

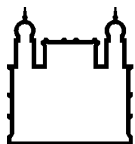
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS
MOLECULARES PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
FORMAS VIÁVEIS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

PAULA FINAMORE ARAUJO

Rio de Janeiro
Dezembro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

PAULA FINAMORE ARAUJO

Desenvolvimento e Validação de metodologias moleculares para a detecção e quantificação de formas viáveis de *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutora em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Otacilio da Cruz Moreira

RIO DE JANEIRO

Dezembro de 2021

Finamore Araujo, Paula.

Desenvolvimento e Validação de metodologias moleculares para a detecção e quantificação de formas viáveis de *Trypanosoma cruzi* / Paula Finamore Araujo. - Rio de Janeiro, 2021.

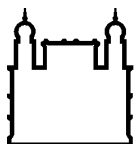
195 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientador: Otacilio da Cruz Moreira.

Bibliografia: f. 85-110

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: PAULA FINAMORE ARAUJO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS MOLECULARES
PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FORMAS VIÁVEIS DE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

ORIENTADOR: Prof. Dr. Otacilio da Cruz Moreira

Aprovada em: 21 / 12 / 2021

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Rafaela Vieira Bruno - Presidente	(Instituto Oswaldo Cruz)
Prof. Dra. Yara Maria Traub-Cseko	(Instituto Oswaldo Cruz)
Prof. Dra. Rita de Cássia Moreira de Souza	(Instituto René Rachou)
Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Júnior	(Instituto Oswaldo Cruz)
Prof. Dra. Suzete Araujo Oliveira Gomes	(Universidade Federal Fluminense)

Rio de Janeiro, 21 de dezembro de 2021



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Biologia Parasitária de **Paula Finamore Araujo**, sob orientação do Dr. Otacilio da Cruz Moreira. Ao vigésimo primeiro dia do mês de dezembro de dois mil vinte e um, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: “**Desenvolvimento e validação de metodologias moleculares para a detecção e quantificação de formas viáveis de *Trypanosoma cruzi***”, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Biologia, na linha de pesquisa: Biologia Celular e Ultra-Estrutura de Parasita, Vetores e Hospedeiros.. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Rafaela Vieira Bruno – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Yara Maria Traub Csekó– IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Rita de Cássia Moreira de Souza – IRR/FIOCRUZ, e como suplentes: Dr. Ademir de Jesus Martins Junior- IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Suzete Araujo Oliveira Gomes - UFF/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 21 de dezembro de 2021.

Dr^a. Rafaela Vieira Bruno (Presidente da Banca): *Rafaela Vieira Bruno*

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa): *Rafael Maciel de Freitas*

À minha família, meus eternos mestres.
Dedico este trabalho, também, ao querido amigo e colega de profissão, Carlos Araújo (*in memoriam*), uma das pessoas mais apaixonadas pela ciência que tive o prazer de conhecer.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer à Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto Oswaldo Cruz, que me permitiram que eu me desenvolvesse profissionalmente desde a época da faculdade. Eu me sinto muito privilegiada por fazer parte desta instituição tão renomada.

Ao meu orientador, Dr. Otacilio Moreira, pela preciosa orientação, pela disposição e por compartilhar ensinamentos que vão além dos adquiridos ao longo do doutorado. Obrigada por contribuir, com tanta dedicação, em meu crescimento profissional desde a época da minha iniciação científica.

Aos membros que compõem a banca de avaliação, Dra. Rita de Cássia, Dra. Yara Traub-Cseko, Dra. Suzete Gomes e Dr. Ademir Martins Jr, por terem aceitado participar da discussão da tese. E à Dra. Rafaela Bruno por toda atenção e troca na revisão da tese.

À coordenação e toda equipe do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária. Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPERJ, por tornar tudo isso possível e por resistirem às atuais tentativas de desmonte.

Aos estimados colegas do LABIMDOE, pela convivência maravilhosa ao longo da minha formação. Esses anos não teriam sido os mesmos sem vocês. Aos amigos que a convivência no LABIMDOE me presenteou, Alice, Anabel, Bernardo, Carolina, Franklin, Gabriel, Geovane, Lara, Raquel e Thais. Cada um de vocês adicionou à minha jornada características intrínsecas de cada um, e me ensinaram coisas incríveis. Em especial agradeço à Dra. Constança Britto e ao Dr. Carlos Alves por me acolherem e fazerem me sentir como parte de uma grande família, isso fez toda a diferença. Às meninas do grupo LabOta, Carolina, Heloísa e Natália, pela disposição e pela troca no laboratório e nos seminários. Aos amigos Daniela, Priscila, Gabriel, pelos risos e conversas que sempre amenizaram o tom de sobriedade da rotina pesada de trabalho, pela ajuda e pelos conselhos diários. Às queridas Amanda e Beatriz que me ajudaram demais nesta reta final e me apoiaram quando eu mais precisei, vocês foram parte importante na minha trajetória.

À Dra. Edith Fernandez-Figueroa e à Dra. Ingerborg Becker, por terem me recebido de braços abertos em seu laboratório Centro de Medicina Tropical na Cidade do México. E a todos os estimados colegas do laboratório: *muchas gracias por todo el apoyo.*

Ao pessoal do LABFISI pela disposição ao me receberem, especialmente à minha querida amiga Kate, a Tainá, a Samara, e a Caroline, que me receberam tão bem e me ajudaram tantas e tantas vezes. À Dra. Daniele Castro e à Dra. Cecília Stahl, pela inestimável colaboração, pelos ensinamentos e pelo privilégio da amizade de vocês.

Aos amigos da pós-graduação pelo companheirismo e amparo, principalmente nas horas do sufoco. Aos “mentes brilhantes”, Luiza, Carina, Gabriela, Gabriel, Ivana, Lucas e Thaíla, as disciplinas não seriam tão enriquecedoras sem a parceria de vocês. Em particular, ao ‘mente brilhante’ Carlos Araújo (*in memoriam*) que mantinha o grupo unido e sempre animado, mesmo nos momentos de perrengue. Sua partida repentina não foi fácil para a gente, mas seu amor pela ciência ficou marcado em todos os seus colegas de turma, com certeza.

Aos meus diversos colaboradores, vocês estimularam o meu processo de treinamento e digo que não seria uma profissional tão completa se não tivesse trabalhado tanto e em tantos projetos diferentes.

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

Aos meus irmãos maravilhosos, que são luz em minha vida, Patrícia e Ivan. Muitíssimo obrigada por ouvirem meus desabafos e por compartilharem algumas de suas vivências com a caçula. Aos meus cunhados Wellington e Lais, tão essenciais na amizade, nas risadas, no ombro amigo e no apoio. Ao Vicente, meu sobrinho, você foi o melhor e mais especial presente que seus pais me deram.

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.

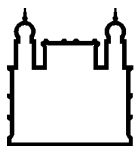
Ao meu namorado e companheiro, Labi, por sempre estar ao meu lado, mesmo em momentos complicados. Obrigada pelas palavras de incentivo e carinho e por acreditar em mim e no meu potencial. À minha sogra, Márcia, por me acolher com tanto amor e sempre me incentivar a ver a vida com mais leveza. Ao meu

sogro, Carlos, pelas trocas científicas e por compartilhar comigo o amor pela biologia.

A todos os meus queridos amigos que a vida fez questão de colocar para iluminar o meu caminho, obrigada por me ouvirem contar entusiasmadamente sobre os meus projetos e meu futuro, pelo apoio e pelo carinho.

A todos vocês, meu muito obrigada por contribuírem, seja direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho e por me apoiarem nessa jornada!

*“Enquanto houver vontade de lutar,
haverá esperança de vencer.”*
Santo Agostinho



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

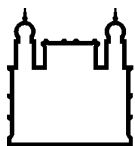
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS MOLECULARES PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FORMAS VIÁVEIS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Paula Finamore Araujo

O *Trypanosoma cruzi* possui um ciclo de vida complexo, se desenvolvendo entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Além disso, a infecção por *T. cruzi* por via oral tem se tornado um dos principais mecanismos de transmissão do ponto de vista da saúde pública, principalmente no Brasil. O açaí (*Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria*) é atualmente uma das frutas amazônicas mais comercializadas no mercado brasileiro e internacional. Métodos moleculares têm sido desenvolvidos para detecção e quantificação rápida do DNA de *T. cruzi*, apresentando vantagens em relação à microscopia óptica, considerada o método clássico de diagnóstico em diversas amostras biológicas. No entanto, uma questão recorrente em relação à detecção/quantificação do DNA do *T. cruzi* está relacionada ao fato de que a amplificação do DNA, em si, não diferencia parasitas viáveis ou mortos. Neste trabalho, padronizamos, a partir do sobrenadante da polpa do açaí estabilizado em um tampão de lise à base de guanidina-EDTA, uma metodologia molecular simples e de alto desempenho, desde a extração de DNA de *T. cruzi* por colunas de sílica, até a quantificação por qPCR *multiplex*, com alvo no satDNA de *T. cruzi* e em um controle interno exógeno. Validamos a metodologia, usando cepas de referência de todas as DTUs de *T. cruzi* e amostras de polpas de açaí comercializadas no município de Coari/AM, que possui histórico prévio de surto oral da doença de Chagas. A qPCR detectou até 0,01 equivalentes de parasita/mL em açaí e, das 45 amostras comerciais analisadas, 9 (20%) foram positivas para *T. cruzi*. Visando avaliar o RNA como um marcador de viabilidade de *T. cruzi* em diferentes tipos de amostras, desenvolvemos uma qPCR com transcrição reversa (RT-qPCR) para quantificar a viabilidade de *T. cruzi*, em comparação à qPCR com alvo em DNA. Em amostras de intestino do vetor triatomíneo *Rhodnius prolixus*, a RT-qPCR apresentou linearidades variando de 10^7 a 10^2 equivalentes de parasito e de 3 a 0,003 equivalentes de intestino, com eficiências de 100,3% e 102,8% para ambos os alvos, respectivamente. Em relação a *R. prolixus* infectado experimentalmente observamos uma diminuição da carga parasitária por meio da detecção de mRNA, que não é acompanhada pela quantificação por DNA, principalmente no 15º dia pós-alimentação. Ao avaliar diferentes porções do trato digestivo, por RT-qPCR, detectamos uma redução significativa da carga parasitária no intestino médio anterior de *R. prolixus* no dia 29 pós-alimentação. Contrariamente, observamos um aumento significativo da carga parasitária no intestino posterior. Além disso, comparando RT-qPCR e qPCR em ensaios de infecção *in vitro* de carbiomioblastos de rato (linhagem H9C2), confirmamos que o RNA é rapidamente degradado após o tratamento das células infectadas com benznidazol, não sendo mais detectado no dia 1 pós-tratamento. Paralelamente, a detecção de DNA do parasita não apresentou diminuição significativa até 4 dias pós-tratamento (dia 5 pós infecção). No geral, o RNA demonstrou ser um potencial marcador molecular de viabilidade de *T. cruzi*, e sua avaliação poderá contribuir para o entendimento da dinâmica da infecção, para explorar novas possibilidades de drogas tripanocidas, e em investigações epidemiológicas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF MOLECULAR METHODS FOR THE DETECTION AND QUANTIFICATION OF *TRYPANOSOMA CRUZI* VIABLE FORMS

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Paula Finamore

Trypanosoma cruzi has a complex life cycle, as it develops between vertebrate hosts, and insect vectors. Besides that, orally acquired *T. cruzi* infection has become one of the most relevant transmission mechanisms from public health perspective, especially in Brazil. Açai (*Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*) is currently one of the most commercialized Amazonian fruits in the Brazilian and international markets. Molecular methods have been developed for rapid detection and quantification of *T. cruzi* DNA, presenting various advantages over optical microscopy, considered the classical method of diagnosis in several biological samples. Nevertheless, a recurring question concerning *T. cruzi* DNA detection/quantification is related to the fact that DNA amplification, by itself, does not differentiate between viable or dead parasites. Herein, a simple and high-performance molecular methodology since DNA extraction based on silica-membrane spin columns, until quantification of *T. cruzi* DNA using a *multiplex* qPCR assay, targeting *T. cruzi* satDNA and an Exogenous Internal Positive Control, was standardized from the supernatant of açai berry pulp stabilized in a guanidine-EDTA lysis buffer. We validated the methodology, using reference strains from all *T. cruzi* DTUs and commercial samples of açai pulp from Coari/AM, a municipality with a previous history of oral Chagas Disease outbreak. The qPCR assay could detect up to 0.01 parasite equivalents/mL in açai, also of the 45 commercial samples analyzed, 9 (20%) showed positivity for *T. cruzi*. In order to evaluate RNA as a marker of *T. cruzi* viability in different samples, we developed a qPCR with reverse Transcription (RT-qPCR) to quantify *T. cruzi* viability while comparing with the qPCR, targeting *T. cruzi* DNA. Analyzing the digestive tract of *Rhodnius prolixus*, the RT-qPCR presented linearities ranging from 10^7 to 10^2 parasites equivalents and 3 to 0.003 intestine unit equivalents, and efficiencies of 100.3% and 102.8% for both targets, respectively. Regarding *R. prolixus* experimentally infected, we observed a decrease in parasite load through mRNA detection, which is not followed by DNA quantification, especially on day 15 after feeding. Moreover, RT-qPCR could detect a statistically significant reduction of the parasite amount in *R. prolixus* anterior midgut on day 29 after feeding when assessing different portions of the digestive tract. Oppositely, we could observe a statistically significant increase of the parasite load in the hindgut on the same day. Moreover, comparing both RT-qPCR and qPCR *in vitro* infection assays with rat cardiomyoblasts (strain H9C2), we confirmed that RNA is shortly degraded after Benznidazole treatment, no longer being detected at day 1 post-treatment. At the same time, parasite DNA detection presented no significant decrease up to 4 days after treatment (day 5 after infection). In general, RNA proved to be a potential molecular marker of *T. cruzi* viability, and its evaluation may contribute to a better understanding of the infection dynamics in vertebrate and invertebrate hosts, exploring new possibilities for trypanocidal drugs and in epidemiological investigations of Chagas disease.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	vi
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
ÍNDICE.....	xii
Índice de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xix
Lista de Siglas e Abreviaturas	xxi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas	1
1.2 Biologia do Parasito.....	1
1.3 O Inseto Vetor	6
1.4 Ciclo Evolutivo.....	9
1.5 Patogênese	11
1.5.1 Tratamento	13
1.6 Aspectos Ecoepidemiológicos da doença de Chagas.....	16
1.6.1 Transmissão Oral da doença de Chagas.....	19
1.7 Diagnóstico Molecular da Infecção por <i>T. cruzi</i>	22
1.7.1 Diagnóstico Molecular da Infecção por <i>T. cruzi</i> em triatomíneos	24
1.7.2 Análise Molecular de Amostras de Açaí contaminadas com <i>T. cruzi</i>	25
1.8 Justificativa.....	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.1.1 Objetivos Específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Cultivo celular de <i>T. cruzi</i>	28
3.2 Manutenção, alimentação e infecção de <i>Rhodnius prolixus</i>	28
3.3 Preparação de amostras de Açaí com Guanidina-EDTA (GEA)	30
3.4 Cultivo de células VERO e obtenção de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	31
3.5 Cultivo e infecção de células H9C2	32

3.6	Ensaio de viabilidade de <i>T. cruzi</i>	33
3.7	Tratamento com Benznidazol.....	33
3.8	Extração de DNA genômico	34
3.9	Extração de RNA e Transcrição Reversa	35
3.10	Obtenção de Curvas Padrão.....	36
3.11	Ensaio de PCR em Tempo Real (qPCR)	37
3.12	Ensaio de RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR).....	39
3.13	Ensaio de Inclusividade e Exclusividade	41
3.14	Análises Estatísticas.....	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Padronização de um novo ensaio de qPCR para quantificação de <i>T. cruzi</i> em amostras de polpa de açaí	42
4.2	Comparação de Kits para Extração de DNA em Insetos.....	47
4.3	Avaliação da infecção de <i>R. prolixus</i> por diferentes DTUs de <i>T. cruzi</i>	52
4.4	Padronização da RT-qPCR para a quantificação absoluta de <i>T. cruzi</i> viáveis	54
4.5	Monitoramento da infecção experimental de <i>T. cruzi</i> em <i>R. prolixus</i> após alimentação	58
4.6	Análise da infecção de <i>T. cruzi</i> em diferentes porções do trato digestivo de <i>R. prolixus</i>	59
4.7	Comparação nas quantificações de parasitos totais, por qPCR, e de parasitos viáveis, por RTqPCR	60
4.8	Quantificação, por DNA e RNA, de <i>T. cruzi</i> viáveis e não viáveis em células H9C2 experimentalmente infectadas.....	63
4.9	Avaliação, através da qPCR e da RT-qPCR, do efeito do tratamento com Benznidazol em uma infecção experimental in vitro	66
5	DISCUSSÃO	68
6	PERSPECTIVAS	82
7	CONCLUSÕES	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	APÊNDICE A - ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Desenho esquemático das principais formas evolutivas de <i>T. cruzi</i>	2
Figura 1-2. Distribuição geográfica aproximada das DTUs de <i>T. cruzi</i> nos ciclos de transmissão doméstico (em vermelho) e silvestre (em azul), e manifestações clínicas	5
Figura 1-3. Estágios de desenvolvimento do ciclo de vida de <i>Panstrongilus megistus</i>	6
Figura 1-4. Distribuição geográfica dos principais vetores de <i>T. cruzi</i> nas Américas	8
Figura 1-5. Esquema do desenvolvimento de <i>T. cruzi</i> ao longo do hospedeiro invertebrado.....	9
Figura 1-6. Doença de Chagas: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	11
Figura 1-7. História natural da doença de Chagas	13
Figura 1-8. (A) Estrutura química do Benznidazol. (B) Rótulo do medicamento de um dos atuais fabricantes de Benznidazol, o laboratório LAFEPE	14
Figura 1-9. (A) Estrutura química do Nifurtimox. (B) Rótulo do medicamento do fabricante de Nifurtimox do fabricante Bayer.....	15
Figura 1-10. Dados epidemiológicos relativos à doença de Chagas em 2002...	17
Figura 1-11. Mapa de imigrantes infectados com <i>T. cruzi</i> morando em países não endêmicos	18
Figura 1-12. A) Doença de Chagas Aguda no Brasil, por municipalidade, entre 2000 e 2010. B) Número de casos de doença de Chagas Aguda no Brasil de acordo com o tipo de transmissão, 2000	20
Figura 3-1. Esquema de preparação de amostras de Açaí com Guanidina-EDTA (GEA) para extração de DNA, utilizando um controle interno exógeno, e posterior análise por qPCR.	31

