras de sangue. É importante ressaltar que o valor encontrado para o Limite de Detecção neste trabalho (0,41 equivalentes de parasita) foi muito próximo ao encontrado por Duffy e colaboradores (2013) em amostras de sangue humano, que é de 0,47 equivalentes de parasito/mL.

No entanto, a análise dos produtos amplificados nos permitiu observar que não houve diferenciação na detecção de *T. cruzi* e *T. rangeli* na PCR em tempo real (Tabela 4.1, Figura 4.1), quando foi utilizado como alvo o DNA nuclear satélite de *T. cruzi*. Este resultado já tinha sido observado por Duffy e colaboradores (2013), no qual eles fizeram um teste de exclusividade com amostras de *Leishmania major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *T. rangeli*. Neste experimento, todas as amostras, com exceção de *T. rangeli*, não apresentaram amplificação para o DNA nuclear satélite de *T. cruzi*.

A espécie *T. rangeli* apresenta características biológicas e uma distribuição geográfica muito semelhante à de *T. cruzi*, pois compartilha os mesmos reservatórios

animais, permitindo a ocorrência de co-infecções nos hospedeiros vertebrados e invertebrados em uma mesma área geográfica (Marinkelle, 1972; D'Alessandro et al., 1992). Dessa forma, a diferenciação no diagnóstico destas espécies é extremamente importante para evitar resultados falso-positivos, visto que o *T. rangeli* é bastante estudado no contexto epidemiológico da Doença de Chagas (Vallejo et al., 1999; Guhl & Vallejo, 2003).

Em 2011, Reis desenvolveu uma metodologia baseada em uma PCR convencional em *multiplex* empregando iniciadores para um gene constitutivo de triatomíneos (RNA ribossomal 12S) e para uma sequência do genoma mitocondrial de *T. cruzi* com alvo na região variável do kDNA. Com a padronização desta PCR convencional *multiplex*, foram observadas variações no padrão de bandas de *T. cruzi* (330pb) e *T. rangeli* (360 pb e 760 pb), conforme já descrito e publicado por Vallejo e colaboradores (1999), tornando possível diferenciar estas espécies em amostras de triatomíneos. Dessa forma, a associação dos ensaios de PCR convencional e PCR em tempo real torna-se uma opção de ferramenta que permitirá um diagnóstico específico e a quantificação da carga parasitária de *T. cruzi* em amostras de insetos de campo.

Associando a PCR convencional *multiplex* como complemento a esse diagnóstico para confirmar a ausência ou presença de parasitos em triatomíneos, nós validamos a técnica padronizada de qPCR *multiplex*, no qual foram testadas amostras de diferentes espécies de triatomíneos (*P. lutzii*, *P. megistus*, *T. vitticeps*, *T. sordida*, *T. pseudomaculata*, *T. costalimai*, *T. wygodzinskyi*) coletados em diversas regiões do Brasil (Figura 4.6). Apesar do número de insetos avaliados ter sido pequeno (n=13), os dados gerados levam à uma discussão sobre a aplicação da PCR em tempo real, para a medida da carga parasitária em amostras de triatomíneos coletados em campo, para o diagnóstico e quantificação de *T. cruzi* considerando uma avaliação epidemiológica de locais endêmicos.

Um problema recorrente em relação à quantificação do *T. cruzi* em insetos através da detecção do seu DNA se estende ao fato de que não se está claramente elucidado se a detecção do DNA do parasito corresponde à parasitos vivos na amostra de inseto analisada. Então, com base em estudos prévios que utilizam o RNA do patógeno como marcador de viabilidade (Hellyer et al., 1999; Lahtinen et al., 2008; Payne et al., 2012), este trabalho buscou desenvolver e padronizar uma PCR em Tempo

real com Transcrição Reversa (RT-qPCR), sistema SYBR Green, usando o RNA de *T. cruzi* como marcador de viabilidade celular para avaliar também a quantidade de parasitos nos triatomíneos.

A escolha para o gene GAPDH do *T. cruzi* como alvo para quantificar a carga parasitária foi devido a dados publicados em 2014 por Silva-Gomes e colaboradores, que demonstraram, através de resultados de Cts semelhantes, a expressão constitutiva do gene GAPDH entre diferentes isolados do *T. cruzi* e entre os diferentes estágios evolutivos do parasito. Então, assim como para o DNA, foram realizados ensaios para avaliar o desempenho analítico da RT-qPCR para a quantificação de parasitos viáveis em triatomíneos, usando os iniciadores para o gene GAPDH de *T. cruzi* que foram descritos por Silva-Gomes e colaboradores (2014), como normalizador e controle interno da reação, o mesmo conjunto de iniciadores com alvo para a região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos. A especificidade desta RT-qPCR pôde ser mostrada pelo pico único gerado pela curva de dissociação de ambos os alvos, sendo que a temperatura de dissociação para o GAPDH foi concordante com a publicada por Silva-Gomes (2014).

Até o momento, os estudos acerca da distribuição do *T. cruzi* dentro do inseto vetor tem sido baseada em análises por microscopia óptica do trato digestivo após dissecação do triatomíneo. Nossos resultados mostraram que, em relação a contagem por microscopia pela Câmara de Neubauer, os valores se mostraram menores comparados as outras duas metodologias baseadas na PCR em tempo real, indicando que os resultados das infecções podem estar sendo subestimados. Além disso, a metodologia da PCR em tempo real desenvolvida para detectar e quantificar parasitos presentes no inseto vetor da Doença de Chagas nos permitiu determinar um número de parasitos em escalas muito abaixo do que se obtém usando a Câmara de Neubauer ($<10^2$ parasitas/inseto). Experimentos com amostras reconstituídas de sangue contaminado com *T. cruzi* mostraram que uma análise através de PCR convencional é capaz de detectar o equivalente de um parasito em 10-20 mL de sangue (Moser et al., 1989; Britto et al., 1993). Duffy e colaboradores (2013), usando a técnica de qPCR para quantificação do DNA nuclear satélite de *T. cruzi* em amostras de sangue, conseguiram detectar menos de um equivalente de parasito/mL de sangue. Dias e colaboradores (2015), que usaram a técnica de qPCR para quantificação do DNA nuclear satélite de *T. cruzi* em amostras de

intestino de triatomíneo, também detectaram menos de um equivalentes de parasito com a aplicação da técnica.

Estudos prévios têm mostrado que a cinética da colonização do *T. cruzi* no trato digestivo depende de diversos parâmetros que dependem da espécie do inseto vetor, da natureza da microbiota do intestino, bem como da cepa de parasito, visto que cepas diferentes de *T. cruzi* mantêm níveis distintos de infecção no triatomíneo (Mello et al., 1996; Garcia et al., 2007; Araújo et al., 2007; Araújo et al., 2014). Nossos dados sobre a cinética do *T. cruzi* (Dm28c) em *R. prolixus*, mostraram que, apesar de diferenças significativas na quantidade da carga parasitária entre as metodologias para detecção de DNA e para RNA, ambas as curvas da carga parasitária mostraram um perfil semelhante de diminuição do parasito ao longo dos dias. Esta queda na quantidade de parasitos, a partir da segunda semana pós infecção, também foi relatada por Henriques e colaboradores (2012), no qual aplicaram uma metodologia de quantificação através da análise por bioluminescência emitida por uma cepa geneticamente modificada para expressar o gene da luciferase (Dm28c-luc).

No entanto, nossos dados mostraram uma diminuição muito mais rápida na quantidade de RNA quando comparando com os resultados observados na detecção por DNA. Estes resultados sugerem que, ao chegarem no intestino médio anterior do inseto, primeiro ponto de contato entre os *T. cruzi* ingeridos e a superfície do trato digestivo do vetor (Kollien & Schaub, 2000; Ferreira et al., 2016), uma porção significativa destes parasitos é lisado devido a interação com bactérias presentes na microbiota do local (Azambuja et al., 2005; Garcia et al., 2010), mas que o DNA continua circulante por mais tempo, enquanto o RNA é rapidamente degradado após a lise do parasito.

Para avaliar se esta queda inicial também ocorre por conta da migração do parasito da porção anterior do intestino para o intestino médio posterior, foi avaliada então, a infecção do *T. cruzi* em diferentes porções do trato digestivo de triatomíneos nos dias 9 e 29 após alimentação. Assim como observado por estudos prévios (Henriques et al., 2012; Nogueira et al., 2015; Dias et al., 2015), nossos resultados mostraram uma diminuição na quantidade de parasitos no intestino médio anterior do dia 9 ao 29 após infecção e, opostamente, um aumento no intestino médio posterior, tanto pela detecção do DNA quanto pelo RNA.

Geralmente, a análise dos vários estágios de desenvolvimento do *T. cruzi* nos hospedeiros invertebrados natural e experimentalmente infectados é classificada com base nas características morfológicas e pela observação da movimentação ativa dos flagelados por microscopia óptica. O desenvolvimento de uma RT-qPCR capaz de diferenciar as formas tripomastigotas e epimastigotas em amostras de insetos infectados, com a finalidade de aprimorar o diagnóstico da infecção de triatomíneos por *T. cruzi*, torna possível uma melhor análise acerca da taxa de metaciclogênese em triatomíneos. Um dos processos mandatórios para que o ciclo de vida do *T. cruzi* consiga se completar é a transformação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas na porção final do trato digestivo do inseto.

O genoma do *T. cruzi* apresenta uma variedade de genes que codificam diversas moléculas de superfície, incluindo a superfamília das Trans-sialidases e Trans-sialidases-like (El Sayed et al., 2005). A função das trans-sialidases é retirar o ácido siálico do hospedeiro vertebrado e transferi-lo para a membrana do parasito, já que por sua vez, o protozoário não é capaz de sintetizar ácido siálico *de novo*. Esta etapa representa um importante papel na interação celular e na modulação do reconhecimento de microrganismos patogênicos pelas células hospedeiras dos mamíferos (Schenkman et al., 1994; Douglas et al., 2008).

Para a detecção diferenciada das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, foram selecionados iniciadores com alvo para o gene TcS5, devido a dados anteriores de Freitas e colaboradores (2011), que mostraram uma elevada expressão do gene Tcs5 em formas tripomastigotas. Por outro lado, as formas epimastigotas apresentaram níveis basais na expressão deste gene. Ao fazermos uma análise dos iniciadores selecionados para o alvo TcS5, também observamos uma diferença na expressão do gene TcS5 entre as formas do parasito que são encontradas no inseto vetor. A diferença de aproximadamente 16 Cts entre as amostras indica que o gene TcS5 tem uma expressão, aproximadamente, 2^{16} vezes maior em tripomastigotas se comparado as formas epimastigotas. No entanto, apesar de terem sido feitos testes para padronização desta RT-qPCR, tendo sido possível gerar uma curva padrão e observar a linearidade da reação, ainda são necessários ensaios testando diferentes cepas do parasito para averiguarmos se existem diferenças na amplificação do gene TcS5 para as diversas DTUs de *T. cruzi*.

Para avaliação da metaciclogênese do *T. cruzi* (Dm28c) em *R. prolixus*, foram feitos ensaios preliminares para se determinar a quantidade de parasitos viáveis totais e de tripomastigotas nas amostras de triatomíneos em uma infecção. Novamente foi observada uma queda gradativa na quantidade de *T. cruzi* no tubo digestivo do inseto ao longo dos dias após alimentação. Ao analisarmos a metaciclogênese do *T. cruzi* em todo o trato digestivo do inseto vetor, observamos a detecção de formas tripomastigotas apenas na quarta semana após alimentação, enquanto Henriques e colaboradores (2012) observam formas tripomastigotas a partir da terceira semana após alimentação. Essas diferenças nos nossos resultados podem ser devido a análise em todo o trato digestivo e não nas suas diferentes porções, uma vez que a metaciclogênese ocorre no reto dos triatomíneos e, portanto, as formas tripomastigotas são encontradas na porção final do trato digestivo destes insetos (Ferreira et al. 2016), podendo acarretar em uma diminuição na sensibilidade da reação.