Figura 4-1. Curvas de amplificação para os alvos DNA nuclear satélite de (A) <i>T. cruzi</i> e (B) EXO-IPC DNA.....	42
Figura 4-2. Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de <i>T. cruzi</i> em amostras de GEA por qPCR <i>multiplex</i> . (A) Amostras obtidas a partir de diluições seriadas de DNA extraído de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (Dm28c) em DNA de GEA, na faixa de 10^6 a 10^0 equivalentes de parasito/mL. (B) Parâmetros da curva padrão para o alvo DNA nuclear satélite do <i>T. cruzi</i>	43
Figura 4-3. Comparação de três kits para extração de DNA com colunas de sílica	48
Figura 4-4. (A) Curvas de amplificação para os alvos IAC e 12S do triatomíneo no ensaio de qPCR. Amostras de DNA de triatomíneo não infectado extraídas com diferentes kits: Macherey-Nagel, Roche e QIAGEN. (B) Curvas de dissociação dos alvos IAC e 12S do triatomíneo.....	50
Figura 4-5. Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de <i>T. cruzi</i> em <i>R. prolixus</i> por qPCR, comparando três kits de extração de DNA. (A) Macherey-Nagel, (B) Roche e (C) QIAGEN.....	51
Figura 4-6. Comparação das cargas parasitárias em amostras de <i>R. prolixus</i> infectados experimentalmente com diferentes DTUs de <i>T. cruzi</i> DTU I, Dm28c; DTU II, Y; DTU III, 3663; DTU IV, 4167; DTU V, LL014; DTU VI, CL Brener.....	54
Figura 4-7. Curvas de amplificação e de dissociação (melting) da RT-qPCR, sistema <i>SYBR Green</i> . Os ensaios foram realizados com cDNA de <i>R. prolixus</i> infectados com <i>T. cruzi</i> (Dm28c). (A) Curvas de amplificação e (B) de dissociação para o alvo TcGAPDH. As setas indicam o controle negativo (NTC) e amostras de <i>R. prolixus</i> não infectado. (C) Curvas de amplificação e (D) de dissociação para o alvo para a região 12s do rRNA de triatomíneo. As setas indicam o NTC e amostras contendo 10^4 <i>T. cruzi</i> /mL.	55
Figura 4-8. Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de <i>T. cruzi</i> viável em <i>R. prolixus</i> , por RT-qPCR <i>singleplex</i> . Para a construção da curva padrão de cada alvo foram feitas diluições seriadas de cDNA de (A) epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , com uma linearidade variando de 10^6 até 10 equivalentes de parasitos; e	

(B) de intestino de <i>R. prolixus</i> com uma linearidade variando de 3 até 0,003 equivalentes de triatomíneo.....	56
Figura 4-9. Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de <i>T. cruzi</i> em <i>R. prolixus</i> , por qPCR <i>multiplex</i> . Para a construção da curva padrão de cada alvo foram feitas diluições seriadas de DNA de (A) epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , com uma linearidade variando de 10^6 até 10^{-1} equivalentes de parasitos; e (B) de intestino de <i>R. prolixus</i> com uma linearidade variando de 3 até 0,003 equivalentes de triatomíneo.....	57
Figura 4-10. Comparação entre quantificação da carga parasitária por DNA e por RNA em amostras de <i>R. prolixus</i> infectados experimentalmente com <i>T. cruzi</i>	59
Figura 4-11. Quantificação da carga parasitária, por RT-qPCR, em diferentes porções do trato digestivo de <i>R. prolixus</i> infectados experimentalmente com <i>T. cruzi</i>	60
Figura 4-12. Comparação entre a detecção por DNA e por RNA de <i>T. cruzi</i> viáveis e não viáveis. Quantificação de parasitos vivos e lisados (A) por DNA; (B) por RNA (C) e através da contagem por microscopia, através da Câmara de Neubauer.....	62
Figura 4-13. Padronização da infecção de células H9C2 utilizando MOI 10:1 de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (Dm28c). (A) Porcentagem de cardiomioblastos infectados; (B) Taxa de formas intracelulares/cardiomioblastos; (C) Índice Endocítico.....	63
Figura 4-14. Quantificação da Carga Parasitária, por DNA e por RNA, nos dias 0, 1, 2, 3, 4 após infecção de células H9C2 infectadas experimentalmente com parasitos vivos e lisados. Quantificação de <i>T. cruzi</i> viáveis e não viáveis (A) por qPCR e (B) por RT-qPCR. (C) Comparação entre a quantificação por DNA e por RNA de parasitos lisados em amostras de H9C2	65
Figura 4-15. Quantificação da Carga Parasitária, por DNA e por RNA, nos dias 2, 3, 4 e 5 após infecção de células H9C2 infectadas experimentalmente com parasitos vivos e tratadas com 10µM de Benznidazol. Quantificação dos grupos controle e sob tratamento com Bz, (A) por qPCR e (B) por RT-qPCR. (C)	

Comparação entre a quantificação por DNA e por RNA em amostras de H9C2 do grupo tratado com Bz.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Conjunto de <i>primers</i> e sondas utilizado para os ensaios de qPCR <i>multiplex</i> em triatomíneos.....	38
Tabela 3.2. Conjunto de <i>primers</i> utilizado para os ensaios de qPCR <i>singleplex</i> em triatomíneos.....	38
Tabela 3.3. Conjunto de <i>primers</i> e sondas utilizado para os ensaios de qPCR <i>multiplex</i> em amostras de GEA e de células H9C2 experimentalmente infectadas.....	39
Tabela 3.4. Conjunto de <i>primers</i> e sondas utilizado para os ensaios de quantificação de parasitos viáveis por RT-qPCR <i>singleplex</i> em triatomíneos..	40
Tabela 3.5. Conjunto de <i>primers</i> e sondas utilizado para os ensaios de quantificação da viabilidade por RT-qPCR <i>singleplex</i> em H9C2 experimentalmente infectadas	40
Tabela 4.1. Ensaio de sensibilidade para amostras de GEA contaminadas artificialmente com diferentes concentrações <i>T. cruzi</i> . Os ensaios foram realizados com DNA genômico obtido de amostras de GEA com concentrações de <i>T. cruzi</i> (Dm28c) variando de 10 a 10 ⁻² equivalentes de parasitas/mL. Em todas as amostras foi utilizado o controle positivo interno exógeno (EXO-IPC). Resultados apresentados como Ct média ± DP.	43
Tabela 4.2. Ensaio de inclusividade para a detecção de diferentes DTUs de <i>T. cruzi</i> em amostras de GEA pela qPCR <i>multiplex</i> . As concentrações de DNA das seis diferentes DTUs de <i>T. cruzi</i> variaram de 10 ⁴ até 10 ⁻¹ equivalentes de parasito/mL. Resultados apresentados como Ct média ± DP	44
Tabela 4.3. Ensaio de exclusividade para a detecção de diferentes espécies de tripanossomatídeos em amostras de GEA pela qPCR <i>multiplex</i> . As amostras de DNA purificado de diferentes espécies de tripanossomatídeos foram ensaiadas em concentrações que variaram de 10 ⁴ até 10 ⁻¹ equivalentes de parasito/mL. Resultados apresentados como Ct média ± DP.	45

Tabela 4.4. Validação do ensaio de quantificação da carga parasitária, por qPCR <i>multiplex</i> . 45 amostras de polpa de açaí coletadas em diferentes pontos de venda na cidade de Coari (Amazonas). As amostras positivas para qPCR estão destacadas em verde. Os resultados foram indicados como Ct médio \pm DP e a carga parasitária mostrada como eq. par./mL.	45
Tabela 4.5. Média dos dados de quantidade e pureza obtidas pelo espectrofotômetro das amostras de DNA de 1 trato digestivo e de <i>pool</i> com 5 tratos digestivos de <i>R. prolixus</i> , extraídos com os kits Macherey-Nagel, Roche e QIAGEN com os respectivos desvios padrão (DP).	49
Tabela 4.6. Média dos Cts (com desvios padrão) obtidos por qPCR de amostras contendo um <i>pool</i> com 5 tratos digestivos e contendo 1 trato digestivo extraídos com os três diferentes kits Macherey-Nagel, Roche e QIAGEN.....	49
Tabela 4.7. Parâmetros da curva padrão para o alvo DNA nuclear satélite do <i>T. cruzi</i>	52
Tabela 4.8. Parâmetros das curvas padrão para os alvos <i>T. cruzi</i> e triatomíneo.	56
Tabela 4.9. Parâmetros das curvas padrão para os alvos satDNA de <i>T. cruzi</i> e 12S rRNA triatomíneo.	58
Tabela 5.1. Comparação entre diferentes metodologias já publicadas para detecção molecular de <i>T. cruzi</i> em amostras de açaí.....	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI: Infusão Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion*)
BOD: Demanda Bioquímica de Oxigênio (*Bio-Oxygen Demand*)
Bz: Benznidazol
CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)
cm: centímetros
Ct: Ciclo Threshold (*Cycle Threshold*)
cDNA: DNA complementar (*Complementary DNA*)
CTAB: Brometo de cetiltrimetilamônio (*Cetyltrimethylammonium bromide*)
DEPC: Dietil Pirocarbonato
DMEM: Meio Eagle Modificado Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido Desoxirribonucléico
DP: Desvio Padrão
DTU: Unidade Discreta de Tipagem (*Discrete Typing Unit*)
EDTA: Ácido Etilenodietildinitrotetracético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
Eq. Par: Equivalentes de parasito
Eq. Triat: Equivalentes de triatomíneo
EXO-IPC: Controle Positivo Interno Exógeno (*Exogenous Internal Positive Control*)
Guanidina-HCl: Cloreto de Guanidina (*Guanidine Hydrochloride*)
h: hora
FIOCRUZ/RJ: Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro
IAC: Controle Interno de Amplificação (*Internal Amplification Control*)
IOC: Instituto Oswaldo Cruz
kDNA: DNA do cinetoplasto (*Kinetoplast DNA*)
LIT: Infusão de Fígado e Triptose (*Liver Infusion Tryptose*)
LOD: Limite de Detecção (*Limit of Detection*)
M: Molar
min: minutos
mL: Mililitros
mM: milimolar

MM: Marcador de Massa Molecular
mRNA: RNA mensageiro
MS: Ministério da Saúde
nM: Nanomolar
nm: nanômetro
NTC: Controle Negativo (*No Template Control*)
OMS: Organização Mundial da Saúde
pb: Pares de Base
PBS: Tampão Salino-Fosfato (*Phosphate-buffered saline*)
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
pH: potencial hidrogeniônico
qPCR: PCR quantitativa (PCR em Tempo real)
RT-qPCR: PCR quantitativa com transcrição reversa (PCR em Tempo Real com transcrição reversa)
RNA: Ácido Ribonucléico
rRNA: RNA Ribossomal
RPM: Rotação por Minuto
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*
satDNA: DNA satélite (*satellite DNA*)
SFB: Soro Fetal Bovino
TBE: Solução Tampão Tris/Borato/EDTA
TcGAPDH: *T. cruzi* gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Threshold: Limiar
UR: Umidade Relativa
UV: Ultravioleta
xg: força gravitacional
WHO: *World Health Organization*
µg: Micrograma
µL: Microlitro
µM: Micromolar

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, que supervisionava uma campanha contra a Malária no Estado de Minas Gerais. 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 os principais reservatórios, além de definir vários outros aspectos clínicos e epidemiológicos relacionados à mesma (Chagas, 1909).

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 et al., 2012). Estudos relacionados a paleoparasitologia sugerem, através da presença de DNA do parasito encontrado em múmias humanas, que a doença de Chagas já afligia o homem há cerca de 9000 anos atrás (Aufderheide et al., 2004).

1.2 Biologia do Parasito

O agente etiológico da doença, *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), é um protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae, classe Kinetoplastida. (Rey, 2011). O *T. cruzi*, bem como outros membros da família Trypanosomatidae, tem como característica a existência de uma única mitocôndria, que se estende por todo o corpo celular. Em uma determinada porção da mitocôndria, há uma matriz complexa, que forma uma organela única que abriga o DNA mitocondrial (kDNA), conhecida como cinetoplasto (De Souza, 2002; De Souza et al., 2017).

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 sanguíneo e sob a forma multiplicativa intracelular, amastigota. Já no hospedeiro invertebrado podem ser encontradas, principalmente, as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, sendo esta última 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 (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. (De Souza, 2002; Coura, 2005; Rey, 2011) (**Figura 1.1**).

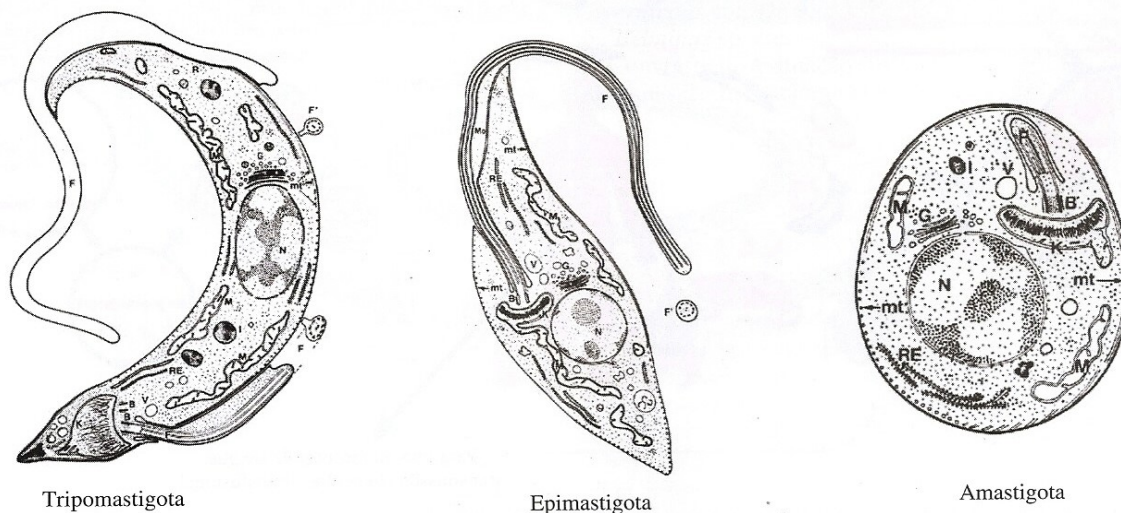


Figura 1-1. Desenho esquemático das principais formas evolutivas de *T. cruzi*. B, blefaroplasto; F, flagelo; G, aparelho de Golgi; I, inclusão citoplasmática; K, cinetoplasto; M, mitocôndria; Mo, membrana ondulante; mt, Microtúbulos, N, núcleo; R, Ribossomos; RE, retículo endoplasmático; V, vacúolo (Retirado de Coura, 2005).

Além das diferenças morfológicas, ocorrem também, durante a metaciclogênese, diversas alterações no parasito, tais como modificações estruturais (Elias et al., 2007), mudanças na composição de carboidratos e na estrutura lipídica da membrana (Esteves, 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 (Parodi-Talice et al., 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; Vanhamme & 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., 2005), assim como na sua complexidade eco epidemiológica (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, relação vetor-parasito-hospedeiro e resposta à terapia (Zingales et al., 2012).

Sua diversidade genética inclui seis Unidades Discretas de Tipagem (DTUs), compreendendo TcI-TcVI, que são um conjunto de unidades populacionais geneticamente mais relacionadas entre si do que para qualquer outra unidade, e que são identificáveis por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (Tibayrenc et al., 1993; Zingales et al., 2012). Isto é, as cepas de *T. cruzi* formam um complexo

de populações multiclonais que diferem em suas características genéticas. O *T. cruzi* é predominantemente diplóide (El-Sayed et al., 2005) e o seu método de replicação celular se dá através de fissão binária. Sob o modelo clonal, novas DTUs surgem do acúmulo de mutações discretas não afetadas por eventos raros de trocas genéticas (Zingales et al., 2012). Recentemente, um novo genótipo de *T. cruzi*, associado a morcegos na região amazônica, central e sudeste do Brasil foi caracterizado (Marcili et al., 2009; Pinto et al., 2012; Ramírez et al., 2014) e incluído na nova classificação de DTUs, que atualmente é dividida em TcI-TcVI e TcBat (Jansen et al., 2015; Zingales, 2018).

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; Pérez-Molina & Molina, 2018) (**Figura 1.2**). A TcI é a mais abundante e amplamente dispersa entre todas as DTUs nas Américas. Sua distribuição geográfica corresponde à dispersão dos triatomíneos pelo continente americano e pode estar associada com os ciclos silvestre e doméstico. A infecção humana com TcI está concentrada no norte da América do Sul e na América Central e está associada com cardiomiopatia chagásica. Há apenas alguns casos discrepantes de infecção e doença no sul da bacia amazônica (Coura, 2007; Zingales et al., 2012). TcII é encontrada predominantemente nas regiões central e sul da América do Sul, mas sua verdadeira extensão ainda não está bem estabelecida, embora esteja relacionada, principalmente, aos ciclos de transmissão doméstica. Dentro de sua principal distribuição geográfica, TcII está associada com manifestações cardíacas, e manifestações digestivas, como megaesôfago e megacólon podem estar presentes (Miles et al., 1981; Fernandes et al., 1999; Lisboa et al., 2008). TcIII é frequentemente associada com o ciclo silvestre no Brasil e em países adjacentes, sendo que infecções humanas documentadas são raras, porém já foram reportados alguns casos de infecção aguda causados por TcIII na região amazônica (Coura, 2007). A TcIV, por sua vez, está associada com o ciclo silvestre no norte da América do Sul e na região amazônica, ocorrendo com certa frequência em humanos, é a causa secundária de doença de Chagas na Venezuela (Miles et al., 1981; Coura, 2007; Zingales et al., 2012). Tc V e VI são duas DTUs híbridas similares, associadas

com doença de Chagas nas regiões central e sul da América do Sul (Zingales et al., 2012).