O presente trabalho nos mostrou que as ferramentas moleculares usadas para a detecção tanto de DNA quanto RNA apresentaram resultados que, em conjunto, sugerem o uso potencial da PCR em Tempo real para o diagnóstico molecular diferenciado para *T. cruzi* e sua aplicação em estudos de competência vetorial.

6. CONCLUSÃO

A PCR em tempo real *multiplex* mostrou que os dois pares de iniciadores escolhidos foram capazes de detectar simultânea e paralelamente, DNA de *T. cruzi* e DNA de triatomíneos.

De acordo com os testes feitos para a padronização da PCR em tempo real (Sistema TaqMan) *multiplex*, determinou-se que:

A temperatura de anelamento de 58°C apresentou menores diferenças nos valores médios de Ct das amostras

- Concentrações de *primers* e sondas
 - 150 nM de sonda com alvo em DNA de triatomíneos
 - 250 nM de sonda com alvo em DNA de *T. cruzi*
 - 600 nM/600 nM de iniciadores com alvo em DNA de *T. cruzi*;
 - 300 nM/500 nM de iniciadores com alvo em DNA de triatomíneos

Confirmou-se a considerável sensibilidade da qPCR *multiplex*, uma vez que foi alcançado um limite de detecção de 0,41 equivalente de parasitos

O ensaio de qPCR permitiu um diagnóstico específico e a quantificação da carga parasitária de *T. cruzi* em amostras de insetos de campo

A utilização de RNA como marcador de viabilidade celular nos ensaios de RT-qPCR, com iniciadores para o gene GAPDH, revelou sensibilidade e especificidade no ensaio e possibilitou a detecção/quantificação de parasitos viáveis em amostras contendo intestino de triatomíneo.

As diferenças nos resultados obtidos entre as três metodologias abordadas neste trabalho confirmou a sensibilidade das técnicas moleculares em relação a técnica de visualização do parasito por microscopia óptica.

As diferenças observadas nas curvas de quantificação da carga parasitária, tanto na análise por DNA quanto por RNA, confirmaram a maior estabilidade do DNA quanto à degradação no trato digestivo de *R. prolixus*.

Os resultados obtidos através da análise molecular das diferentes porções do trato digestivo nos sugerem que a amplitude na carga parasitária se dá em função do número de parasitos que foi inicialmente ingerido pelo inseto no momento da infecção.

Em relação a RT-qPCR capaz de diferenciar formas epimastigotas das formas tripomastigotas, mesmo com dados preliminares, foi possível observar que o GAPDH

não diferencia as formas tripomastigotas de epimastigotas. Porém o alvo TcS5 possui, pelo menos, 2^{16} mais cópias na forma tripomastigota em comparação a forma epimastigota.

7. PERSPECTIVAS

Com o término do desenvolvimento da reação de RT-PCR em Tempo real, esperamos quantificar de maneira diferenciada diferentes porções do intestino de *R. prolixus*. Para que se estabeleça um único ensaio de quantificação da carga parasitária com uma alta resolução e sensibilidade, visamos desenvolver e padronizar uma RT-qPCR *triplex* usando o sistema TaqMan, através do desenvolvimento de sondas para os alvos GAPDH, TcS5 e 12s do RNA ribossomal de triatomíneos. Dessa forma, buscaremos validar o RNA como marcador de viabilidade de *T. cruzi* na interação com o hospedeiro invertebrado. Além disso, almejamos avaliar, em relação a viabilidade e metaciclogênese do parasito, a dinâmica da interação de isolados de *T. cruzi* pertencentes às diferentes DTUs com seu inseto vetor.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANDRADE LO, ANDREWS NW. The *Trypanosoma cruzi* – host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiol.* 2005; 3(10): 818-823.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão da Doença de Chagas Aguda por Alimentos. 2008; Informe Técnico (35). Brasília.

ARAÚJO CAC, CABELLO PH, JANSEN AM. Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: in vitro and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. *Acta Trop.* 2007; 101:225–231.

ARAÚJO CAC, WANIEK PJ, JANSEN AM. TcI/TcII co-infection can enhance *Trypanosoma cruzi* growth in *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors.* 2014; 7:94.

ARGOLO A, FELIX M, COSTA J. Doença de Chagas e seus vetores no Brasil In: AÇÃO COMEMORATIVA DO CENTENÁRIO DE DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS, 2009 1 CD. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2009.

AUFDERHEIDE AC, SALO W, MADDEN M, STREITZ J, BUIKSTRA J, GUHL F, ARRIAZA B, RENIER C, WITTMERS LE, FORNACIARI G, ALLISON M. A 9,000-year record of Chagas disease. *PNAS.* 2004; 101 (7): 2034–39.

ÁVILA HA, PEREIRA JB, THIEMANN O, DE PAIVA E, DEGRAVE W, MOREL CM, SIMPSON L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polymerase chain reaction amplification of Kinetoplast Minicircle DNA: Comparison with serologic and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31 (9): 2421 – 26.

ÁVILA AR, DALLAGIOVANNA B, YAMADA-OGATTA SF, MONTEIRO-GOES V, FRAGOSO SP, KRIEGER MA, GOLDENBERG S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genet Mol Res.* 2003; 2(1): 159–168.

AZAMBUJA P, GARCIA ES., RATCLIFFE N. A. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol.* 2005; 21 (12): 568–572.

BAYER-SANTOS E, CUNHA-E-SILVA N.L, YOSHIDA N, DA SILVEIRA JF. Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasit Vectors*. 2013; 6:127.

BOTTO-MAHAN C, ORTIZ S, ROZAS M, CATTAN PE, SOLARI A. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2005; 100 (3): 237-239.