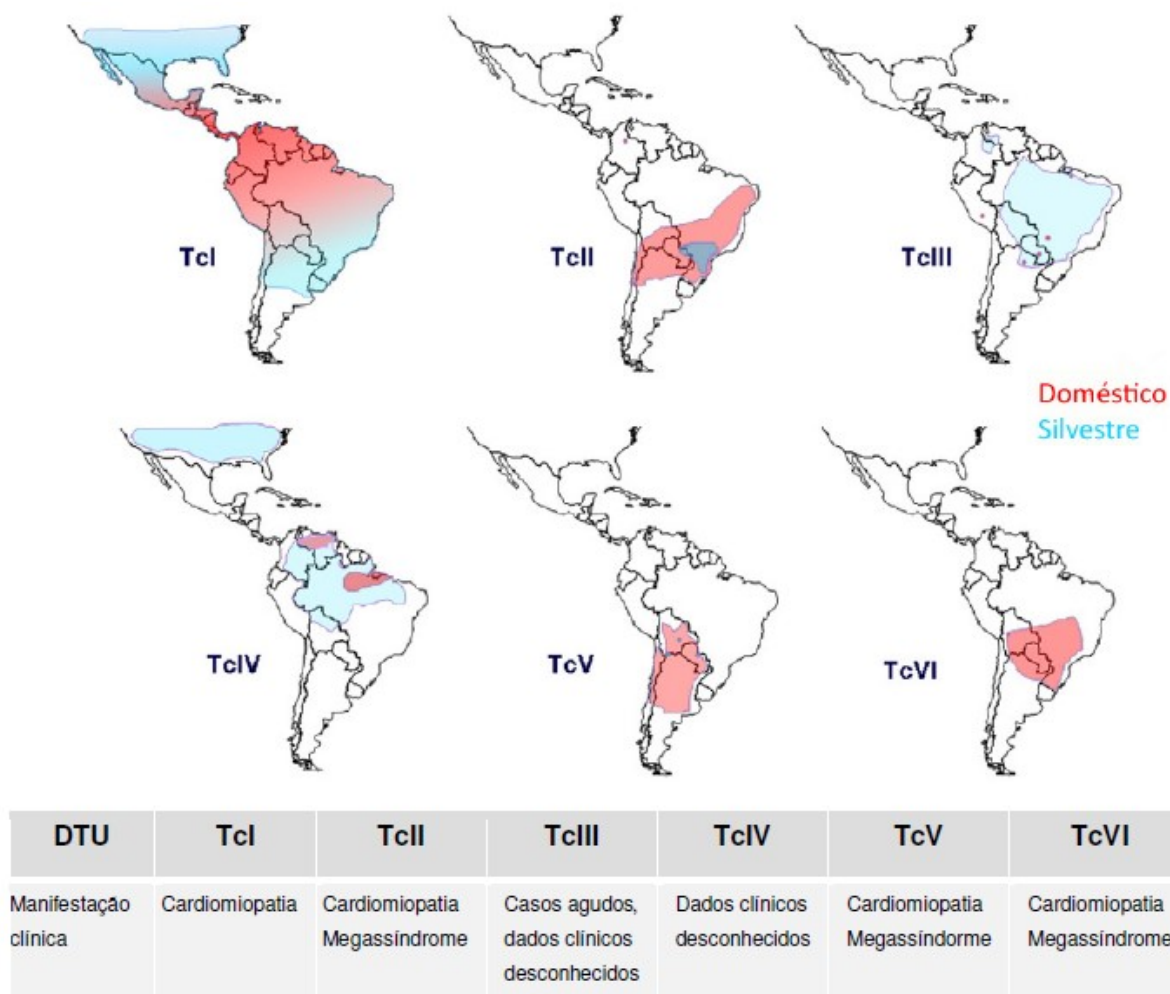


Figura 1-2. Distribuição geográfica aproximada das DTUs de *T. cruzi* nos ciclos de transmissão doméstico (em vermelho) e silvestre (em azul), e manifestações clínicas (Modificado de Zingales et al., 2012).

Entretanto, mesmo que haja uma tendência em apontar barreiras para a distribuição dos genótipos de *T. cruzi*, este processo deve ser analisado de forma dinâmica, uma vez que a transmissão do *T. cruzi* na natureza não é um fenômeno linear e sequencial. Os animais estão constantemente sendo expostos a diferentes DTUs, sendo infectados por uma única DTU, ou por múltiplas, em uma infecção mista, sendo um processo que pode ocorrer uma ou várias vezes. O *T. cruzi* também pode acessar o hospedeiro mamífero por distintas formas infecciosas (orais e contaminantes) e essa dispersão hospedeiro a hospedeiro é assegurada por dezenas de espécies de triatomíneos, que são hematófagos, mas que servem como alimento de várias espécies animais. Com isso, existe a possibilidade da epidemiologia das DTUs estar sendo subestimada na área endêmica da doença de Chagas (Jansen et al; 2015).

1.3 O Inseto Vetor

A transmissão do *T. cruzi* se dá, principalmente, por intermédio dos insetos vetores, denominados triatomíneos e popularmente conhecidos como "barbeiros", devido ao seu hábito de picar o rosto das pessoas. Os triatomíneos são pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae (Chagas, 1909; Lent & Wygodzinsky, 1979) 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**).

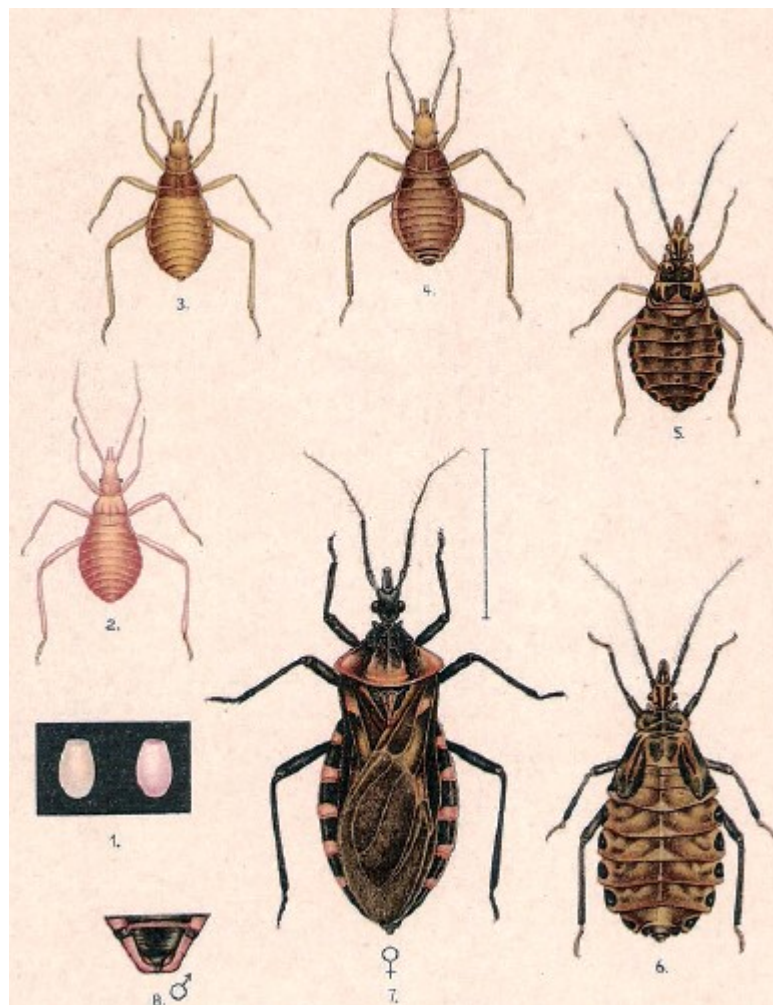


Figura 1-3. Estágios de desenvolvimento do ciclo de vida de *Panstrongilus megistus*. 1. Ovos; 2-6. Ninfas; 7. Adulto fêmea. (Jurberg & Galvão, 2006)

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., 2008; Gourbière et al., 2012).

Os triatomíneos possuem ampla distribuição geográfica em diferentes ecótopos naturais de regiões tropicais e subtropicais. (**Figura 1.4**) (Moncayo & Silveira, 2009; Coura, 2015). Atualmente, a subfamília Triatominae compreende 157 espécies agrupadas em 18 gêneros e 5 tribos (Galvão, 2020; Dale et al., 2021), 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 podem reunir condições necessárias para transmitir a doença de Chagas aos humanos (Schofield & Galvão, 2009; Gourbière et al., 2012; Rassi et al., 2012).

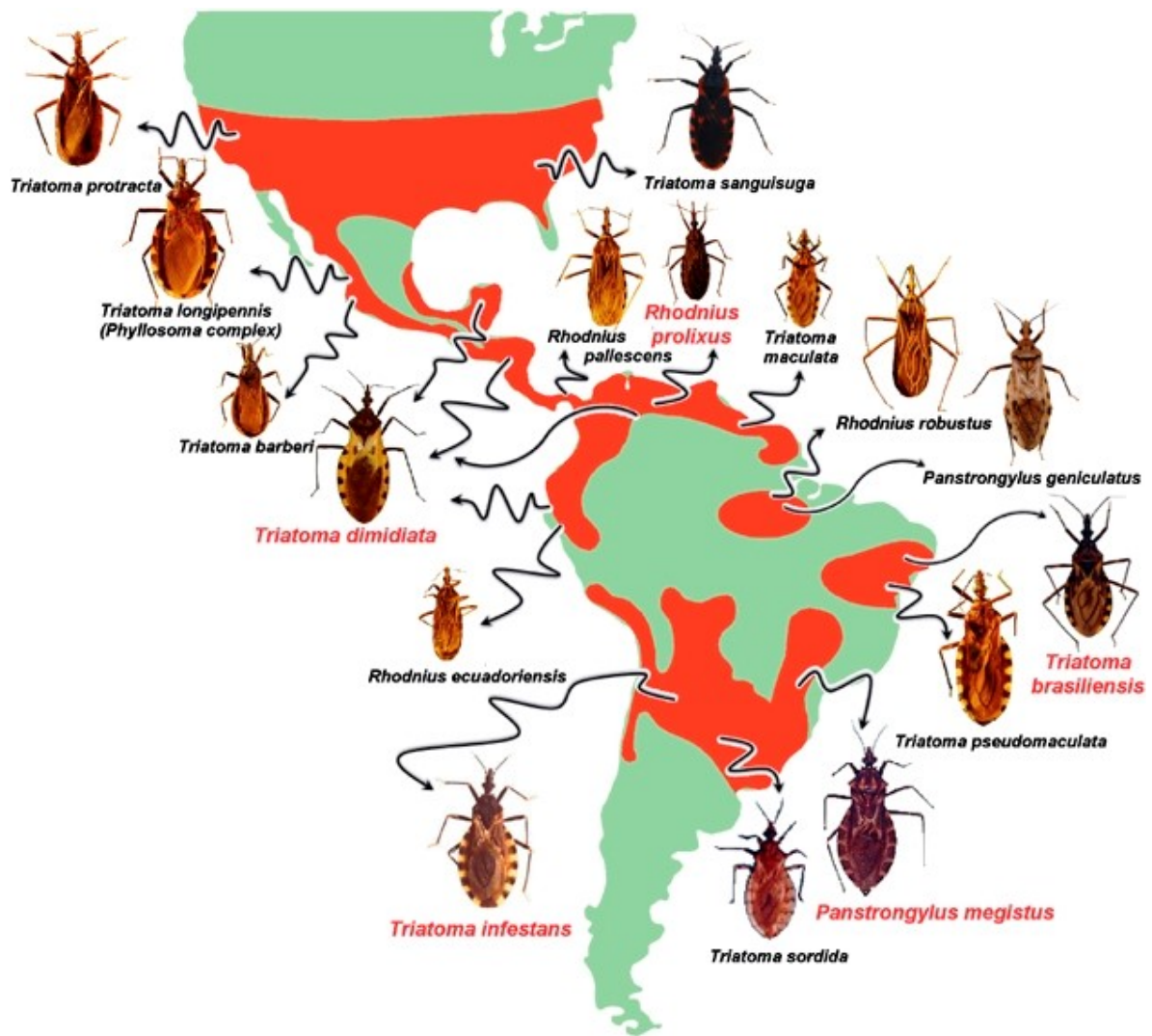


Figura 1-4. Distribuição geográfica dos principais vetores de *T. cruzi* nas Américas (Retirado de Gourbière et al., 2012). As áreas em vermelho no mapa indicam a distribuição geográfica aproximada das espécies indicadas. Espécies com nomes destacados em vermelho são consideradas como os principais transmissores 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., é um fator também a ser considerado em relação à competência vetorial, uma vez que 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 & Borges-Pereira, 2012; Rassi et al., 2012; Coura et al., 2014).

1.4 Ciclo Evolutivo

Por desenvolver-se de modo cíclico entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, *T. cruzi* é classificado como um parasito heteroxênico. Os hospedeiros invertebrados adquirem o parasito ao ingerirem, durante o repasto sanguíneo, tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* presentes no sangue de um hospedeiro vertebrado infectado. Uma vez 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 (Brenner, 1997; Coura, 2005; Garcia et al., 2007; Rey, 2011; Ferreira et al., 2016a) (Figura 1.5).

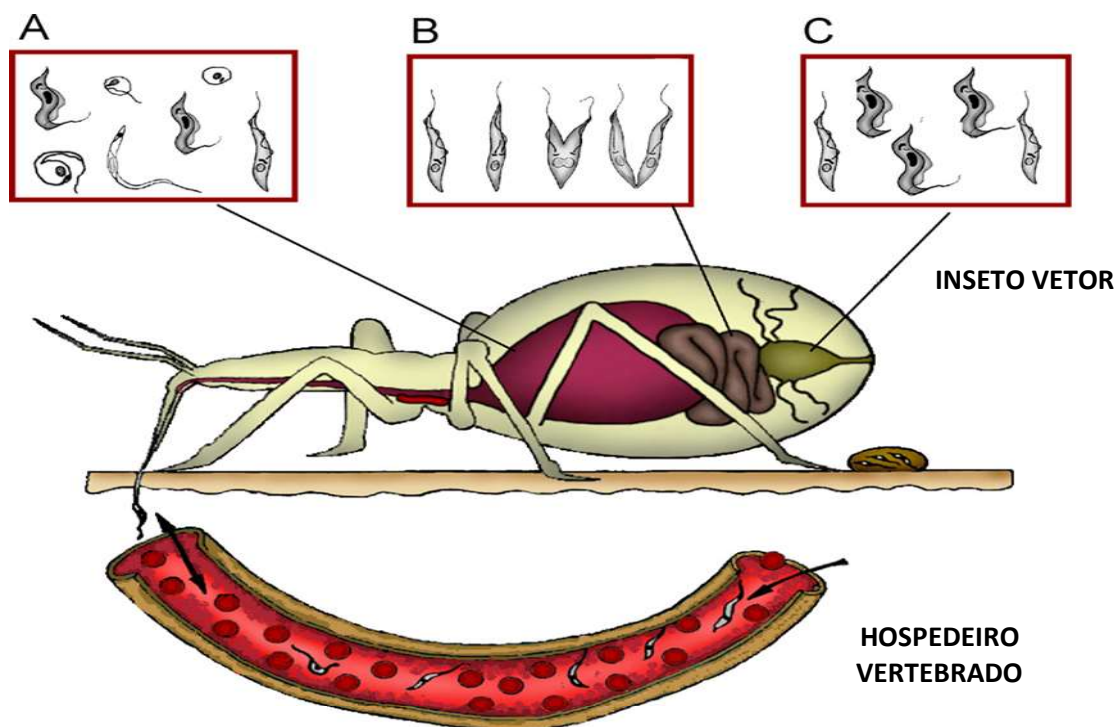


Figura 1-5. Esquema do desenvolvimento de *T. cruzi* ao longo do hospedeiro invertebrado. (Modificado de Garcia et al., 2007). O inseto se alimenta de sangue infectado com as formas tripomastigotas que irão se transformar em formas epimastigotas e algumas esferomastigotas no estômago (porção dilatada 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.

A transmissão do *T. cruzi* ocorre através de diversos mecanismos, podendo ser vetorial ou não-vetorial. A forma de transmissão vetorial envolve o hospedeiro invertebrado que defeca, durante ou após o repasto sanguíneo, eliminando as formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes. Através de feridas e escoriações na pele, ou direto na mucosa, o parasita penetra na circulação do hospedeiro vertebrado. Além disso, no ciclo de transmissão silvestre, existem mais de 150 espécies de mamíferos onívoros que servem de reservatórios para *T. cruzi* e podem contaminar-se quando ingerem o inseto infectado. Porém, a transmissão também pode acontecer quando animais carnívoros matam e se alimentam de outros animais infectados com o parasito (Kirchhoff, 2011; Rassi et al., 2012).

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 tripomastigotas circulam na corrente sanguínea até invadirem novas células ou até infectarem um hospedeiro invertebrado novamente, após um novo repasto sanguíneo (De Souza, 2002) (**Figura 1.6**).

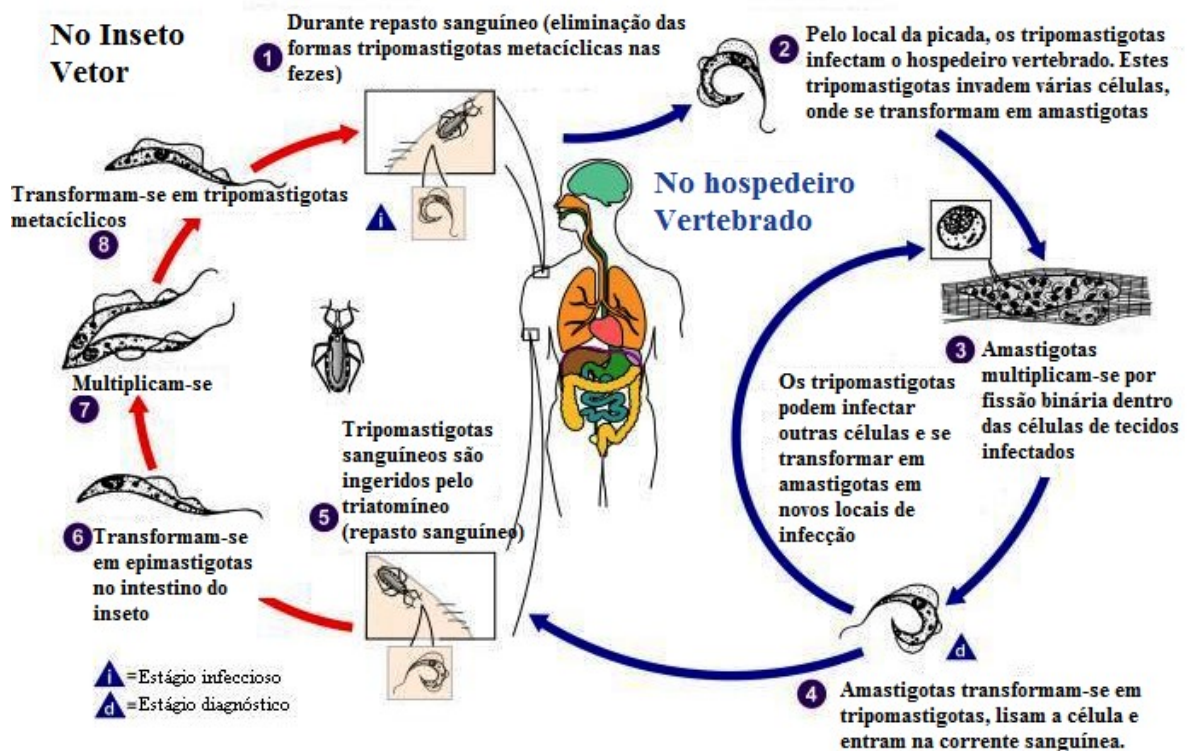


Figura 1-6. Doença de Chagas: Ciclo de vida do *T. cruzi* (Modificado de CDC). As setas vermelhas correspondem ao ciclo evolutivo do *T. cruzi* no interior do hospedeiro invertebrado; já as setas azuis mostram o ciclo evolutivo do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado.

1.5 Patogênese

Uma vez adquirida a infecção pelo *T. cruzi*, em pouco tempo ela se generaliza no hospedeiro vertebrado, acarretando manifestações clínicas que variam desde infecções assintomáticas até sintomas não específicos 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 A., 2001; Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003; Pinto Dias, 2006; Coura & Viñas, 2010). Em transmissões vetoriais, há sinais associados à entrada de *T. cruzi* através da pele (chagoma), ou através de membranas mucosas oculares provocando edema da pálpebra e tecidos perioculares, chamado de sinal de Romaña (Romaña, 1935; Pinto Dias, 1997; Rassi Jr et al., 2012), que são sinais clássicos da doença de Chagas. Este período inicial da doença consiste na fase aguda, com duração de 4-8 semanas e caracteriza-se pela presença de formas tripomastigotas nas células adjacentes ao tecido subcutâneo e em células

circulantes como leucócitos e macrófagos, permitindo que o parasito se dissemine através do sistema linfático e sanguíneo se alojando em outros tecidos (Rey, 2011; Rassi et al., 2012). Essa fase da doença é marcada por parasitemia detectável e inflamação causada por parasitismo tecidual (Nunes et al., 2018). Medicamentos tripanocidas, se utilizados nesta fase, são eficazes, apresentando taxa de cura de 60-85% (Bern, 2011).

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, após 2-3 meses de infecção instala-se a fase crônica da doença, que também pode ser letal ao indivíduo. Na fase crônica, a parasitemia é geralmente indetectável por métodos convencionais de diagnóstico disponíveis (Nunes et al., 2018) e pode apresentar-se das seguintes formas: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (Rassi et al., 2012). 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, a maioria dos pacientes (60-70%) pode apresentar pelo resto da vida a forma indeterminada da doença, com ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas inerentes da doença, tendo apenas a sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi* (Coura, 2007; Amato Neto, 2008). Por outro lado, depois deste período ou gradativamente após a fase aguda, 30-40% dos indivíduos infectados podem apresentar diversas alterações sistêmicas, cujos órgãos predominantemente acometidos são o coração, o esôfago, e o cólon, o que vai caracterizar as diferentes formas clínicas da fase crônica (Prata, 2001), sendo elas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (Nunes et al., 2018) (**Figura 1.7**).

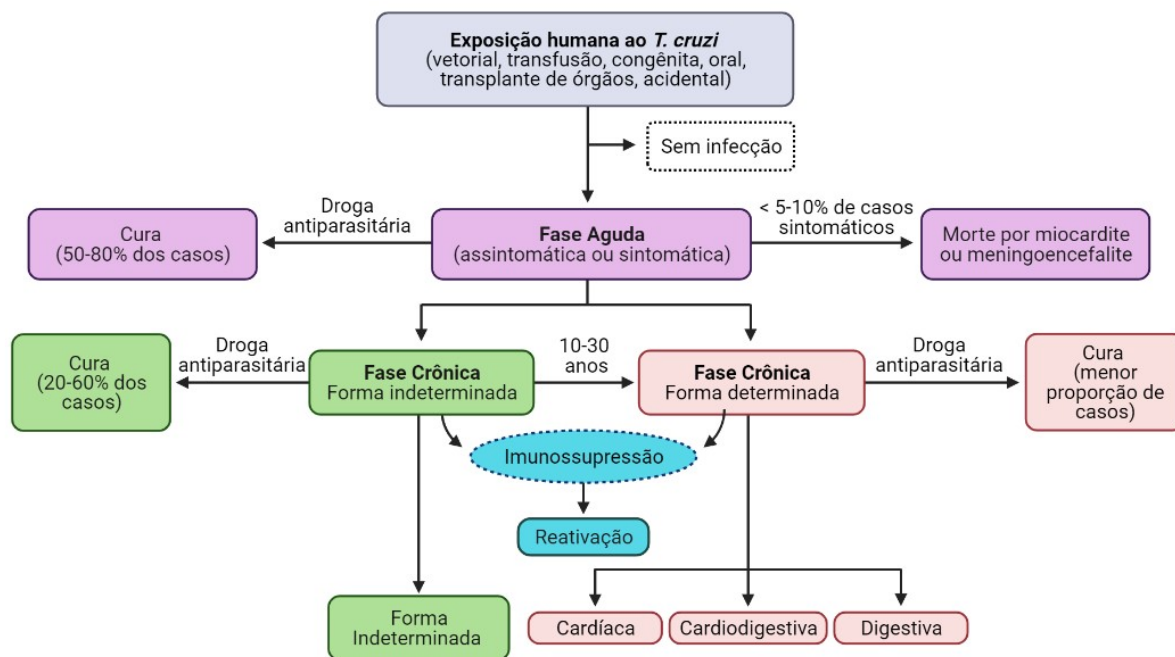


Figura 1-7. História natural da doença de Chagas (adaptado de Rassi et al., 2010). Em azul a fase de exposição humana ao *T. cruzi*, em rosa as etapas da fase aguda da infecção, em verde as etapas da fase crônica na forma indeterminada, em vermelho as etapas da fase crônica forma determinada e em azul claro a fase de reativação, marcada pela imunossupressão do hospedeiro.

A forma cardíaca é a forma mais frequente e grave da doença de Chagas, caracterizada por intenso processo de remodelamento cardíaco, cujas manifestações clínicas agrupam-se em três síndromes: arritmia, insuficiência cardíaca e tromboembolismo, que podem levar à morte súbita (Rassi et al., 2010; Rassi et al., 2012; Nunes et al., 2018). As manifestações digestivas, por sua vez, são representadas pelo megaesôfago e megacólon, que são conseqüências clínicas tardias da forma digestiva da fase crônica (Rassi et al., 2017). O acometimento de algum órgão do aparelho digestivo e do coração pode ocorrer simultaneamente e caracteriza a forma clínica mista da doença de Chagas (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 (Teixeira et al., 2011; Fernandes & Andrews, 2013).

1.5.1 Tratamento

Para o tratamento etiológico de indivíduos infectados, são disponibilizados apenas dois fármacos aprovados, o Benznidazol (**Figura 1.8**) e o Nifurtimox (**Figura**

1.9), para eliminar a infecção por *T. cruzi*, a fim de melhorar os parâmetros clínicos do paciente e interromper o ciclo de transmissão do parasito (Müller Kratz et al., 2018). O nifurtimox é um derivado nitrofurano, produzido pela Bayer sob a marca Lampit®, cujo mecanismo de ação consiste em produzir metabólitos de oxigênio reduzidos levando à produção de radicais livres que promovem o bloqueio da síntese de DNA e aceleram a degradação de DNA e RNA, componentes celulares vitais para o *T. cruzi* (Bern, 2011; Lascano et al., 2020). Já o Benznidazol é um derivado nitroimidazólico, que exerce seu efeito produzindo metabólitos reativos que possuem efeito tripanocida nas formas intra e extracelulares do parasito (Bern, 2011; Müller Kratz et al., 2018). Originalmente fabricado pela Roche como Rochagan® ou Rodanil®, o Benznidazol agora é produzido pelo Lafepe (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco), no Brasil e como Abarax® pelo Laboratório ELEA, na Argentina (Machado-de-Assis et al., 2013). Vale ressaltar que o Nifurtimox não é o primeiro medicamento de escolha no tratamento da doença de Chagas, sendo geralmente utilizado quando o paciente se mostra refratário ao tratamento convencional com Benznidazol. Sendo que este último acaba sendo o medicamento de primeira escolha, devido à sua maior tolerabilidade e segurança (Bern, 2011; Müller Kratz et al., 2018; Pérez-Molina & Molina, 2018).

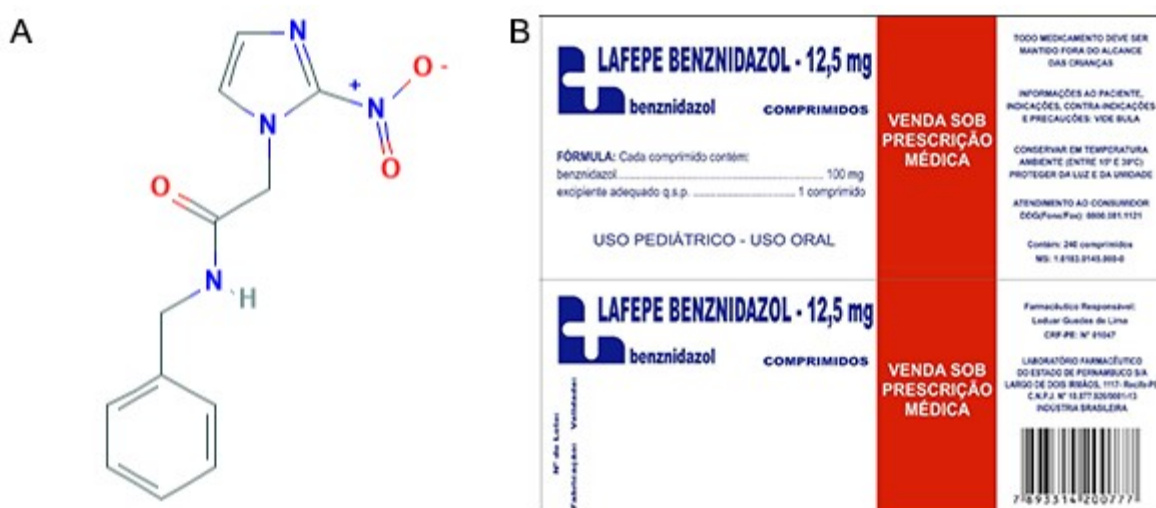


Figura 1-8. (A) Estrutura química do Benznidazol. (B) Rótulo do medicamento de um dos atuais fabricantes de Benznidazol, o laboratório LAFEPE (PubChem, 2021a).



Figura 1-9. (A) Estrutura química do Nifurtimox. (B) Rótulo do medicamento do fabricante de Nifurtimox nas duas dosagens disponíveis de 30 mg (verde) e 120 mg (amarelo) do fabricante Bayer (PubChem, 2021b).

Embora ambos os fármacos sejam comumente utilizados há quase meio século para o tratamento da doença de Chagas, a eficácia terapêutica é especialmente dependente da fase da doença na qual o tratamento foi instituído (Bern, 2011a). O tratamento etiológico precoce, iniciado na fase aguda, tem mostrado índices de cura elevados, com 60-85% de taxa de cura, promovendo a redução da gravidade dos sintomas, diminuindo o curso clínico e detecção de parasitemia (Bern, 2011a, Pérez-Molina & Molina, 2018). Adicionalmente, não há tratamento eficaz para os indivíduos na fase crônica da doença, a qual é a mais prevalente, em áreas endêmicas e não endêmicas, o que confirma a necessidade de um diagnóstico inicial preciso para que as intervenções terapêuticas ocorram precocemente (Viotti et al., 2006; Pérez-Molina & Molina, 2018).

Além dos baixos índices de cura obtidos em pacientes na fase crônica da doença, outro grande desafio no uso desses dois medicamentos para o tratamento etiológico da doença de Chagas diz respeito à taxa relativamente elevada de efeitos adversos, que varia de 15-20%, e é mais frequente em adolescentes e adultos. Dentre os efeitos relatados com mais frequência tem-se a dermatite alérgica, náusea e vômitos, que geralmente cessam após a descontinuidade do tratamento (Bern, 2011; Müller Kratz et al., 2018), e são suficientes para o paciente abandonar permanentemente o tratamento (Morillo et al., 2015). Devido à essas limitações, que evidenciam a necessidade da avaliação de novos fármacos que possuam atividade anti-*T. cruzi* ou novos regimes de tratamento que podem apresentar o mesmo potencial tripanocida que a dose tradicionalmente utilizada (Cevey et al., 2016).

O acesso ao tratamento e cuidado de todos os pacientes infectados ou acometidos pela doença está incluído na lista de metas da OMS para controle da DC para 2020.

1.6 Aspectos Ecoepidemiológicos da doença de Chagas

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, especialmente na América do Sul, Central e México (**Figura 1.10**). Países como a Bolívia, Argentina, Paraguai, Equador, El Salvador e Guatemala possuem o maior número de indivíduos infectados dos 21 países considerados endêmicos (Pérez-Molina & Molina, 2018; Noya & Jackson, 2020). Atualmente, estima-se que 6-7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas e cerca de 75 milhões estejam expostas a risco de infecção (WHO, 2020). Na década de 90, 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). Anteriormente, a doença de Chagas era considerada endêmica de regiões rurais da América Latina, onde a transmissão vetorial é a principal forma de contágio. No entanto, esse padrão vem mudando progressivamente e, atualmente, a maior parte dos indivíduos vivem em áreas urbanas (Rassi et al., 2012). Além disso, a transmissão do protozoário pode ocorrer também pela ingestão de alimentos contaminados com as fezes de triatomíneo (Steindel et al., 2008; Nóbrega et al., 2009), congênita ou transplacentária (Brutus et al., 2008; Gontijo et al., 2009) e em acidentes de laboratório (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 (Coura & Viñas, 2010).

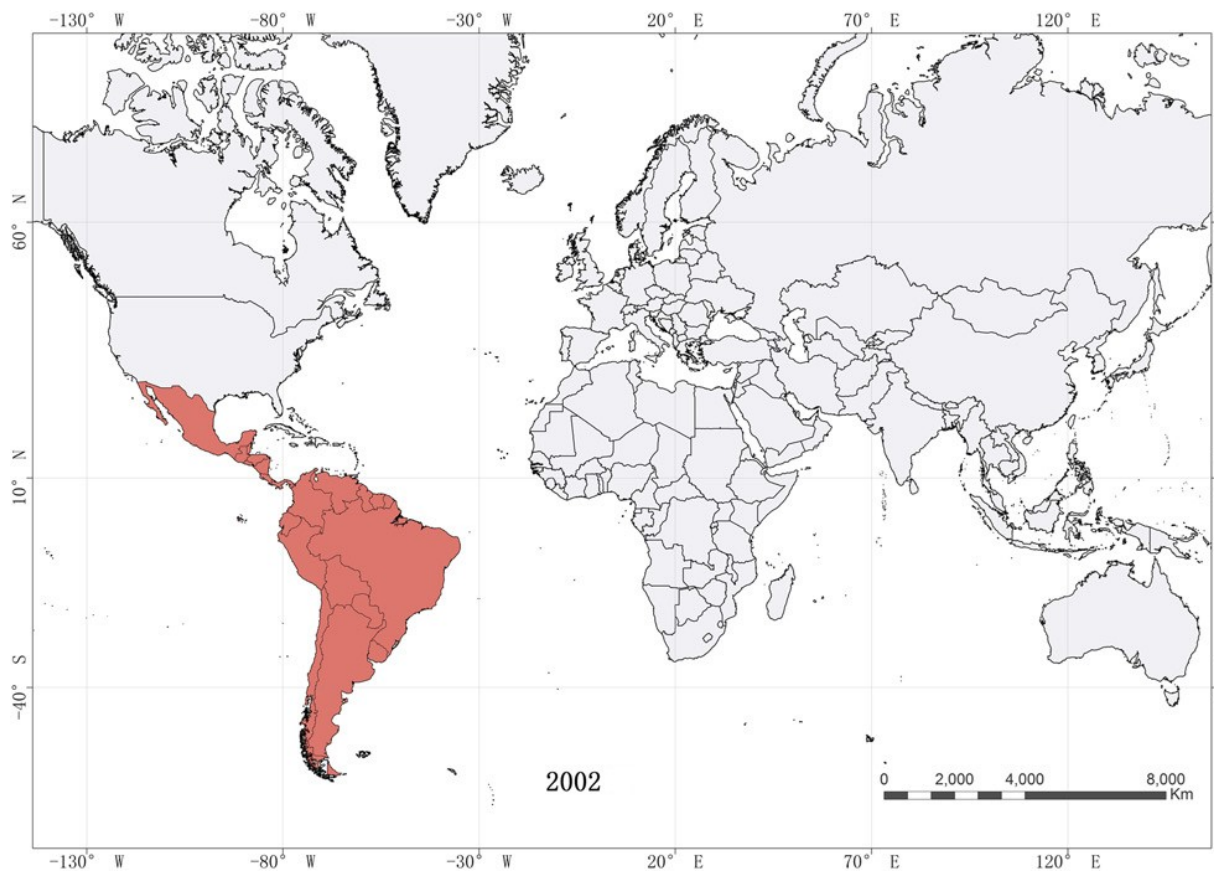


Figura 1-10. Dados epidemiológicos relativos à doença de Chagas em 2002 (Modificado de Liu & Zhou, 2015). A área destacada em vermelho refere-se a áreas endêmicas onde a transmissão ocorre ocasionalmente por meio de vetores.

Considerando o aumento da globalização, bem como da 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 originalmente 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*; (Rassi et al., 2012; Antinori et al., 2017; Nunes et al., 2018) (Figura 1.11). 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 falta de monitoramento e segurança dos bancos de sangue, a transmissão transfusional e via transplante de órgãos ganhou certa importância epidemiológica nas duas últimas décadas (Kirchhoff et al., 2006; Coura & Borges-Pereira, 2012). Para tanto, países não-endêmicos com amplas populações de imigrantes começaram a estabelecer intervenções para prevenir infecção de *T. cruzi* associada à transfusão. A triagem de sangue para doação nos EUA começou em 2007, e atualmente cobre a maior parte do suprimento de sangue. Com isso,

doadores infectados foram identificados e proibidos permanentemente de doar (Kirchhoff, 2011).

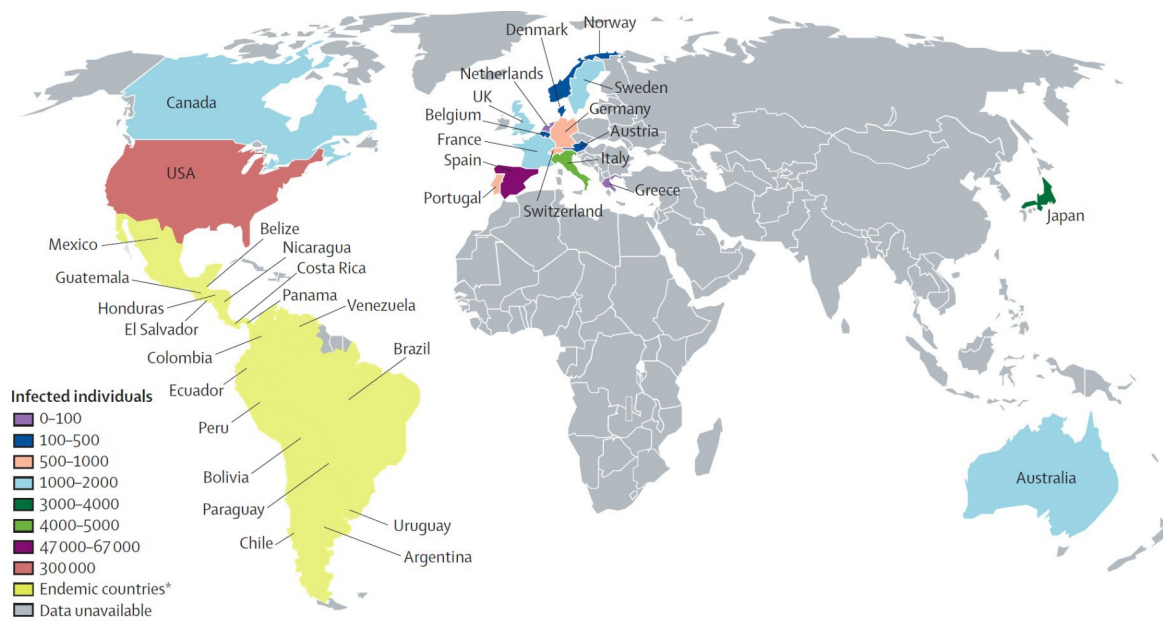


Figura 1-11. Mapa de imigrantes infectados com *T. cruzi* morando em países não endêmicos (Adaptado de Rassi Jr et al., 2010).