BRASIL - Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde-Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro. 2005; 38 (3).

BRAZ LMA, RAIZ R, AMATO NETO V, ALÁRCON RS, GAKYIA E, OKAY TS. The detection of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: comparison of a PCR-based assay with microscopical examination. *Ann Trop Med Parasitol*. 2007; 101 (5): 461-5.

BRENER Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In Dias JCP, COURA JR (eds), *Clínica e terapêutica da Doença de Chagas. Um Manual Prático para o Clínico Geral* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486p; 25 – 31.

BRENIERE SF, BOSSENO MF, REVOLLO S, RIVERA MT, CARLIER Y, TIBAYRENC M. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *Am J Trop Med Hyg*. 1992; 46(3):335-41.

BRENIÈRE SF, BOSSENO MF, TELLERÍA J, CARRASCO R, VARGAS F, YAKSIC N, NOIREAU F. Field application of PCR diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53 (2): 179-184.

BRICEÑO-LEÓN R. La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. *Cad Saúde Pública*. 2009; 25 (supl.1): S71-82.

BRISSE S, VERHOEF J, TIBAYRENC M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon gene further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol*. 2001; 31 (11): 1218-1226.

BRITO CM, LIMA MM, SARQUIS O, PIRES MQ, COUTINHO CF, DUARTE R, PACHECO RS. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer–polymerase chain reaction. *Parasitol Res.* 2008; 103(5): 1111–1117.

BRITTO C, CARDOSO MA, WINCKER P, MOREL CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993; 88 (1): 171-172.

BRITTO C, CARDOSO MA, VANNI CMM, HASSLOCHER-MORENO A, XAVIER SS, OELEMANN W, SANTORO A, PIRMEZ C, MOREL CM, WINCKER P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology.* 1995; 110 (Pt 3): 241-247.

BRITTO C, SILVEIRA C, CARDOSO MA, MARQUES P, LUQUETTI A, MACÊDO V, FERNANDES O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96 (6): 823-826.

BRITTO CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104 (supl 1): 122-135.

BRUTUS L, SCHNEIDER D, POSTIGO J, ROMERO M, SANTALLA J, CHIPPAUX JP. Congenital Chagas disease: Diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta Trop.* 2008; 106 (3): 195-199.

BURD EM. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Disease. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23 (3): 550-576.

BURGOS JM, BEGHER SB, FREITAS JM, BISIO M, DUFFY T, ALTICHEH J, TEIJEIRO R, LOPEZ AH, DECCARLINI F, FREILIJ H, LEVIN MJ, LEVALLE J, MACEDO AM, SCHIJMAN AG, Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73 (6): 1016–1018.

BURGOS JM, ALTICHEH J, BISIO M, DUFFY T, VALADARES HM, SEIDENSTEIN ME, PICCINALI R, FREITAS JM, LEVIN MJ, MACCHI L, MACEDO AM, FREILIJ H, SCHIJMAN AG. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol.* 2007; 37 (12): 1319–1327.

BURGOS JM, BEGHER S, SILVA HM, BISIO M, DUFFY T, LEVIN MJ, MACEDO AM, SCHIJMAN AG. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 78: 294–297.

BURGOS JM, DIEZ M, VIGLIANO C, BISIO M, RISSO M, DUFFY T, CURA C, BRUSSES B, FAVALORO L, LEGUIZAMON MS, LUCERO RH, LAGUENS R, LEVIN MJ, FAVALORO R, SCHIJMAN AG. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 2010; 51 (5): 485–495.

BURGOS JM, RISSO MG, BRENÌÈRE SF, BARNABÉ C, CAMPETELLA O, LEGUIZAMÓN MS. Differential distribution of genes encoding the virulence factor trans-sialidase along *Trypanosoma cruzi* Discrete typing units. *PLoS ONE.* 2013; 8(3).

BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL MW, SHIPLEY GL, VANDESOMPELE J, WITTEWER, CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem,* 2009; 55 (4): 611–622.

CAMARGO EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med São Paulo.* 1964; 6:93-100.

CAMPBELL DA, WESTENBERGER SJ, STURM NR. The Determinants of Chagas Disease: Connecting Parasite and Host Genetics. *Curr Mol Med.* 2004; 4(6): 549-562.

CHAGAS C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909; 1:11-80.

CHAGAS-FILHO C. Histórico sobre a doença de Chagas, In: CANÇADO, JR (editor). ed Doença de Chagas, Belo Horizonte, Imprensa Oficial. 1974; 5-21.

COMINETTI MCC, DE ALMEIDA RFC, GONÇALVES GMA, ANDREOTTI R. Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev. Soc. Bra. Med. Trop. 2013; 46 (3): 277-280.

CONTRERAS VT, MOREL CM, GOLDENBERG S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mol Biochem Parasitol. 1985; 14 (1): 83-96.

CORDERO, EM, GENTIL LG, CRISANTE G, RAMÍREZ JL, YOSHIDA N, AÑES N, SILVEIRA JF. Expression of GP82 and GP90 surface glycoprotein genes of *Trypanosoma cruzi* during *in vivo* metacyclogenesis in the insect vector *Rhodnius prolixus*. Acta Trop. 2008; 105 (1): 87-91.

CORTEZ MGR, GONZALES MS, CABRAL MMO, GARCIA ES, AZAMBUJA P. Dynamic development of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*: role of decapitation and ecdysone therapy. Parasitol Res; 2002; 88 (7): 697-703.

COSTA J, ALMEIDA CE, DOTSON EM, LINS A, VINHAES M, SILVEIRA AC, BEARD CB. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98 (4): 443-449.

COURA JR, DIAS JCP, MACEDO VO. Doença de Chagas. In: COURA, JR (editor). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2005; 1: 557-593.

COURA JR. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102 (Suppl. I): 113-122.

COURA JR, DIAS JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (1): 31-40.