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 vetorial e testes nos bancos de sangue (Molyneux & Morel, 1998; Briceño-León, 2009). Estimulada por organizações como OPAS e OMS, a implementação de programas para a eliminação do inseto vetor em países da América Latina foi fundamental para a determinação do cenário da doença pois 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 (Hashimoto & Schofield, 2012; Salvatella et al., 2013; Pérez-Molina & Molina, 2018). No Uruguai em 1997, Chile em 1999, Brasil em 2006, a transmissão de *T. cruzi* pelo *Triatoma infestans*, principal vetor domiciliar nesses locais, foi dada como interrompida (WHO, 2018). Além disso, em 1997, por resolução dos Ministérios da Saúde de alguns países da América Central, El Salvador, Guatemala, Honduras e Nicarágua (2009-2010), também foi lançada uma iniciativa contra a doença de Chagas, sendo um dos objetivos a eliminação da espécie *Rhodnius prolixus* na região. Consequentemente, cada vez mais áreas infestadas foram encontradas e progressivamente pulverizadas usando a estratégia previamente adotada para o combate ao *T. infestans* nos países do cone sul da América do Sul. Como resultado, estes países da América central, foram

certificados como livres de transmissão da doença de Chagas por *R. prolixus*, e nenhum deles relatou a presença de *R. prolixus* desde junho de 2010 (Hashimoto & Schofield, 2012).

Mesmo com os avanços conquistados pelos programas governamentais, o risco de transmissão vetorial, porém, ainda existe especialmente por conta da diversidade da fauna de triatomíneos. No Brasil, 66 espécies possuem distribuição autóctone e representam um desafio para o controle vetorial na atualidade (Galvão, 2014; Souza et al., 2016). Ademais, em áreas onde *T. infestans* infestava os domicílios ocorriam também espécies autóctones, que intensificaram a sua presença nas habitações humanas após o controle do principal vetor (Silveira & Vinhaes, 2000; Silveira & Dias, 2011). Portanto, a preocupação em relação à possibilidade de transmissão vetorial por espécies autóctones, que não podem ser eliminadas do intradomicílio por serem capazes restabelecer colônias a partir de focos vizinhos ou silvestres, e o risco remoto de reestabelecimento do *T. infestans* proveniente de países vizinhos (onde a espécie permanece como vetor principal), sempre será uma preocupação relevante (De Souza & Diotaiuti, 2020).

1.6.1 Transmissão Oral da doença de Chagas

Registros de surtos de infecção de *T. cruzi* por via oral, geralmente relacionados à presença de vetores e reservatórios infectados pelo parasito nas proximidades, parecem estar aumentando significativamente na América Latina (Yoshida et al., 2011; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Franco-Paredes et al., 2020). A transmissão oral pode ocorrer devido ao consumo de triatomíneos completos ou de suas fezes, contendo tripomastigotas metacíclicos, que são inadvertidamente processados com alimentos, principalmente preparados de frutas (Dias et al., 2008; Nóbrega et al., 2009; Pereira et al., 2009), ou pela ingestão de carne crua de mamíferos silvestres infectados (Pinto Dias, 2006).

No Brasil, especialmente na região Amazônica e em outras regiões onde o controle de triatomíneos intra e peridomiciliar tem sido eficaz, estes surtos de origem alimentar têm se mostrado cada vez mais relevantes do ponto de vista da saúde pública, por terem emergido como um dos principais mecanismos de transmissão em humanos, especialmente devido às espécies autóctones de triatomíneos. Entre 1965 e 2009, sete a oito surtos, com 112 casos agudos da doença de Chagas, ocorreram fora da Amazônia, onde a transmissão vetorial estava sob controle (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). Em contrapartida, entre os anos de 2000 e

2011, foram notificados 1.252 casos de doença de Chagas aguda e, nestes, cerca de 70% foram associados ao consumo de alimentos ou bebidas contaminados (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Robertson et al., 2016) (Figura 1.12).

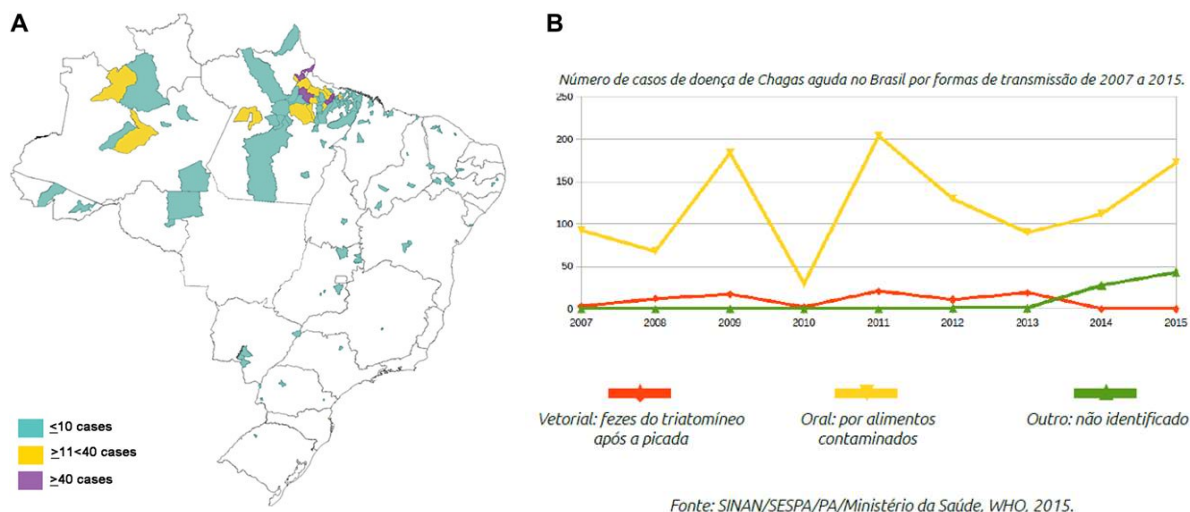


Figura 1-12. A) Doença de Chagas Aguda no Brasil, por municipalidade, entre 2000 e 2010 (Retirado de Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012) B) Número de casos de doença de Chagas Aguda no Brasil de acordo com o tipo de transmissão de 2007 a 2015 (Retirado de De Meis & Castro, 2017).

Notificações recentes para a atual emergência dos casos de doença de Chagas aguda no Brasil estão relacionadas, em sua maioria, ao consumo do suco de açaí (*Euterpe oleracea*) fresco contaminado com o parasito, e também existem relatos de surtos associados ao consumo de caldo de cana de açúcar (*Saccharum* sp.) e suco de bacaba (*Oenocarpus bacaba*) não pasteurizados (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde (ANVISA-MS), 2008; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Robertson et al., 2016; Franco-Paredes et al., 2020). A contaminação dos alimentos com *T. cruzi* é acidental e pode ocorrer durante a colheita, armazenamento, transporte ou até mesmo na etapa de preparação (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde (ANVISA-MS), 2008).

Dentre os surtos brasileiros de transmissão oral do *T. cruzi*, vale citar um caso que ocorreu no Norte do Brasil, onde casos dessa via de transmissão apresentam sinais de aumento. O surto ocorreu em 2008 em Coari, cidade do interior do estado do Amazonas, onde 25 pessoas foram infectadas pelo *T. cruzi*. Neste evento, suspeita-se que a transmissão tenha ocorrido por via oral através do consumo de açaí contaminado (Barbosa-Ferreira et al., 2010; de Souza-Lima et al., 2013). Outros países da América Latina, como Argentina, Bolívia, Colômbia, Equador e Venezuela, também relataram vários surtos de doença de Chagas aguda adquiridos por via oral

(Franco-Paredes et al., 2020). O maior surto descrito até o momento ocorreu na Venezuela, em 2007, afetando 103 pessoas, adultos e crianças de uma escola de Caracas, que se infectaram após o consumo de suco de goiaba contaminado (De Noya et al., 2010).

O açaí é um fruto de cor roxa de uma palmeira da família *Arecaceae*, que é uma das mais importantes socioeconomicamente, ocorrendo principalmente em toda a região amazônica, sendo particularmente abundante na Amazônia Oriental (Neri-Numa et al., 2018). Três espécies são conhecidas popularmente como açaí, *Euterpe edulis*, *E. oleraceae* e *E. precatoria*, porém, apenas as duas últimas têm interesse agroindustrial (Cavalcante, 1979). Ambas as espécies têm demonstrado propriedades antioxidantes e antiinflamatórias com compostos bioativos como antocianinas, que são anti-radicais livres, flavonóides e fenólicos, mais do que outras frutas, como uvas, amoras, mirtilos e morangos (Yuyama et al., 2011; Yamaguchi et al., 2015; Garzón et al., 2017; Torma et al., 2017). O desenvolvimento do açaizeiro ocorre em várzeas e em solos pantanosos e alagados (Bichara & Rogez, 2011). A frutificação ocorre durante todo o ano, com a maior produção do açaí ocorrendo durante o período de julho a dezembro (Cavalcante, 1979; Bichara & Rogez, 2011).

No Norte do Brasil, a maior parte da produção ainda é consumida pela população local, no qual o açaí, que é esmagado para produzir uma pasta ou bebida, é tradicionalmente ingerido "in natura", principalmente no Pará e na Amazônia, maiores produtores e consumidores de açaí em todo o mundo (Barbosa et al., 2016). Além de importante para a cultura local, o açaí é fonte de renda fundamental para as comunidades ribeirinhas e rurais da Amazônia, uma vez que a maior parte do açaí é derivada da atividade extrativista da região. Além disso, nos últimos dez anos, houve um importante incremento econômico, nacional e internacional, na comercialização de bebidas à base de açaí. Neste contexto, alimentos à base de açaí passaram a ser um dos mais comercializadas da região, não só no mercado nacional, mas também em nível internacional (Brondizio & Moran, 2008).

Alguns estudos sugerem possíveis vias de contaminação do açaí por *T. cruzi*, tal qual a presença de ninhos com insetos infectados nas palmeiras do açaí, que podem ser transportados junto com os frutos, possibilitando que os barbeiros sejam triturados durante a preparação do suco (Da Silva Valente et al., 1999). Outra possibilidade está relacionada à atração dos triatomíneos aos cestos utilizados para transportar o açaí. Devido ao calor, emissão de CO₂ e odores característicos de

fontes de alimentos, os triatomíneos voam da mata até os cestos com açaí, onde insetos infectados podem defecar, ou até mesmo serem processados com o açaí, contaminando os frutos (Seccadio, 2013). Esse açaí vai para pontos comerciais e a falta de higiene e medidas adequadas de manipulação dos frutos possibilitam as microepidemias de doença de Chagas Aguda através do consumo do suco de açaí (Xavier et al., 2014).

Tais vias de contaminação reforçam que medidas sanitárias devem ser utilizadas no manuseio dos frutos e em todos os equipamentos utilizados no processamento, para evitar uma possível contaminação (Ferreira et al., 2018). Desta forma, o branqueamento e pasteurização são técnicas importantes para minimizar os riscos de transmissão e evitar os surtos de infecção oral através de alimentos contaminados (Oliveira et al., 2011). Atualmente, ambas as técnicas vêm sendo adotadas para produtos com base de açaí que são exportados da Amazônia para outras regiões do Brasil e para o exterior (Dias et al., 2011). Ainda assim, muitos comerciantes locais não fazem uso desses processos normalmente, tornando os consumidores destes pontos um grupo vulnerável à transmissão oral de DC (Nóbrega et al., 2009). A prevenção da transmissão oral do *T. cruzi* tem se mostrado relativamente difícil, gerando uma nova demanda no sistema público de saúde para o enfrentamento da doença de Chagas adquirida por via oral.

1.7 Diagnóstico Molecular da Infecção por *T. cruzi*

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 (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1992), permite a detecção em 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 maior sensibilidade, especificidade, rapidez e reprodutibilidade (Moser et al., 1989; Sturm et al., 1989; Britto et al., 1993, 1995; Gomes et al., 1998; Cummings & Tarleton, 2003; Bustin et al., 2009; Burd, 2010) como ferramenta diagnóstica, 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, os resultados provenientes da PCR são obtidos em um tempo mais curto (Russomando et al., 1996; Cummings & 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).

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; 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., 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 (Braz et al., 2007; Cominetti et al., 2013; Moreira et al., 2017) e para investigação de surtos de doença de Chagas oral através da análise de alimentos contaminados (Ferreira et al., 2018; Finamore-Araujo et al., 2021). Por outro lado, os ensaios de diagnóstico molecular são baseados, em sua maioria, na detecção direta do DNA do patógeno nas amostras. A amplificação do DNA, por si só, não fornece informações sobre a viabilidade do patógeno, principalmente devido à sua estabilidade (Cancino-Faure et al., 2016). Uma alternativa à detecção do DNA para avaliar a viabilidade de parasitos em diferentes amostras seria através da detecção direta do RNA do patógeno por meio de PCR com transcrição reversa. O uso das técnicas de RT-PCR e RT-qPCR vem aumentando para diversos microrganismos como *Mycobacterium tuberculosis*,

Plasmodium falciparum, *Leishmania*, *Toxoplasma gondii* (Hellyer et al., 1999; Schoone et al., 2000; Van Der Meide et al., 2005; Norouzi et al., 2016) entre outros. O interesse no uso de RNA como o alvo molecular para avaliação de viabilidade é devido a labilidade do RNA em fluidos biológicos, que é degradado rapidamente, possuindo uma meia-vida menor em comparação ao DNA. Logo, um ensaio baseado na amplificação de mRNA provavelmente implicaria na presença de parasitos vivos, sendo um potencial indicador de suscetibilidade do parasita durante e após o tratamento com medicamentos (Van Der Meide et al., 2008). No entanto, é importante ressaltar que faltam estudos de diagnóstico molecular comparativos sobre o desempenho do RNA como marcador molecular de viabilidade em relação ao DNA, especialmente para avaliação do *T. cruzi* em diferentes matrizes biológicas.

1.7.1 Diagnóstico Molecular da Infecção por *T. cruzi* em triatomíneos

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, 2000). 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 (Moser et al., 1989; Sturm et al., 1989), uma vez que a análise por microscopia pode subestimar o nível de infecção de triatomíneos coletados em campo (Botto-Mahan et al., 2005). A detecção, por PCR, de *T. cruzi* em fezes de triatomíneos 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 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 et al., 2007).

1.7.2 Análise Molecular de Amostras de Açaí contaminadas com *T. cruzi*

Em relação à avaliação do potencial de transmissão oral da doença de Chagas por meio do consumo de produtos à base de açaí, ela é determinada por investigações clínicas ou parasitológicas e são baseadas em métodos tradicionais, como cultura e observações microscópicas (Barroso Ferreira et al., 2014; Franco-Paredes et al., 2020). No entanto, como citado anteriormente para insetos, são metodologias que apresentam diversas limitações (de Oliveira et al., 2019) e a análise microscópica, além de ser um procedimento trabalhoso e demorado, é difícil de detectar o parasita, devido à coloração escura característica do açaí (Barbosa et al., 2012).

Neste contexto, métodos moleculares baseados em PCR e qPCR têm sido desenvolvidos, mais recentemente, para a detecção e quantificação rápida do DNA do *T. cruzi* em várias matrizes alimentares. Contribuindo, desta forma, como uma ferramenta poderosa na investigação epidemiológica da doença de Chagas (de Souza Godoi et al., 2017; Mattos et al., 2017; Ferreira et al., 2018; de Oliveira et al., 2019; Cardoso et al., 2020). No entanto, ainda é necessário o desenvolvimento de metodologias capazes de detectar, em larga escala e com reprodutibilidade, o *T. cruzi* em amostras de alimentos e, assim, planejar estratégias para melhor compreender a transmissão oral, garantir a qualidade dos produtos que estão sendo comercializados e entender as possíveis vias de contaminação destes produtos (Bichara & Rogez, 2011; Ferreira et al., 2018).

1.8 Justificativa

Em relação ao diagnóstico da infecção de *T. cruzi*, alvos moleculares para ensaios baseados em PCR têm sido representados tanto pelo genoma mitocondrial como pelo genoma nuclear do parasito. Eles têm sido propostos como uma alternativa para a detecção mais precisa da infecção de *T. cruzi* em triatomíneos e mamíferos infectados, bem como para investigação de surtos de doença de Chagas

oral através da análise de alimentos contaminados. Esta técnica apresenta uma alta sensibilidade e especificidade na amplificação de sequências do DNA de *T. cruzi* de amostras degradadas ou em pouca quantidade.

As dinâmicas de transmissão do *T. cruzi* são de grande importância no desenho de novas medidas de controle da doença de Chagas, especialmente pelas vias de transmissão vetorial e oral. Desta forma, o desenvolvimento de um ensaio molecular baseado em PCR em Tempo real torna-se uma ferramenta importante para uma maior compreensão do estudo sobre esta parasitose. E, em se tratando de amostras comercializadas, como é o caso da polpa de açaí, um ensaio simples e reproduzível para a detecção e quantificação do DNA do *T. cruzi*, desde a etapa de extração de DNA até a etapa de visualização pela qPCR, pode ser útil para analisar, em larga escala e em diferentes localidades, surtos orais de doença de Chagas aguda.

No entanto, uma questão recorrente em relação à quantificação do *T. cruzi* 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 a parasitos vivos na amostra. Alguns estudos prévios têm utilizado o RNA do patógeno como marcador de viabilidade já que tanto o mRNA e o rRNA possuem uma meia-vida mais curta que o DNA. Entretanto, análises do valor da detecção do RNA do parasito, nos hospedeiros vertebrado e invertebrado e em produtos alimentícios previamente tratados para consumo, ainda precisam ser aprimoradas.

Com base nisso, a hipótese deste trabalho considera que o RNA seja um bom marcador para avaliar a viabilidade de *T. cruzi*, seja em amostras do hospedeiro vertebrado, invertebrado ou de alimentos. E esta quantificação diferenciada de parasitos viáveis e parasitos totais poderá contribuir para um maior conhecimento sobre a dinâmica da infecção pelo parasito e a competência vetorial, podendo abrir novas possibilidades para a avaliação de drogas tripanocidas e avançar em estudos epidemiológicos, de prevenção e controle.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho é detectar e quantificar a carga parasitária do *T. cruzi* na interação com seus hospedeiros invertebrado e vertebrado, bem como em açaí contaminado, através de uma metodologia molecular quantitativa baseada em PCR e RT-PCR em Tempo Real. Com isso, almejamos avaliar o potencial do RNA do parasito como um marcador de viabilidade nos hospedeiros vertebrado e invertebrado.

2.1.1 Objetivos Específicos

1. Desenvolver e validar metodologias moleculares que possam entregar um resultado rápido, sensível e acurado no atendimento a surtos orais da doença de Chagas, através da detecção e quantificação da carga parasitária de *T. cruzi* em amostras de açaí.
2. Comparar protocolos de kits comerciais para melhor desempenho de extração de DNA para a detecção de *T. cruzi* em triatomíneos.
3. Desenvolver uma RT-qPCR com alvo nos genes correspondentes ao TcGAPDH (expresso de maneira constitutiva nas diferentes formas do parasito) e 12s do RNA ribossomal de triatomíneos, para a quantificação da viabilidade de *T. cruzi* na interação com seu hospedeiro invertebrado.
4. Validar o RNA como marcador de viabilidade de *T. cruzi* na interação com o hospedeiro invertebrado.
5. Avaliar a dinâmica da interação de isolados de *T. cruzi*, pertencentes a diferentes DTUs, com *Rhodnius prolixus* alimentado com sangue contendo formas epimastigotas.
6. Validar o RNA como marcador de viabilidade de *T. cruzi* em infecção *in vitro* de cardiomioblastos da linhagem H9C2.
7. Avaliar a viabilidade de *T. cruzi*, em células H9C2 submetidas, ou não, ao tratamento com benznidazol.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo celular de *T. cruzi*

Para os ensaios foram utilizados cepas e clones de *T. cruzi* pertencentes às subpopulações classificadas entre DTUs I a VI: Dm28c (TcI), Y (TcII), INPA 3663 (TcIII), INPA 4167 (TcIV), LL014 (TcV) e CL (TcVI). As células foram obtidas da Coleção de Protozoários da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil (Fiocruz, COLPROT, <http://www.colprot.fiocruz.br>). Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas a 28°C por 5 dias em cultura axênica em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose* – BD, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) termodesativado (Cultilab, Campinas/SP - Brasil) e 1% de antibiótico (100 UI/mL penicilina, 10 µg/mL estreptomicina). Na fase logarítmica de crescimento, as células foram recolhidas por centrifugação (3000g por 10 minutos, a 4°C), lavadas três vezes com PBS (tampão salina: Na₂HPO₄ 0,01M, NaCl 0,15 M) e ressuspensas em 1mL na mesma solução.

O crescimento celular foi estimado por contagem de células em Câmara de Neubauer em microscópio óptico e expresso em parasitas/mL.

3.2 Manutenção, alimentação e infecção de *Rhodnius prolixus*

Triatomíneos da espécie *R. prolixus* foram obtidos de colônias do insetário do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ. As colônias são mantidas em um cristalizador de vidro fechado com tela de náilon e papel de filtro sanfonado no interior. Estes insetos ficam em estufa BOD a 28°C e 80% UR, com fotoperíodo de 12 horas. Semanalmente, as colônias são alimentadas com sangue desfibrinado de coelho, fornecido pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), até a repleção dos insetos.

Para os experimentos de infecção, ninfas de quinto estágio, em jejum por mais de 15 dias após a última ecdise, foram selecionadas e então alimentadas com sangue de coelho desfibrinado através de um aparelho artificial. Antes da alimentação, o sangue de coelho foi descomplementarizado através da separação do plasma por centrifugação, a 1890g por 15 min a 4°C, e posterior inativação do plasma pelo calor, a 60°C por 1 hora em banho-maria (Azambuja & Garcia, 1997).

Os eritrócitos foram, então, ressuspensos com o plasma inativado e misturado com formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os parasitos obtidos em fase exponencial de crescimento passaram por centrifugação a 3000g por 10 min a 4°C para eliminação do meio de cultura e o precipitado foi ressuspenso com sangue reconstituído de plasma inativado. A concentração final de epimastigotas, estimada por contagem de células em Câmara de Neubauer, foi de 10⁶ parasitas/mL.

A cinética da infecção por *T. cruzi* foi avaliada em triplicata biológica, isto é, durante três alimentações independentes, e apenas insetos que tiveram alimentação saturante com alta distensão abdominal foram separados para dar continuidade aos nossos ensaios. Os triatomíneos foram infectados e mantidos no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (FIOCRUZ) até o momento da dissecação.

A quantificação da carga parasitária foi analisada por meio de dois métodos diferentes (detalhados nos itens 3.11 e 3.12): PCR quantitativo (qPCR) e PCR quantitativo com transcrição reversa (RT-qPCR). Todo o trato digestivo de *R. prolixus* foi dissecado, separado em *pools* (n = 3 intestinos), que foram analisados nos dias 5, 9, 15 e 29 após a alimentação. Além disso, também foram dissecadas, separadamente, diferentes porções do trato digestivo de *R. prolixus* infectado. O intestino médio anterior (AM), intestino médio posterior (PM) e o intestino posterior (R) também foram separados em *pools* (n = 3) e analisados em diferentes períodos após a alimentação.

Para os ensaios em que buscamos avaliar diferenças nos padrões de infecção de *R. prolixus* por diferentes DTUs de *T. cruzi*, foram realizadas seis alimentações independentes, sendo que cada alimentação foi realizada com sangue contaminado experimentalmente com uma das seis DTUs descritas no item 3.1. A concentração final de epimastigotas, estimada por contagem de células em Câmara de Neubauer, foi de 10⁶ parasitas/mL, para cada alimentação. Os *R. prolixus* foram separados, então, em seis grupos diferentes, de acordo com a cepa de *T. cruzi* que foram alimentados. Todo o trato digestivo de *R. prolixus* foi dissecado nos dias 7, 14, 21 e 28 após a alimentação, o DNA foi extraído e a quantificação da carga parasitária foi feita através da qPCR.

Para validar nosso protocolo e excluir a possibilidade de contaminações, um experimento controle foi realizado com um grupo de insetos não infectados, que foi alimentado apenas com sangue desfibrinado de coelho.

3.3 Preparação de amostras de Açaí com Guanidina-EDTA (GEA)

Amostras de polpa de açaí, usadas para controle, foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil. Além disso, 45 amostras de polpa de açaí coletadas aleatoriamente em diferentes pontos de venda na cidade de Coari (AM) em junho de 2018 foram utilizadas para a validação da metodologia molecular. As polpas de açaí foram adquiridas em uma região compreendida entre 4°05'02,0"S 63°08'36,0"W ao Norte, 4°06'04.0"S 63°08'49.0"W ao Sul, 4°05'14.0"S 63°08'06.0"W ao Leste e 4°06'01.0"S 63° 09'02.0"W a Oeste da cidade. Antes da preparação da polpa, as frutas de açaí foram esterelizadas nas lojas, através do processo de branqueamento, no qual os açaís ficam imersos em banho-maria a 80°C por 10 segundos, seguida pela imersão em água à temperatura ambiente por 2 minutos. A partir de então, o açaí é macerado e misturado com água para o preparo das polpas. Todas as frutas foram coletadas em palmeiras do município de Coari, com exceção de 1 amostra, que foi coletada no município de Codaja, também no estado do Amazonas.

Aspectos éticos: O estudo foi aprovado pelos comitês de ética da Universidade Federal do Amazonas (CAAE: 97439918.5.1001.5020, Número de aprovação: 2.961.307). Consentimentos esclarecidos foram obtidos, por escrito, dos proprietários das lojas do mercado de rua.

As amostras de açaí foram separadas em alíquotas de 5 mL e imediatamente misturadas com um volume igual de uma solução de lise contendo Hidroclorato de Guanidina 6N/EDTA 0,2N pH 8,0 (proporção de 1:1). Estes lisados de açaí (GEA) foram submetidos à uma centrifugação de 10.000g por 10 minutos, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, os sobrenadantes de GEA foram recuperados e armazenados a 4 °C até a extração do DNA (Finamore-Araujo et al., 2021) (**Figura 3.1**).

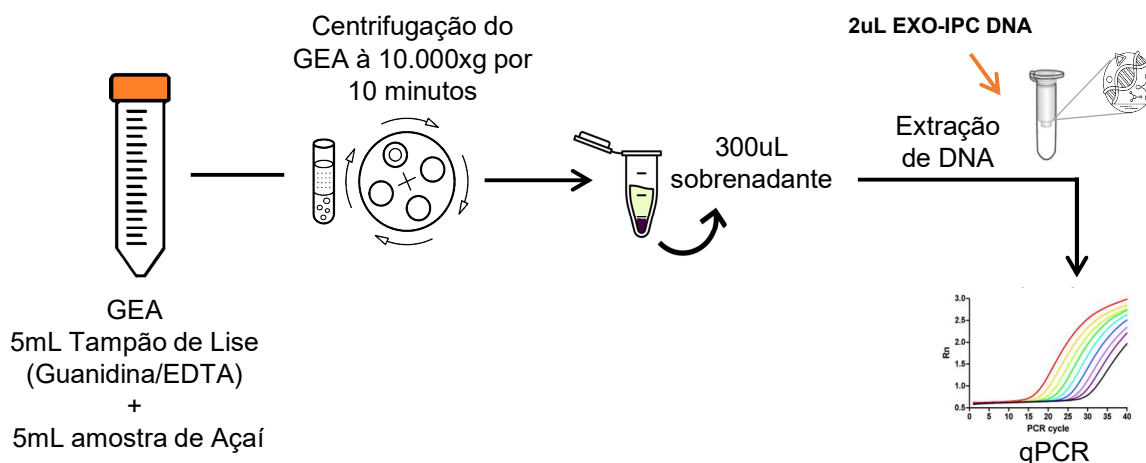


Figura 3-1. Esquema de preparação de amostras de Açaí com Guanidina-EDTA (GEA) para extração de DNA, utilizando um controle interno exógeno, e posterior análise por qPCR.

3.4 Cultivo de células VERO e obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi*

A linhagem de células VERO (*American Type Culture Collection*, ATCC: CCL-81) foi cultivada em garrafas de 75 cm³, contendo meio RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado com HEPES, 5% de SFB termodesativado (Cultilab, Campinas/SP – Brasi) e 1% de antibiótico (100 UI/mL penicilina, 10 µg/mL estreptomicina - Gibco®). A cultura foi mantida a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. O repique das células VERO foi 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. Uma vez soltas da monocamada, a suspensão de células VERO foi transferida para um tubo cônico contendo meio RPMI no mesmo volume de Tripsina-EDTA (proporção 1:1) e centrifugada a 1000 xg por 10 minutos. O sobrenadante, então, foi descartado e o *pellet* de células ressuspensas em novo meio, contado em Câmara de Neubauer e transferido para uma nova garrafa de 75 cm³. A linhagem de células VERO foi submetida à detecção de contaminação por micoplasma seguindo um protocolo previamente estabelecido (Van Kuppeveld et al., 1992, 1994).

Para a obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c, DTU I), 5 x 10⁵ de células VERO foram semeadas em frascos de 150 cm² e armazenadas na estufa durante a noite para adesão. No dia seguinte, 10⁶ epimastigotas da cepa Dm28c, em fase estacionária de crescimento, envelhecidos por 21 dias em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964) foram adicionados à garrafa com a monocamada de células VERO e mantidos sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a

37°C para permitir a interação parasita-célula. Após 48 horas, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X (pH 7,4), para retirar os epimastigotas remanescentes no sobrenadante, e novo meio foi adicionado à cultura. Após 7 dias, foi possível coletar os tripomastigotas do sobrenadante para prosseguir com os ensaios subsequentes. Assim, o sobrenadante foi coletado e colocado em tubos cônicos estéreis de 50 mL, submetidos à centrifugação a 1000g por 10 minutos, para eliminação de células VERO não aderidas ou de detritos indesejados. Em seguida, o tubo foi deixado em repouso à 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 transferido para um novo tubo de 50 mL e submetido a uma etapa de centrifugação a 4000g por 10 minutos para coleta dos tripomastigotas. O sobrenadante, então, foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 10 mL de meio DMEM, com alto teor de glicose. Os tripomastigotas coletados foram contados em câmara de Neubauer para posterior infecção de células da linhagem H9C2.

3.5 Cultivo e infecção de células H9C2

Culturas da linhagem celular de cardiomioblasto de rato H9C2 (*American Type Culture Collection*, ATCC: CRL-1446) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, código: 0098) e cultivadas em garrafas de 175 cm² com meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose* (DMEM *High Glucose*) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas/SP - Brasil) e 1% de antibiótico (100 UI/mL penicilina, 10 µg/mL estreptomicina) sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

Para a infecção, 5 x 10³ células H9C2 foram semeadas em placas de 6 poços e deixadas durante a noite para adesão. No dia seguinte, 5 x 10⁴ formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c, DTU I), obtidas a partir da infecção em células VERO (descrito no item 3.4), foram adicionadas em cada poço seguindo a multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1 parasitas/célula. As placas foram armazenadas na estufa por 4 horas sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para permitir a interação parasita-célula. Após a interação, as células H9C2 foram lavadas 3 vezes com PBS 1X, pH 7,4, para eliminar os parasitas não aderidos. Para os ensaios, células H9C2 infectadas e, também, amastigotas intracelulares/célula foram contadas (100 células/campo) por microscopia óptica. O índice endocítico foi

calculado como o percentual de células infectadas x formas amastigotas/célula, e imagens representativas foram adquiridas em um microscópio de luz acoplado a uma câmera digital DS-L3 (Nikon Corporation, Sendai, Japão). Além disso, as células infectadas foram coletadas em diferentes dias, com os tampões de lise dos kits *High Pure RNA Tissue Kit* e *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Life Science, Mannheim, Alemanha), para posterior purificação de RNA e DNA.

A linhagem de células H9C2 também foi submetida à detecção de micoplasma seguindo um protocolo previamente estabelecido (van Kuppeveld et al., 1992; van Kuppeveld et al., 1994). Todos os reagentes foram adquiridos da ThermoFisher Scientific, Brasil.

3.6 Ensaios de viabilidade de *T. cruzi*

Os parasitos foram colhidos por centrifugação e contados em câmara de Neubauer conforme descrito nos itens 3.1 (para formas epimastigotas) e 3.4 (para formas tripomastigotas).

Para os ensaios de viabilidade, lisados de 5×10^4 parasitos/mL parasito foram preparados através da imersão destas amostras em água fervente por 20 minutos. Após o resfriamento, foram separadas, em tubos de 1,5mL, alíquotas de 300 μ L de amostras contendo lisados de epimastigotas. Os lisados foram coletados em diferentes pontos de tempo pós fervura (0, 1, 2 e 3 dias após a lise), com os tampões de lise dos kits *High Pure RNA Tissue Kit* e *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Life Science, Mannheim, Alemanha), para posterior purificação de RNA e DNA. Já os lisados de formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram adicionados em cada poço da placa de 6 poços contendo células H9C2 aderidas, seguindo o mesmo protocolo de infecção que foi descrito no item 3.4.

O exame ao microscópio foi feito para avaliar a presença de parasitas vivos, através da detecção do batimento flagelar.

3.7 Tratamento com Benznidazol

O benznidazol foi obtido do Laboratório de Farmacotécnica Experimental (Farmanguinhos/FIOCRUZ), sendo diluído, primeiramente, em DMSO na concentração de 100 mM e homogeneizado. A partir daí, foi feita uma diluição

intermediária de 10mM em DMSO e uma diluição subsequente com PBS 1X (pH 7,4) até a concentração de 1 mM para uso nos experimentos. Após a etapa de infecção experimental, descrita no item 3.5, um volume de 50 µL de benznidazol a 1mM foi adicionado nas placas de 6 poços contendo uma monocamada de 5×10^4 células H9C2 em 5mL de meio DMEM. As placas foram incubadas na estufa sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e as análises foram feitas nos dias 0, 1 (imediatamente após o tratamento com Benznidazol), 2, 3, 4 e 5 após a infecção. Em paralelo, foi feito um ensaio com um grupo controle, de células H9C2 infectadas experimentalmente com *T. cruzi*, mas sem tratamento com Benznidazol. Os grupos controle e tratado com 10 µM de Benznidazol foram coletados nesses diferentes pontos de tempo após infecção e tratamento, com os tampões de lise dos kits *High Pure RNA Tissue Kit* e *High Pure PCR Template Preparation Kit*.

3.8 Extração de DNA genômico

Os tratos digestivos dissecados de *R. prolixus* foram extraídos em colunas de sílica, utilizando o *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Life Science, Mannheim, Alemanha). Cada *pool*, contendo o correspondente de 3 tratos digestivos de triatomíneos dissecados, foi transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 20 µL de proteinase K e 180 µL do tampão de lise de tecido. As preparações foram incubadas a 56°C por 120 minutos com agitações periódicas, e a purificação do DNA total foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. A eluição do DNA foi feita com 100 µL do tampão de eluição do kit.

Testamos, também, três diferentes protocolos para a extração de DNA de triatomíneo. Foram seguidos, de acordo com as recomendações dos fabricantes, os protocolos para a purificação de DNA pelos kits *NucleoSpin DNA Insect* (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Life Science), e *QIAAMP DNA Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Foram feitas análises, em triplicata, de dois grupos distintos: com amostras contendo 1 trato digestivo inteiro e com amostras correspondentes a um *pool* de 5 tratos digestivos inteiros de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* não infectadas dez dias após alimentação. Para este ensaio, adicionamos imediatamente antes da extração 5µL de IAC (*Internal Amplification Control*), um controle heterólogo interno de amplificação. O IAC (plasmídeo p-ZErO contendo o gene de aquaporina de *Arabidopsis thaliana*) foi um controle usado para avaliar a eficiência e

reprodutibilidade dos kits de extrações de acordo com a variação nos valores de Ct entre as amostras.

O DNA genômico de amostras de GEA também foi extraído com o *High Pure PCR Template Preparation Kit*. Para monitoramento da eficiência da extração de DNA e para analisar a ausência de inibidores na PCR, foi adicionado, em 300 µL de cada amostra de GEA, 2 µL de um controle exógeno interno (EXO-IPC DNA) imediatamente antes da extração. O EXO-IPC DNA, proveniente do kit comercial *TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)*, é uma molécula de DNA sintética que não apresenta homologia com nenhuma outra sequência de DNA disponível em bancos de dados públicos. Em seguida, foi realizada a extração de DNA, de acordo com as instruções do fabricante com adaptações em algumas etapas. Durante a etapa de lise com proteinase K, as amostras de GEA foram incubadas por 120 minutos a 56°C e o DNA foi eluído em 100 µL com o tampão de eluição do kit.

No caso das células H9C2, as monocamadas de células foram coletadas com 500 µL de tampão de lise de tecido, proveniente do *High Pure PCR Template Preparation Kit*, após extensa homogeneização. Antes da extração também foi adicionado um controle exógeno interno (EXO-IPC DNA) em cada amostra. O DNA genômico foi extraído seguindo as instruções do fabricante. Na última etapa do protocolo, o DNA foi eluído da coluna de sílica em 100 µL do tampão de eluição.

Para cada rodada de extração de DNA, uma amostra não infectada foi incluída como controle negativo. Todas as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C e sua pureza e concentração foram estimadas usando um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 260/280 e 260/320 nm.

Para evitar contaminação, todas as etapas dos protocolos foram realizadas em câmara previamente irradiada com luz UV e todo o material utilizado nesta etapa foi devidamente descontaminado.

3.9 Extração de RNA e Transcrição Reversa

RNA de *pools* com 3 tratos digestivos de *R. prolixus* dissecados foi extraído em colunas de sílica, utilizando o *High Pure RNA Tissue Kit* e seguindo o protocolo informado pelo fabricante. A eluição do RNA foi feita com 30 µL do tampão de eluição do kit. Já as monocamadas de células H9C2, cultivadas em placa de 6 poços

conforme descrito no item 3.5, foram rompidas por homogeneização em 500 µL de Tampão de Lise de Tecido do *High Pure RNA Tissue Kit*. Antes da extração de RNA, foi adicionado, como controle exógeno interno, 2 µL (correspondente a 10⁶ transcritos de RNA de *Luciferase Control RNA* (Promega, Wisconsin, EUA). O RNA total foi extraído usando o mesmo kit, de acordo com as recomendações do fabricante e em uma eluição final de 50µL. Para cada rodada de extração de RNA, uma amostra não infectada foi incluída como controle negativo.