COURA JR, BORGES-PEREIRA J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 2010; 115 (1-2): 5-13.

COURA JR, VIÑAS PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* 2010; 465 (Suppl.): S6-7.

COURA JR, BORGES-PEREIRA J. Chagas Disease: What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev Soc Brasil Med Trop.* 2012; 45 (3): 286-296.

COURA JR, JUNQUEIRA ACV. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107 (2): 145-154.

COURA, JR. The main sceneries of Chagas Disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions – A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110 (3): 277-282.

CUMMINGS KL, TARLETON RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 129 (1): 53-59.

D'ALESSANDRO A, GORE-SARAVIA N. *Trypanosoma rangeli*. In: Kreier JP, Baker JR, editors. *Parasitic protozoa. Vol. V. Part II.* San Diego, CA, USA: Academic Press. 1992; 1–54.

DE FREITAS VLT, DA SILVA SCV, SARTORI AM, BEZERRA RC, WESTPHALEN EVN, MOLINA TD, TEIXEIRA ARL, IBRAHIM KY, SHIKANAI-YASUDA MA. Real time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* co-infection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4+ level. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5 (8): e1277.

DE SOUZA W. From the Cell Biology to the Development of New Chemotherapeutic Approaches Against Trypanosomatids: Dreams and Reality. *Kinetop Biol Dis.* 2002; 1: 3-24.

DE SOUZA W. Electron microscopy of trypanosomes – a historical view. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103 (4): 313–325.

DIAS, JCP. Controle da Doença de Chagas. In: DIAS JCP, COURA JR (eds). Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Um Manual Prático para o Clínico Geral [online]. 1997; Rio de Janeiro: editora FIOCRUZ. 453-468.

DIAS JCP, SILVEIRA AC, SCHOFIELD CJ. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America – A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97 (5): 604-612.

DIAS JCP. Chagas disease: successes and challenges. Cad Saúde Publica. 2006; 22 (10): 2020-2021.

DIAS JCP. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (Suppl. I): 41-45

DIAS FA, GUERRA B, VIEIRA LR, PERDOMO HD, GANDARA ACP, DO AMARAL RJV, VOLLÚ RE, GOMES SAO, LARA FA, SORGINE HF, MEDEI E, LAGERBLAD P, SALMON D. Monitoring the parasite load in the digestive tract of *Rhodnius prolixus* by combined qPCR analysis and imaging techniques provides new insights into Trypanosome life cycle. PLoS Negl Trop. Dis. 2015; 9 (10): e0004186.

DIAZ C, NUSSENZWEIG V, GONZÁLES A. An Improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. The Am J Trop Med Hyg. 1992; 46 (5): 616-623.

DORN PL, ENGELKE D, RODAS A, ROSALES R, MELGAR S, BRAHNEY B, FLORES J, MONROY C. Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas vectors. Am J Trop Med Hyg. 1999; 60 (5): 740- 745.

DORN PL, FLORES J, BRAHNEY B, GUTIERREZ A, ROSALES R, RODAS A, MONROY C. Comparison of Polymerase Chain Reaction on fresh tissue samples and fecal drops on filter paper for detection of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96 (4): 503-505.

DOUGLAS KT, BRYCE RA, NERES J. Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease. Drug Discov Today. 2008; 13 (3-4): 110-7.

DUFFY T, BISIO M, ALTCHER J, BURGOS JM, DIEZ M, LEVIN MJ, FAVALORO RR, FREILIJ H, SCHIJMAN AG. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3 (4): 1-10.

DUFFY T, CURA CI, RAMIREZ JC, ABATE T, CAYO NM, PARRADO R, DIAZ-BELLO Z, VELAZQUEZ E, MUÑOZ-CALDERON A, JUIZ NA, BASILE J, GARCIA L, RIASTE A, NASSER JR, OCAMPO SB, YADON ZE, TORRICO F, NOYA BA, RIBEIRO I, SCHIJMAN A. Analytical performance of a *multiplex* Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 7(1): e419.

ELIAS MC, DA CUNHA JP, DE FARIA FP, MORTARA RA, FREYMULLER E, SCHENKMAN S. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. *Protist*. 2007; 158(2): 147–157.

EL-SAYED NM, MYLER PJ, BARTHOLOMEU DC, NILSSON D, AGGARWAL G, TRAN AN, GHEDIN E, WORTHEY EA, DELCHER AL, BLANDIN G, WESTENBERGER SJ, CALER E, CERQUEIRA GC, BRANCHE C, HAAS B, ANUPAMA A, ARNER E, ASLUND L, ATTIPOE P, BONTEMPI E, BRINGAUD F, BURTON P, CADAG E, CAMPBELL DA, CARRINGTON M, CRABTREE J, DARBAN H, DA SILVEIRA JF, DE JONG P, EDWARDS K, ENGLUND PT, FAZELINA G, FELDBLYUM T, FERELLA M, FRASCH AC, GULL K, HORN D, HOU L, HUANG Y, KINDLUND E, KLINGBEIL M, KLUGE S, KOO H, LACERDA D, LEVIN MJ, LORENZI H, LOUIE T, MACHADO CR, MCCULLOCH R, MCKENNA A, MIZUNO Y, MOTTRAM JC, NELSON S, OCHAYA S, OSOEGAWA K, PAI G, PARSONS M, PENTONY M, PETTERSSON U, POP M, RAMIREZ JL, RINTA J, ROBERTSON L, SALZBERG SL, SANCHEZ DO, SEYLER A, SHARMA R, SHETTY J, SIMPSON AJ, SISK E, TAMMI MT, TARLETON R, TEIXEIRA S, VAN AKEN S, VOGT C, WARD PN, WICKSTEAD B, WORTMAN J, WHITE O, FRASER CM, STUART KD, ANDERSSON B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005; 309 (5733): 409–415.

ESTEVEES MG; GONZALES-PERDOMO M, ALVIANO CS, ANGLUSTER J, GOLDENBERG S. Changes in fatty acid composition associated with differentiation of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 1989; 50 (1–2): 31–34.