O RNA total purificado foi dosado pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e armazenado à -80°C para posterior síntese do DNA complementar (cDNA). Antes da transcrição reversa, o RNA foi pré-tratado para eliminar DNA de fitas simples e dupla, utilizando o kit *DNase-1, Amplification Grade* (Sigma-Aldrich). Um micrograma de RNA tratado foi convertido em cDNA com o *SuperScript III First-Str& Synthesis SuperMix* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), seguindo o protocolo e a programação informada pelo fabricante para síntese de cDNA com *primer* randômico. As reações de transcrição reversa foram realizadas no termociclador *SimpliAmp Thermo Cycler* da *Applied Biosystems* (Foster City, CA, EUA). 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.

3.10 Obtenção de Curvas Padrão

Os ensaios de quantificação da carga parasitária foram realizados a partir de quantificação absoluta baseada em curva padrão. Portanto, todos os ensaios de qPCR e RT-qPCR tiveram curvas padrão inseridas em cada placa e cada ponto da curva foi ensaiado em duplicata.

Quantificação absoluta da carga parasitária em *R. prolixus* infectados: Para obtenção das curvas padrão de parasitos foram feitas diluições seriadas de DNA e cDNA de amostras reconstituídas do trato digestivo de triatomíneo contaminadas artificialmente com 10⁷ epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c). As concentrações variaram de 10⁷ até 0,1 equivalentes de parasito. Para a curva padrão de triatomíneo foram feitas diluições seriadas de DNA e cDNA correspondentes a um *pool* de 3

tratos digestivos de triatomíneos não infectados, com concentrações variando de 3 a 0,003 equivalentes de triatomíneo.

Quantificação absoluta da carga parasitária em GEA: Antes da etapa de centrifugação, que antecede a extração de DNA, amostras de GEA foram contaminadas experimentalmente com *T. cruzi* (Dm28c) para a concentração de 10^6 epimastigotas/mL. As curvas foram geradas por diluição seriada do DNA na proporção 1:10, utilizando DNA de GEA como diluente. As concentrações da curva variaram de 10^6 a 0,1 equivalentes de *T. cruzi*/mL.

Quantificação absoluta da carga parasitária em células H9C2 infectadas: Para a obtenção de curvas padrão de tripomastigotas foram feitas diluições seriadas de DNA e de cDNA de 10^7 tripomastigotas de *T. cruzi* (Dm28c), obtidos a partir da infecção de células VERO. As concentrações da diluição variaram de 10^7 a 0,1 equivalentes de parasita e como diluentes foram usados PBS 1X para o DNA e água DEPC para o cDNA.

Cada diluição correspondeu a um ponto que compôs a curva padrão para quantificação absoluta da parasitemia das amostras utilizadas para este estudo.

3.11 Ensaios de PCR em Tempo Real (qPCR)

Para a detecção e quantificação simultânea de DNA de *T. cruzi* nas amostras estudadas, foram realizados ensaios de quantificação absoluta utilizando o sistema *TaqMan* (Life Technologies). Com este sistema, foram realizadas PCR em Tempo real *multiplex*, capazes de detectar concomitantemente dois alvos em um mesmo ensaio.

Para avaliar a infecção de *T. cruzi* em amostras de triatomíneo foram utilizados dois conjuntos de iniciadores e sondas (**Tabela 3.1**). Um conjunto amplifica uma região de 166 pares de base no DNA satélite de *T. cruzi* (Piron et al., 2007). Concomitantemente, foi usado um segundo conjunto com alvo para a região 12S do gene do RNA ribossomal de triatomíneos.

Tabela 3.1. Conjunto de *primers* e sondas utilizado para os ensaios de qPCR *multiplex* em triatomíneos.

Alvo	<i>Primers/</i> <i>Sonda</i>	Sequências	Tam. Amplicon	Referência
SatDNA <i>T. cruzi</i>	Cruzi 1	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA	165 pb	Piron et al. 2007
	Cruzi 2	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA		
	Cruzi 3	FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB		
12S rRNA Triatomíneo	P2b	AAAGAATTTGGCGGTAATTTAGTCT	163 pb	Uehara et al., 2012
	P6R	GCTGCACCTTGACCTGACATT		
	Triat	VIC-TCAGAGGAATCTGCCCTGTA-NFQ- MGB		

Já nos ensaios comparando os três kits de extração de DNA em insetos, as amostras foram testadas por qPCR, em *singleplex*, utilizando sistema *SYBR Green*, no qual os alvos foram avaliados separadamente. Um par de *primers* foi utilizado para amplificar a região 12S do gene do RNA ribossomal de triatomíneos e outro tinha como alvo o controle heterólogo IAC (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2. Conjunto de *primers* utilizado para os ensaios de qPCR *singleplex* em triatomíneos

Alvo	<i>Primers/</i> <i>Sonda</i>	Sequências	Tam. Amplicon	Referência
IAC	IAC Fw	ACCGTCATGGAACAGCACGTA	100 pb	Duffy et al., 2013
	IAC Rv	CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT		
12S rRNA Triatomíneo	P2b	AAAGAATTTGGCGGTAATTTAGTCT	163 pb	Uehara et al. 2012
	P6R	GCTGCACCTTGACCTGACATT		

Para os ensaios com amostras de açaí e de células H9C2 experimentalmente infectadas, além do conjunto de iniciadores e sondas para o alvo no DNA nuclear satélite de *T. cruzi*, foi utilizado, também, um conjunto de *primers* e sonda *TaqMan* (VIC/TAMRA) pré-desenhados com alvo na sequência de DNA sintético EXO-IPC (**Tabela 3.3**). Este conjunto de *primers* e sonda, bem como o EXO-IPC DNA, que é adicionado na etapa de extração do DNA, são fornecidos pelo kit comercial *TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) e foi adicionado ao ensaio em uma concentração de 0,5X. O EXO-IPC foi utilizado para monitorar a reprodutibilidade e a eficiência da extração de DNA e a ausência de inibidores na PCR.

Tabela 3.3. Conjunto de *primers* e sondas utilizado para os ensaios de qPCR *multiplex* em amostras de GEA e de células H9C2 experimentalmente infectadas.

Alvo	Primers/ Sonda	Sequências	Tam. Amplicon	Referência
SatDNA <i>T. cruzi</i>	Cruzi 1	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA	165 pb	Piron et al. 2007
	Cruzi 2	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA		
	Cruzi 3	FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ- MGB		
EXO-IPC (VIC/TAMRA)	Não Disponível	Não Disponível	Não Disponível	Applied Biosystems (Cat. No. 4308323)

Todos os ensaios quantitativos foram realizados no equipamento *Viiia 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), albergado pela plataforma PDTIS RPT-09A, com a seguinte programação: atividade inicial da enzima *AmpErase* (50°C, 1 min), desnaturação inicial/ativação Taq Polimerase Hot Start (95°C, 10 min), 45 ciclos de desnaturação (95°C, 15 seg) e anelamento/extensão (58°C, 1 min). As reações foram feitas em duplicata, usando 2 µL de DNA como molde 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 qPCR.

3.12 Ensaios de RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

Foram realizados ensaios de quantificação absoluta, em *singleplex*, de RNA através de PCR em Tempo real com transcrição reversa, utilizando o sistema *SYBR Green* (Life Technologies). Para avaliar a infecção de *T. cruzi* em amostras de triatomíneo, utilizamos um conjunto de iniciadores com alvo no GAPDH de *T. cruzi* (TcGAPDH), que é expresso de forma constitutiva em todos os estágios evolutivos do parasito. E, como normalizador da quantificação por RT-qPCR foram utilizados os iniciadores desenhados para o alvo 12S do gene do RNA ribossomal de triatomíneos (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Conjunto de *primers* e sondas utilizado para os ensaios de quantificação de parasitos viáveis por RT-qPCR *singleplex* em triatomíneos

Alvo	<i>Primers/ Sonda</i>	Sequências	Tam. Amplicon	Referência
<i>T. cruzi</i> GAPDH	TcGAPDH Fw	GTGCGGCTGCTGTCAACAT	100 pb	Silva-Gomes et al., 2014
	TcGAPDH Rv	AAAGACATGCCCGTCAGCTT		
12S rRNA Triatomíneo	P2b P6R	AAAGAATTTGGCGGTAATTTAGTCT GCTGCACCTTGACCTGACATT	163 pb	Uehara et al. 2012

Para os ensaios infecção experimental de *T. cruzi* em células H9C2, além do conjunto de iniciadores TcGAPDH, foi utilizado, também, um conjunto de *primers* pré-desenhados com alvo na Luciferase (**Tabela 3.5**), usada como controle interno exógeno. Estes *primers*, bem como os transcritos de RNA da Luciferase ($9,84 \times 10^{11}$ transcritos/ μ L), que são adicionados na etapa de extração do RNA, são fornecidos pelo kit comercial *Luciferase Control RNA* (Promega, Wisconsin, EUA). Com a mesma finalidade que o EXO-IPC, a Luciferase foi utilizada para monitorar a reprodutibilidade e a eficiência da extração de RNA e a ausência de inibidores na RT-qPCR.

Tabela 3.5. Conjunto de *primers* e sondas utilizado para os ensaios de quantificação da viabilidade por RT-qPCR *singleplex* em H9C2 experimentalmente infectadas

Alvo	<i>Primers/ Sonda</i>	Sequências	Tam. Amplicon	Referência
<i>T. cruzi</i> GAPDH	TcGAPDH Fw	GTGCGGCTGCTGTCAACAT	100 pb	Silva-Gomes et al. 2014
	TcGAPDH Rv	AAAGACATGCCCGTCAGCTT		
Luciferase	Luc Fw	TACAACACCCCAACATCTTCGA	Não Disponível	Promega (Cat. No. L4561)
	Luc Rv	GGAAGTTCACCGGCGTCAT		

Os ensaios quantitativos foram realizados no equipamento *Viiia 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), albergado pela plataforma PDTIS RPT-09A, de acordo com a seguinte programação: desnaturação inicial (95°C, 10 min), 45 ciclos de desnaturação (95°C, 15 seg) e anelamento/extensão (62°C, 1 min para o alvo TcGAPDH e 58°C, 1 min para a Luciferase). 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 μ L de cDNA como molde em um volume total de 20 μ L. Além das amostras, cada placa de reação de 96 poços incluiu a curva padrão, um controle negativo da reação (usando água ultrapura como template) e dois controles positivos (DNA de *T. cruzi* a 10 fg/ μ L e a 1 fg/ μ L).

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.

3.13 Ensaios de Inclusividade e Exclusividade

Para o desenvolvimento e padronização da qPCR para amostras de GEA, alguns parâmetros para validação analítica foram incluídos, tais como: ensaio de inclusividade (i), para a detecção específica das cepas alvo, e ensaio de exclusividade (ii), para avaliar a detecção de espécies relacionadas a espécie alvo, na qual não se espera que sejam detectadas mas que podem gerar reação cruzada, (ISO 1640, 2016). **(i) Estudo de inclusividade:** para avaliar a capacidade da qPCR em detectar o *T. cruzi* em amostras de GEA, o DNA genômico de um painel representativo de cepas/clones pertencentes as seis diferentes DTUs de *T. cruzi* foi testado: Dm28c (TcI); Y (TcII); INPA 3663 (TcIII); INPA 4167 (TcIV); LL014 (TcV); CL Brener (TcVI). As amostras foram testadas em duplicatas, com concentrações variando de 10^4 a 0,1 equivalentes de parasita/mL. **(ii) Estudo de exclusividade:** para avaliar a ausência de resposta desta qPCR frente a outras espécies de tripanossomatídeos, foram testadas diluições seriadas de DNA genômico de: *Trypanosoma rangeli*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Herpetomonas muscarum* e *Chitridia fasciculata*. As amostras foram analisadas em duplicata, com concentrações variando de 10^4 a 0,1 equivalentes de parasita/mL.

3.14 Análises Estatísticas

Os experimentos foram realizados em três replicatas biológicas, no mínimo. Os dados de quantificação absoluta da carga parasitária 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 entre dois grupos, 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 ($p < 0,05$). Todas as análises foram conduzidas com o programa *Sigmaplot Windows* versão 13.0 (Systat Software, Inc., California, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Padronização de um novo ensaio de qPCR para quantificação de *T. cruzi* em amostras de polpa de açaí

Primeiramente, nós desenvolvemos um ensaio diagnóstico molecular baseado em qPCR, sistema *multiplex*, para a detecção e quantificação do DNA de *T. cruzi* em polpa de açaí. Para tanto, adaptamos e padronizamos um protocolo simples de extração de DNA em açaí com o kit *High Pure PCR Template Preparation Kit* (ROCHE).

Amostras de açaí foram submetidas a uma etapa de pré-lise seguida de uma etapa de centrifugação conforme descrito no **item 3.3**. Antes de separar o sobrenadante para extração do DNA, as amostras de GEA foram artificialmente contaminadas com diferentes concentrações de *T. cruzi* (Dm28c), que variaram de 10 até 0,01 equivalentes de parasita/mL. Além disso, para monitorar a estabilidade do DNA e avaliar a reprodutibilidade do processo de extração, foi adicionado, em cada alíquota de GEA a ser utilizada para a extração de DNA, um controle interno exógeno (DNA EXO-IPC). Em seguida, por meio de ensaios de qPCR, foi avaliada a amplificação do DNA EXO-IPC de amostras de GEA com baixas concentrações de *T. cruzi* (**Figura 4.1**).

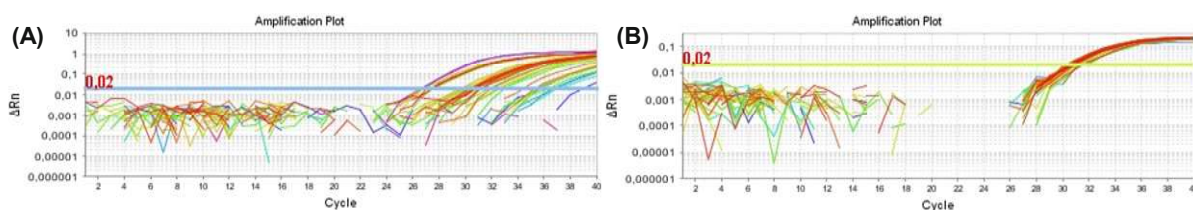


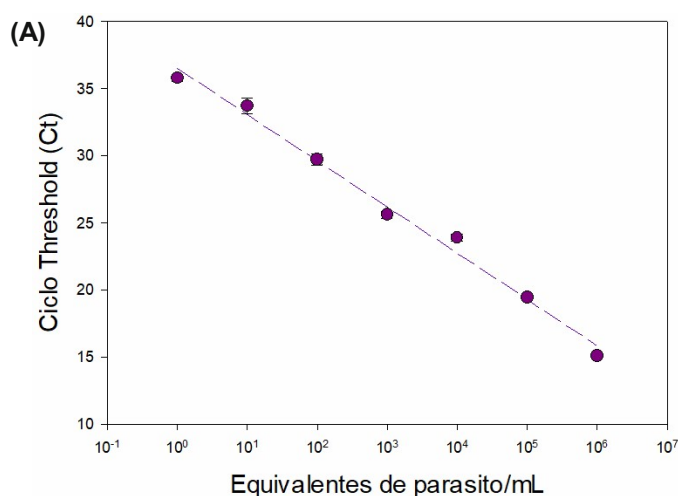
Figura 4-1. Curvas de amplificação para os alvos DNA nuclear satélite de (A) *T. cruzi* e (B) EXO-IPC DNA. A extração do DNA das amostras de GEA foi feita com o kit comercial *High Pure PCR Template Preparation* (ROCHE).

Conforme demonstrado na **Tabela 4.1**, houve amplificação do *T. cruzi*, pelo alvo SatDNA em todas as concentrações testadas, com a qPCR atingindo uma sensibilidade de 0,01 eq. par./mL (Ct de $36,82 \pm 1,3$). Além disso, os valores de Ct para o Exo-IPC variaram de $30,50 \pm 0,12$ a $30,92 \pm 0,44$, independentemente da concentração de *T. cruzi* nas amostras.

Tabela 4.1. Ensaio de sensibilidade para amostras de GEA contaminadas artificialmente com diferentes concentrações *T. cruzi*. Os ensaios foram realizados com DNA genômico obtido de amostras de GEA com concentrações de *T. cruzi* (Dm28c) variando de 10 a 10⁻² equivalentes de parasitas/mL. Em todas as amostras foi utilizado o controle positivo interno exógeno (EXO-IPC). Resultados apresentados como Ct média ± DP.

Alvos	Equivalentes de parasito/mL						
	10	1	0,75	0,5	0,25	0,1	0,01
SatDNA	27,32 ± 0,34	30,22 ± 0,44	30,52 ± 0,31	31,34 ± 0,79	32,14 ± 0,77	35,47 ± 0,68	36,82 ± 1,30
EXO IPC (2µL)	30,57 ± 0,17	30,59 ± 0,24	30,92 ± 0,44	30,84 ± 0,16	30,50 ± 0,12	31,10 ± 0,39	30,84 ± 0,47

Em seguida ao ensaio de sensibilidade, foi determinada a linearidade da reação, para a quantificação da carga parasitária em GEA. Uma curva padrão foi ensaiada contendo diferentes concentrações de DNA de *T. cruzi*, que variaram de 10⁶ a 10⁰ equivalentes de parasito/mL. Nestas condições, foi possível obter uma elevada linearidade ($R^2 = 0,99$) e uma eficiência da reação de 89,65% para a amplificação do alvo satDNA (**Figura 4.2**).



(B) Alvo	Parâmetros da equação da reta [1]		R ² [2]	Eficiência de Amplificação (%)
	Slope	Intercept		
<i>T. cruzi</i> SatDNA	-3,60	36,80	0,99	89,7

[1] Coeficiente de linearidade de $y = ax + b$, onde a é o *slope* (inclinação da reta) e b é o *intercept*; A regressão linear e a equação da reta foram calculadas pelo software Sigmaplot V12.0 (SYSTAT Software)

[2] Coeficiente de determinação das curvas padrão.

Figura 4-2. Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de *T. cruzi* em amostras de GEA por qPCR multiplex. (A) Amostras obtidas a partir de diluições seriadas de DNA extraído de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) em DNA de GEA, na faixa de 10⁶ a 10⁰ equivalentes de parasito/mL. (B) Parâmetros da curva padrão para o alvo DNA nuclear satélite do *T. cruzi*

Posteriormente, ensaios de inclusividade e exclusividade foram realizados. Para o ensaio de inclusividade, foi analisada a amplificação do alvo SatDNA em amostras de GEA contaminadas artificialmente com cepas ou clones de *T. cruzi* pertencentes às seis DTUs, de TcI a TcVI. A **Tabela 4.2** mostra que o ensaio de qPCR *multiplex* foi capaz de detectar todas as seis DTUs de *T. cruzi*, de 10⁴ a 0,1 eq. par./mL, com valores de Ct variando de 20,37 ± 1,25 (para TcV, em 10⁴ eq. par./mL) a 42,80 (para TcVI, em 0,1 eq. par./ mL).