FERNANDES O, SOUTO RP, CASTRO JA, PEREIRA JB, FERNANDES NC, JUNQUEIRA AC, NAIFF RD, BARRETT TV, DEGRAVE W, ZINGALES B, CAMPBELL DA, COURA JR. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. Am J Trop Med Hyg. 1998; 58(6): 807-11.

FERNANDES MC, ANDREWS NW. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. FEMS microbiol reviews. 2012; 36(3): 734-747.

FERREIRA RC, KESSLER RL, LORENZO MG, PAIM RMM, FERREIRA LL, PROBST CM, ALVES-SILVA J, GUARNERI AP. Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. Parasitology. 2016; 143 (4): 434-443.

FREIRE-DE-LIMA L, OLIVEIRA IA, NEVES JL, PENHA LL, ALISSON-SILVA F, DIAS WB, TODESCHINI AR. Sialic acid: a sweet swing between mammalian host and *Trypanosoma cruzi*. Front Immunol. 2012; 3:356.

FREITAS LM, DOS SANTOS SL, RODRIGUES-LUIZ GF, MENDES TA, RODRIGUES TS, GAZZINELLI RT, TEIXEIRA SM, FUJIWARA RT, BARTHOLOMEU DC. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. PLoS One. 2011; 6(10): e25914.

GARCIA ES, AZAMBUJA P. Infection of triatomines with *Trypanosoma cruzi*. In: Crampton J. M., Beard C. B., Loid C. (eds) Molecular biology of insect disease vectors: a methods manual. London, Chapman and Hall. 1997; 146–155

GARCIA ES, RATCLIFFE NA, WHITTEN MM, GONZALEZ MS, AZAMBUJA P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. J Insect Physiol. 2007; 53 (1): 11–21.

GARCIA ES, GENTA FA, DE AZAMBUJA P, SCHAUB GA. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. Trends Parasitol. 2010; 26 (10): 499–505.

GARRAUD O, ANDREU G, ELGHOZZI MH, LAPERCHE S, LEFRÈRE JJ. Measures to prevent transfusion-associated protozoal infections in nonendemic countries. Travel Med Infect Dis. 2007; 5 (2): 110- 112.

GOMES YM. Diagnóstico Etiológico. In: MALTA J. (Org). Doença de Chagas. São Paulo: Savier, 1996. 119-132.

GOMES ML, MACEDO AM, VAGO AR, PENA SD, GALVÃO LM, CHIARI E. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of Polymerase Chain Reaction for detection in human blood. Exp Parasitol. 1998; 88 (1): 28- 33.

GONTIJO ED, QUEIROZ GM, SANTOS SE, JANUÁRIO JN. Triagem Neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. Epidemiologia e Serviço de Saúde, Brasília. 2009; 18 (3): 243-254.

GOURBIÈRE S, DORN P, TRIPET F, DUMONTEIL F. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. Heredity (Edinb). 2012; 108 (3): 190–202.

GUEDES-DA-SILVA, FH, BATISTA DGJ, FULCO TO, ARAÚJO JS, DA SILVA PB, DA SILVA CF, PATRICK DA, BAKUNOVA SM, BAKUNOV AS, TIDWELL RR, OLIVEIRA GM, BRITTO C, MOREIRA OC, SOEIRO MNC. In vitro and In vivo Trypanosomicidal Action of Novel Arylimidamides Against *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob. Agents Chemother. 2016; 60 (4): 2424-34.

GUHL F. Chagas disease in Andean countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102 (Suppl. I): 29-37.

GUHL F, VALLEJO GA. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98 (4): 435-442.

HALL BF, JOINER KA. Developmentally-regulated virulence factors of *Trypanosoma cruzi* and their relationship to evasion of host defences. *J Eukaryot Microbiol.* 1993; 40:207–213.

HASHIMOTO K, SCHOFIELD CJ. Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasit Vectors.* 2012; 5:45.

HELLYER TJ, DESJARDIN LE, HEHMAN GL, CAVE MD, EISENACH KD. Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1999; 37 (2): 290-295.

HENRIQUES C, CASTRO DP, GOMES LH, GARCIA ES, DE SOUZA W. Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection in *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors.* 2012; 5:214.

HIGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, WATSON R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY).* 1993; 11 (9): 1026-1030.

JURBERG J, GALVÃO C. Biology, ecology and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease and implications for human health. *Denisia*, 2006, 19, p. 1096-1116.

KIRCHHOFF LV, PAREDES P, LOMELI-GUERRERO A, PAREDES-ESPINOZA M, RON-GUERRERO CS, DELGADO-MEJÍA M, PEÑA-MUÑOZ JG. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion.* 2006; 46 (2): 298-304.

KIRCHHOFF LV, PEARSON RD. The emergence of Chagas disease in the United States and Canada. *Curr Infect Dis Rep.* 2007; 9 (5): 347-350.

KOLLIEN AH, SCHAUB GA. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion by the starved vector. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59: 166–170, 1998.

KOLLIEN AH, SCHAUB GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol Today.* 2000 16 (9).

LAHTINEN SJ, AHOKOSKI H, REINIKAINEN JP, GUEIMONDE M, NURMI J, OUWEHAND AC, SALMINEN SJ. Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. *Lett Appl Microbiol.* 2008; 46 (6): 693-698.

LENT H, JURBERG J. Observações sobre o ciclo evolutivo, em laboratório, de *Pastrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *An Acad Bras Cienc.* 1969; 41: 125-131.

LENT H, WYGODZINSKY P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Amer Mus Nat Hist.* 1979; 163: 127-520.

LUNARDELLI A, BORGES FP, MELLO KF, ZEFERINO ASA. Soroprevalência da doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. *Rev Bras Anal Clin.* 2007; 39: 139-41.

LUQUETTI AO, RASSI A. Diagnóstico laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. (Org). *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas.* 2000, 2^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 17. p. 344-378.

MACEDO A.M, PENA SDJ. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today.* 1998; 14(3): 199-24.

MALDONADO C, ALBANO S, VETTORAZZI L, SALOMONE O, ZLOCOWSKI JC, ABIEGA C, AMUCHASTEGUI M, CORDOBA R, ALVARELLOS T. Using polymerase chain reaction in early diagnosis of reactivated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation. *J Heart Lung Transpl.* 2004; 23: 1345-1348.

MARIN LJ, CUNHA AA, AQUINO VH, FIGUEIREDO LTM. Desenvolvimento de uma metodologia de PCR semiquantitativo utilizando plasmídeo clonado com parte do gene GB de citomegalovírus. *Med (Ribeirão Preto. online).* 2002; 35 (1): 85-94.

MARINKELLE CJ. Colombian Triatominae and their infestation with trypanosomatid flagellates. Mitt-Inst Colombo-Alemán. Invest Cient. 1972; 6:11–30.

MCDANIEL JP, DVORAK JA. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. Mol Biochem Parasitol. 1993; 57:213-222.

MELLO CB, AZAMBUJA P, GARCIA ES, RATCLIFFE NA. Differential in vitro and in vivo behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. Exp Parasitol. 1996; 82 (2): 112– 121.

MILES MA, LLEWELLYN MS, LEWIS MD, YEO M, BALEELA R, FITZPATRICK S, GAUNT MW, MAURICIO IL. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. Parasitology. 2009; 136:1509–1528.

MOLYNEUX DH, MOREL C. Onchocerciasis and Chagas' disease control: the evolution of control via applied research through changing development scenarios. Br Med Bull. 1998; 54 (2): 327-339.

MONCAYO A, SILVEIRA AC. Current Epidemiological Trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (Suppl. I): 17-30.

MORA MC, SANCHEZ NEGRETTE O, MARCO D, BARRIO A, CIACCIO M, SEGURA MA, BASOMBRÍO MA. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compares with delayed serology. J Parasito. 2005; 91 (6): 1468-1473.

MOREIRA OC, RAMÍREZ JD, VELÁZQUEZ E, MELO MF, LIMA-FERREIRA C, GUHL F, SOSA-ESTANI S, MARIN-NETO JA, MORILLO CA, BRITTO C. Towards the establishment of a consensus real-time PCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. Acta Trop. 2013; 125 (1): 23-31.

MOSER DR, KIRCHHOFF LV, DONELSON JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989; 27 (7): 1477-1482.

MULLIS KB, BALOONA F, SCHARF S, SAIKI RK, HORN G, ERLICH H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polimerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 1986; 51 Pt 1: 263-273.

NOBREGA AA, GARCIA MH, TATTO E, OBARA MT, COSTA E, SOBEL J, ARAUJO WN. Oral transmission of Chagas disease by consumption of Açaí palm fruit, Brazil. Emerg Infect Dis. 2009; 15 (4): 653-655.

NOGUEIRA NP, SARAIVA FMS, SULTANO PE, CUNHA PRBB, LARANJA GAT, JUSTO GA, SABINO KCC, COELHO MGP, ROSSINI A, ATELLA GC, PAES MC. Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have new trigger: Redox Status. PLoS One. 2015; 10(2): e0116712

OLIVEIRA MF, SILVA JR, DANSAPETRETSKI M, DE SOUZA W, LINS U, BRAGA CMS, MASUDA H, OLIVEIRA PL. Haem detoxification by an insect. Nature. 1999; 400: 517–518.

OLIVEIRA FILHO AM. Differences of susceptibility of five triatomine species to pyrethroid insecticides- implications for Chagas disease vector control. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94 (Suppl 1): 425- 428.

PARODI-TALICE A, MONTEIRO-GOES V, ARRAMBIDE N, AVILA AR, DURAN R, CORREA A, DALLAGIOVANNA B, CAYOTA A, KRIEGER M, GOLDENBERG S, ROBELLO, C. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. J. Mass Spectrom. 2007; 42 (11): 1422-1232.

PAYNE RE, WANG F, SU N, KRELL J, ZEBROWSKI A, YAGÜE E, MA X-J, LUO Y, COOMBES RC. Viable circulating tumou cell detection using *multiplex* RNA in situ hybridisation predicts progression free survival in metastatic breas cancer patients. Brit J Cancer. 2012; 106 (11): 1790-1797.

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

PIZARRO JC, LUCERO DE, STEVENS L. PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector, *Triatoma infestans*: high rates found in Chuquisaca, Bolivia. BMC Infect Dis. 2007; 7:66.

PONCE C. Current situation of Chagas disease in Central America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102 (Suppl. I): 41-44.

PORTELA-LINDOSO AAB, SHIKANAI-YASUDA MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. Rev Saúde Pública. 2003; 37 (1): 107-115.

PRATA A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet infect dis. 2001; 1 (2): 92-100.

RAMÍREZ JD, GUHL F, UMEZAWA ES, MORILLO CA, ROSAS F, MARIN-NETO JA, RESTREPO S. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. J Clin Microbiol. 2009; 47: 3945–3951.

RASSI A JR., RASSI A, MARIN-NETO JA. Chagas disease. The Lancet. 2010; 375: 1388–1402.

REIS L. A. Desenvolvimento de um Ensaio Molecular de PCR *multiplex* para a Avaliação da Infecção Natural de Triatomíneos por *Trypanosoma cruzi* [Monografia]. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2011.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 2011; 4ª ed. [Reimp.] Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

RUBIN-DE-CELIS SS, UEMURA H, YOSHIDA N, SCHENKMAN S. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. Cell. Microbiol. 2006; 8:1888–1898.

RUSSOMANDO G, ROJAS DE ARIAS A, ALMIRON M, FIGUEIREDO A, FERREIRA ME, MORITA M. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. Exp Parasitol. 1996; 83: 62-66.

SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985; 230 (4732): 1350-1354.

SALES-CAMPOS H, KAPPEL HB, ANDRADE CP, LIMA TP, MATTOS ME JR, DE CASTILHO A, CORREIA D, GIRALDO LE, LAGES-SILVA E. A DTU-dependent blood parasitism and a DTU-independent tissue parasitism during mixed infection of *Trypanosoma cruzi* in immunosuppressed mice. Parasitol Res. 2014; 113(1):375–85.

SCHENKMAN S, CHAVES LB, PONTES DE CARVALHO LC, EICHINGER D. A proteolytic fragment of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase lacking the carboxyl-terminal domain is active, monomeric, and generates antibodies that inhibit enzymatic activity. J Biol Chem. 1994; 269: 7970-7975.

SCHIJMAN AG, ALTCHER J, BURGOS JM, BIANCARDI M, BISIO M, LEVIN MJ, FREILIJ H. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. J Antimicrob Chem. 2003; 52: 441–449.

SCHIJMAN AG, BISIO M, ORELLANA L, SUED M, DUFFY T, JARAMILLO AMM, CURA C, AUTER F, VERON V, QVARNSTROM Y, DEBORGGRAEVE S, HIJAR G, ZULANTAY I, LUCERO RH, VELAZQUEZ E, TELLEZ T, LEON ZS, GALVÃO L, NOLDER D, RUMI MM, LEVI JE, RAMIREZ JD, ZORRILLA P, FLORES M, JERCIC MI, CRISANTE G, AÑEZ N, DE CASTRO AM, GONZALEZ CI, VIANA KA, YACHELINI P, TORRICO F, ROBELLO C, DIOSQUE P, CHAVEZ OT, AZNAR C, RUSSOMANDO G, BÜSCHER P, ASSAL A, GUHL F, SOSA-ESTANI S, DASILVA A, BRITTO C, LUQUETTI A, LADZINS J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(1):e931.

SHIKANAI-YASUDA MA, MARCONDES CB, GUEDES LA, SIQUEIRA GS, BARONE AA, DIAS JCP, AMATO NETO V, TOLEZANO JE, PERES BA, ARRUDA JR. ER, LOPES MH, SHIROMA M, CHAPADEIRO E. Possible oral transmission of acute Chagas disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1991; 33:351–57.

SHIKANAI-YASUDA MA, OCHS DE, TOLEZANO JE, KIRCHOFF LV. Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Trans R Soc Trop Hyg*. 1996; 90(6): 649-51.

SCHMUNIS GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102 (1): 75-85.

SCHOFIELD CJ, DIAS JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol*. 1999; 42:1-27.

SCHOFIELD CJ, GALVÃO C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop*. 2009; 110: 88-100.

SCHRADER C, SCHIELKE A, ELLERBROEK L, JOHNE R. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012 113: 1014–1026.

SERRANO AA, SCHENKMAN S, YOSHIDA N, MEHLERT A, RICHARDSON JM, FERGUSON MA. The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigotes forms. *J. Biol. Chem*. 1995; 270 (45): 27244-27253.

SILVA-GOMES NL, ENNES-VIDAL V, CAROLO JCF, BATISTA MM, SOEIRO MN, MENNA-BARRETO R, MOREIRA OC. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase1) gene expression is increased due to heat shock and in infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasit Vectors*. 2014; 7:463.

SILVEIRA AC, VINHAES MC. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94: 405-411.

STEINDEL M, KRAMER-PACHECO L, SCHOLL D, SOARES M, DE MORAES MH, EGER I, KOSMANN C, SINCERO TC, STOCO PH, MURTA SM,

DE CARVALHO-PINTO CJ, GRISARD EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 60 (1): 25-32.

STURM NR, DEGRAVE W, MOREL C, SIMPSON NL. 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*. 1989; 33(3): 205-214.

STURM NR, CAMPBELL DA. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2010; 115:35–43.

TEIXEIRA AR, HECHT MM, GUIMARO MC, SOUZA AO, NITZ N. Pathogenesis of Chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Reviews*. 2011; 24(3): 592-630.

UEHARA LA, MOREIRA OC, OLIVEIRA AC, AZAMBUJA P, LIMA APCA, BRITTO C, DOS SANTOS ALS, BRANQUINHA MH, D'ÁVILA-LEVY CM. Cruzipain promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to *Rhodnius prolixus* midgut. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6 (12):e1958

VALENTE SAS. Epidemiologia da transmissão oral da doença de Chagas. Exposição na Mesa Redonda *Situação atual da doença de Chagas na Amazônia*. XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Florianópolis, 2005.

VALLEJO GA, GUHL F, CHIARI E, MACEDO AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop*. 1999; 72 (2): 203- 212.

VANHAMME L, PAYS E. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev*. 1995; 59:223-40.

VICENTE AMATO NETO. Parasitologia: uma abordagem clínica. 2008 [1ª ed]. Rio de Janeiro, editora Elsevier.

VIRREIRA M, TORRICO F, TRUYENS C, ALONSO-VEGA C, SOLANO M, CARLIER Y, SVODOBA M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68 (5): 574-582.

WENDEL S, DIAS JCP. Transfusion-transmitted Chagas disease. In: S. Wendel, Z. Brener, M.G. Camargo, A. Rassi. Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brasil, São Paulo, p. 103-133, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Chagas Disease: Distribution. 2003. Available from: URL: [http:// www.who.int/tdrold/dw/chagas2003.htm](http://www.who.int/tdrold/dw/chagas2003.htm).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2016, Chagas disease (American trypanosomiasis). Available from: URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, Fact sheet N°340, Updated March 2016.

YANG S, ROTHMAN RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4:337-348.

ZINGALES B, MILES MA, CAMPBELL DA, TIBAYRENC M, MACEDO AM, TEIXEIRA MM, SCHIJMAN AG, LEWELLYN MS, LAGES-SILVA E, MACHADO CR, ANDRADE SG, STURM NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012; 12:240–253.