Tabela 4.2. Ensaio de inclusividade para a detecção de diferentes DTUs de *T. cruzi* em amostras de GEA pela qPCR *multiplex*. As concentrações de DNA das seis diferentes DTUs de *T. cruzi* variaram de 10⁴ até 10⁻¹ equivalentes de parasito/mL. Resultados apresentados como Ct média ± DP

DTUs	Equivalentes de parasito/mL					
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1	0,1
TcI (Dm28c)	24,60 ± 0,61	29,67 ± 2,03	32,25 ± 0,16	34,32 ± 1,59	37,50 ± 0,17	40,99 ± 1,82
TcII (Y)	20,39 ± 0,02	24,35 ± 0,02	28,44 ± 0,09	30,50 ± 0,51	35,57 ± 0,80	37,28 ± 0,44
TcIII (3663)	23,00 ± 1,29	26,79 ± 0,50	32,94 ± 2,80	34,77 ± 1,30	41,18 ± 3,19	39,39 ± 1,26
TcIV (4167)	22,57 ± 0,40	27,45 ± 0,30	31,71 ± 0,26	34,42 ± 0,36	38,00 ± 5,13	39,58*
TcV (LL014)	20,37 ± 1,25	24,14 ± 0,27	28,27 ± 0,20	30,51 ± 0,62	34,71 ± 1,22	36,74 ± 2,00
TcVI (CL Brener)	20,50 ± 0,05	25,20 ± 0,62	28,34 ± 0,73	30,96 ± 0,45	34,67 ± 0,25	42,80*

*Amostras que apresentaram amplificação em apenas uma das duplicatas, sem desvio padrão.

Em relação ao ensaio de exclusividade, amostras de GEA foram contaminadas artificialmente com DNA de diferentes espécies da família Trypanosomatidae (*Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Crithidia* sp., *Herpetomonas* sp. e *Trypanosoma rangeli*). A amplificação cruzada do SatDNA pelo ensaio de qPCR *multiplex* foi, então, investigada para essas espécies. Com o ensaio, observamos que os DNAs de *Leishmania (L.) amazonensis*, *L (V.) braziliensis*, *Crithidia* sp. e *Herpetomonas* sp., não apresentaram amplificação em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, o DNA de *T. rangeli* apresentou amplificação para o alvo DNA sat em todas as concentrações testadas na qPCR, de 10⁴ eq. par./mL a 0,1 eq. par./mL (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.3. Ensaio de exclusividade para a detecção de diferentes espécies de tripanossomatídeos em amostras de GEA pela qPCR *multiplex*. As amostras de DNA purificado de diferentes espécies de tripanossomatídeos foram ensaiadas em concentrações que variaram de 10⁴ até 10⁻¹ equivalentes de parasito/mL. Resultados apresentados como Ct média ± DP.

Amostras	Equivalentes de parasito/mL					
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1	0,1
<i>L. amazonensis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>L. brasiliensis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Crithidia</i> sp.	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Herpetomonas</i> sp.	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>T. rangeli</i>	22.95 ± 0.58	27.83 ± 0.62	31.18 ± 0.30	32.95 ± 0.20	33.94 ± 0.64	38.91 ± 0.60

NA – Não amplificou

A técnica padronizada de PCR em tempo real, sistema *multiplex*, para amostras de GEA foi, então, validada com 45 amostras de polpa de açaí coletadas em diferentes pontos de venda da cidade de Coari (Estado do Amazonas, Brasil). Antes de serem submetidas ao diagnóstico molecular, as amostras de açaí foram analisadas por microscopia óptica, no qual todas foram negativas para a presença de *T. cruzi*. No entanto, ao serem quantificadas para avaliação da carga parasitária do DNA de *T. cruzi*, 9 das 45 amostras de GEA (20%) foram positivas por qPCR, com suas cargas variando de 0,002 a 19,05 eq. par./mL (**Tabela 4.4**). Além disso, todas as amostras amplificaram para o controle interno exógeno, com Cts de 28,51 ± 0,75 a 34,94 ± 0,48 validando, desta forma, as amostras verdadeiro-negativas.

Tabela 4.4. Validação do ensaio de quantificação da carga parasitária, por qPCR *multiplex*. 45 amostras de polpa de açaí coletadas em diferentes pontos de venda na cidade de Coari (Amazonas). As amostras positivas para qPCR estão destacadas em verde. Os resultados foram indicados como Ct médio ± DP e a carga parasitária mostrada como eq. par./mL.

Amostras	Alvos	Ct ± DP	Carga Parasitária (Eq. Parasito/mL)	Microscopia
1	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	33.17 ± 0.39		
2	SatDNA	36,42	19,050	Negativo
	Exo-IPC	33.23 ± 0.66		
3	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	31.24 ± 2.56		
4	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	34.94 ± 0.48		
5	SatDNA	NA	Negativo	Negativo

	Exo-IPC	34.27 ± 0.12		
6	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	32.84 ± 0.06		
7	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	33.40 ± 0.47		
8	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	28.53 ± 0.42		
9	SatDNA	34,64	0,210	Negativo
	Exo-IPC	29.88 ± 0.02		
10	SatDNA	35,97	0,103	Negativo
	Exo-IPC	32.20 ± 0.42		
11	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	34.80 ± 0.94		
12	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	33.09 ± 0.21		
13	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	33.99 ± 0.08		
14	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	32.54 ± 0.07		
15	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	32.82 ± 0.12		
16	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	33.11 ± 0.08		
17	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	33.02 ± 0.28		
18	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	32.88 ± 0.37		
19	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	32.54 ± 0.41		
20	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	32.72 ± 0.15		
21	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	32.23 ± 0.73		
22	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	31.89 ± 0.25		
23	SatDNA	41,99	0,002	Negativo
	Exo-IPC	31.61 ± 0.25		
24	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	31.92 ± 0.27		
25	SatDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	32.90 ± 0.19		
26	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	32.18 ± 0.16		
27	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	32.63 ± 0.16		
28	satDNA	37,49	10,600	Negativo
	Exo-IPC	32.62 ± 0.90		
29	satDNA	NA	Negativo	Negativo

	Exo-IPC	31.78 ± 0.16		
30	satDNA	37,91	8,433	Negativo
	Exo-IPC	33.42 ± 0.21		
31	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	33.07 ± 0.05		
32	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	34.10 ± 0.26		
33	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	33.39 ± 0.02		
34	satDNA	39,31 ± 1,90	0,014 ± 0,01	Negativo
	Exo-IPC	32.94 ± 0.16		
35	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	31.54 ± 0.86		
36	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	32.73 ± 0.31		
37	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	29.41 ± 0.24		
38	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	29.20 ± 0.60		
39	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	29.63 ± 0.45		
40	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	28.51 ± 0.75		
41	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	29.23 ± 0.11		
42	satDNA	37,67	0,029	Negativo
	Exo-IPC	28.68 ± 0.01		
43	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	30.20 ± 0.19		
44	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	29.87 ± 0.40		
45	satDNA	NA	Negativo	Negativo
	Exo-IPC	34.08 ± 0.52		

NA – Não houve amplificação

4.2 Comparação de Kits para Extração de DNA em Insetos

Considerando que a obtenção de DNA puro e quantificável é uma etapa importante para diagnóstico molecular e quantificação da carga parasitária através da qPCR, o próximo passo deste estudo consistiu em selecionar metodologias para a extração de DNA em amostras de *R. prolixus*, seguindo os protocolos recomendados por um kit de purificação de DNA em insetos (*NucleoSpin DNA Insect*, Macherey-Nagel) e dois em tecidos (*High Pure PCR Template Preparation Kit*, Roche e *QIAAMP DNA Mini Kit*, QIAGEN).

Para as análises de comparação de kits, foram ensaiados dois grupos de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* dez dias após alimentação. Em um grupo, analisamos a eficiência dos três kits de extração em amostras contendo um trato digestivo inteiro dissecado. Para o outro grupo foram utilizadas amostras contendo um *pool* de cinco tratos digestivos do inseto. No final do processo de extração de DNA dos três métodos, foi possível observar que o eluato do grupo contendo DNA de cinco *pools* de intestino apresentou uma coloração escura em relação ao kit Macherey-Nagel, e amarelada nos kits da ROCHE e da QIAGEN. Já no eluato do grupo contendo DNA de apenas um trato digestivo, duas, das três amostras que foram extraídas pelo kit QIAGEN, apresentaram um aspecto amarelado (**Figura 4.3**).

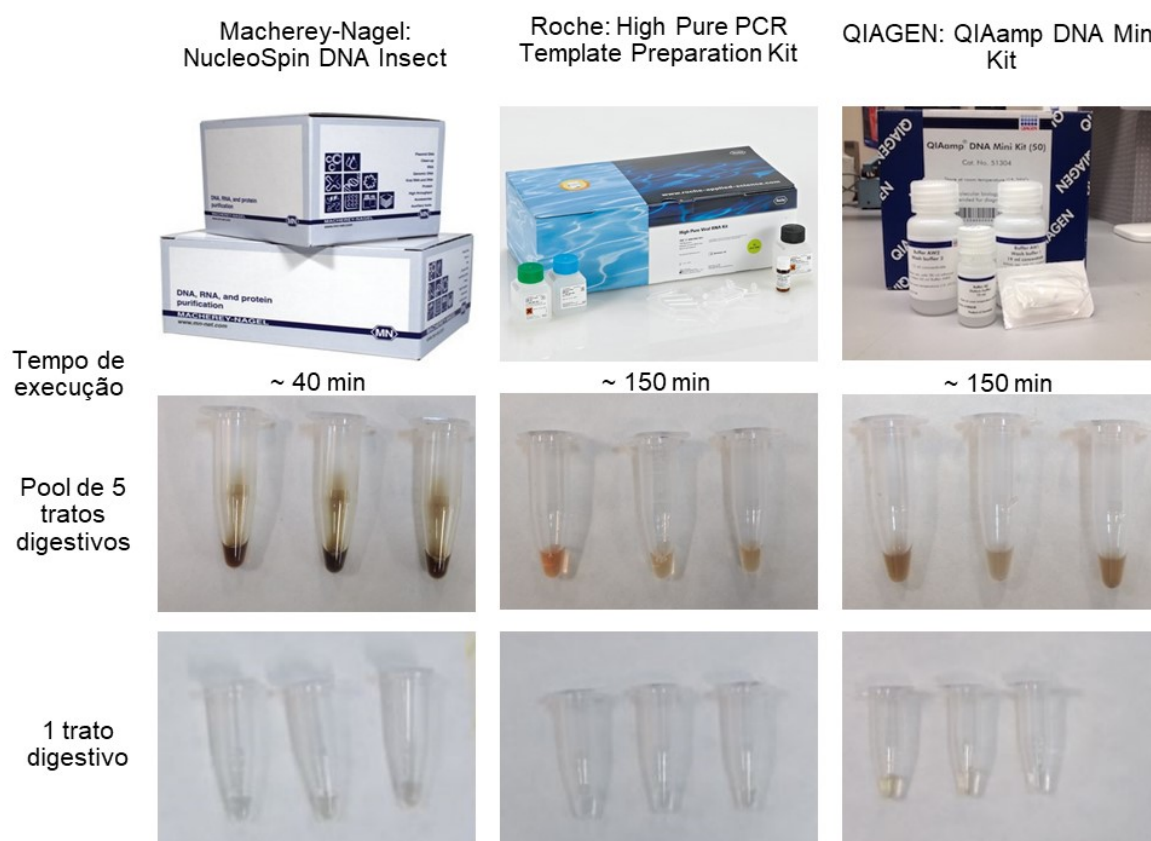


Figura 4-3. Comparação de três kits para extração de DNA com colunas de sílica. Dados de três rodadas de extração (n=3) de amostras contendo cinco intestinos de triatomíneo e de amostras com um intestino de triatomíneo. Análises feitas em triplicatas (n=3) com todo o tubo digestivo de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* 10 dias após alimentação.

Os valores de concentração e pureza do DNA das amostras extraídas foram obtidos a partir de análises no espectrofotômetro NanoDrop ND2000 (**Tabela 4.5**). Os três métodos renderam quantidades suficientes e pureza de DNA para o uso em PCR, para amostras contendo o trato digestivo inteiro. No caso dos *pools*, a coloração amarronzada afetou a leitura do aparelho dando valores que poderiam superestimar a concentração de DNA e inibir a PCR.

Tabela 4.5. Média dos dados de quantidade e pureza obtidas pelo espectrofotômetro das amostras de DNA de 1 trato digestivo e de *pool* com 5 tratos digestivos de *R. prolixus*, extraídos com os kits Macherey-Nagel, Roche e QIAGEN com os respectivos desvios padrão (DP).

Kits	Nº de intestinos	Concentração (ng/ μ L)	\pm DP	A260/280	\pm DP	A260/230	\pm DP
Macherey-Nagel	5	-75	22,52	0,5	0,11	-	-
	1	5,83	4,93	2,13	0,52	0,49	1,34
ROCHE	5	298,5	42,17	1,37	0,04	1,34	0,02
	1	19,67	4,25	1,77	0,06	2,05	0,17
QIAGEN	5	377	193,12	0,55	0,11	0,31	0,14
	1	20,5	24,89	1,21	0,27	0,13	0,13

Após leitura no espectrofotômetro, todas as amostras foram testadas por qPCR, utilizando o sistema *SYBR Green*. Na **Tabela 4.6** podemos observar uma inibição na amplificação do DNA das amostras com 5 intestinos extraídas pelo kit Macherey-Nagel, uma vez que não houve amplificação em nenhum dos dois alvos. Já as amostras extraídas pelo kit da ROCHE apresentaram os melhores valores de Ct e desvio padrão, sendo que o IAC, que foi aplicado na mesma concentração em todas as amostras, apresentou menos variações de Ct entre elas (**Tabela 4.6; Figura 4.4**).

Tabela 4.6. Média dos Cts (com desvios padrão) obtidos por qPCR de amostras contendo um *pool* com 5 tratos digestivos e contendo 1 trato digestivo extraídos com os três diferentes kits Macherey-Nagel, Roche e QIAGEN.

Amostras	<i>Pool</i> 5 Intestinos				1 Intestino			
	Ct IAC	\pm DP	Ct Inseto	\pm DP	Ct IAC	\pm DP	Ct Inseto	\pm DP
Macherey-Nagel	NA*	-	NA*	-	14,58	1,31	11,14	0,52
ROCHE	20,87	1,03	16,76	1,08	21,42	1,09	18,32	1,45
QIAGEN	24,64	3,07	22,70	2,87	26,84	2,21	27,37	1,62

*NA – Não houve Amplificação

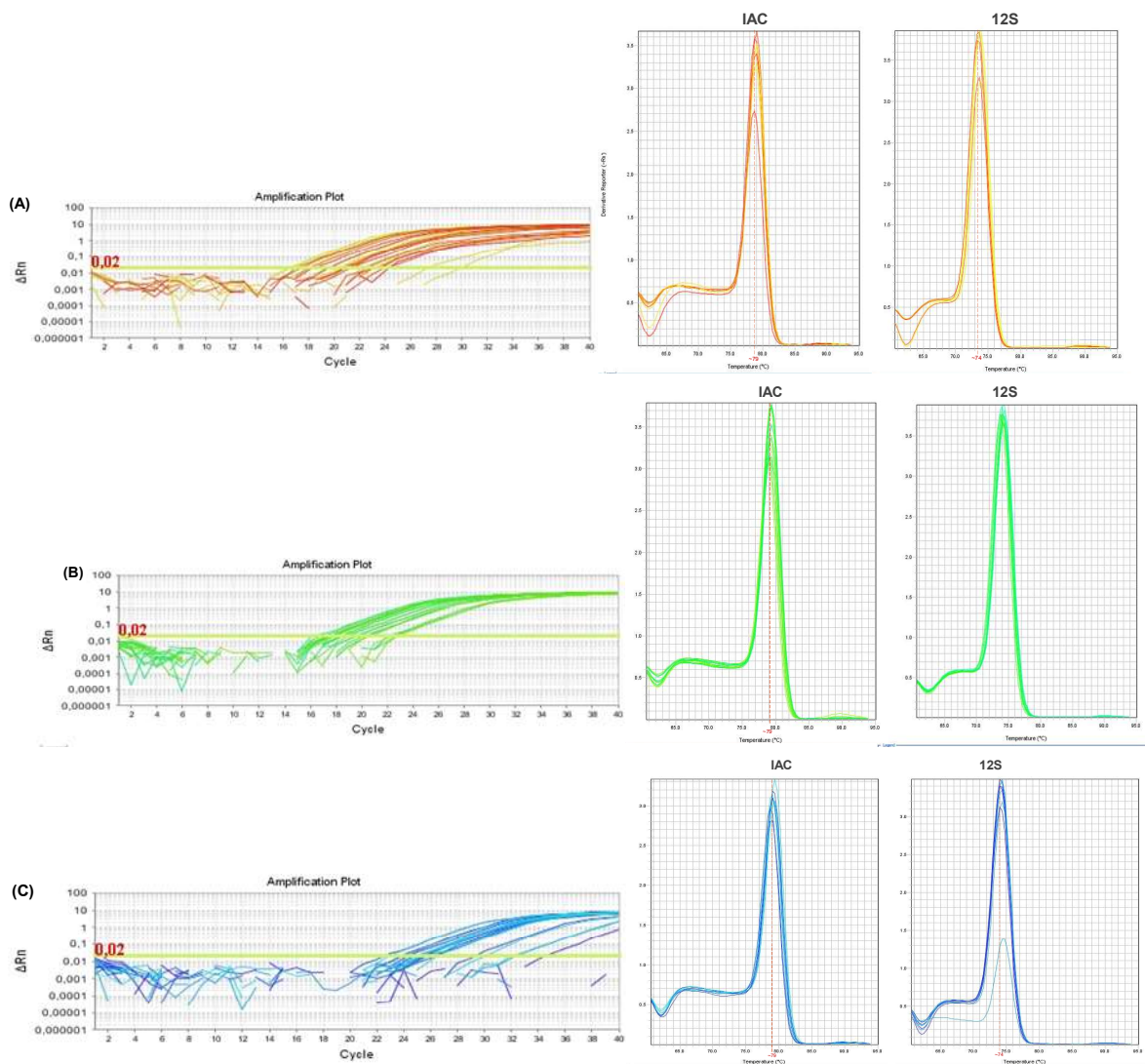


Figura 4-4. Curvas de amplificação e dissociação para os alvos IAC e 12S do triatomíneo no ensaio de qPCR. Amostras de DNA de triatomíneo não infectado extraídas com diferentes kits: (A) Macherey-Nagel, (B) Roche e (C) QIAGEN.

Com o objetivo de analisar a linearidade da detecção de DNA de *T. cruzi*, em amostras de triatomíneo, foram ensaiadas três curvas padrão independentes para cada kit (**Figura 4.5**). Através da análise de regressão linear, foi possível obter uma linearidade elevada para as curvas extraídas pelos três kits, sendo que ROCHE e QIAGEN tiveram um $R^2 = 0,99$ e Macherey-Nagel, que também apresentou um *slope* (inclinação da curva) menor em relação aos kits Roche e QIAGEN, teve um $R^2 = 0,92$. Além disso, a curva extraída pelo kit da ROCHE apresentou a melhor eficiência de PCR em relação as outras duas (**Tabela 4.7**).

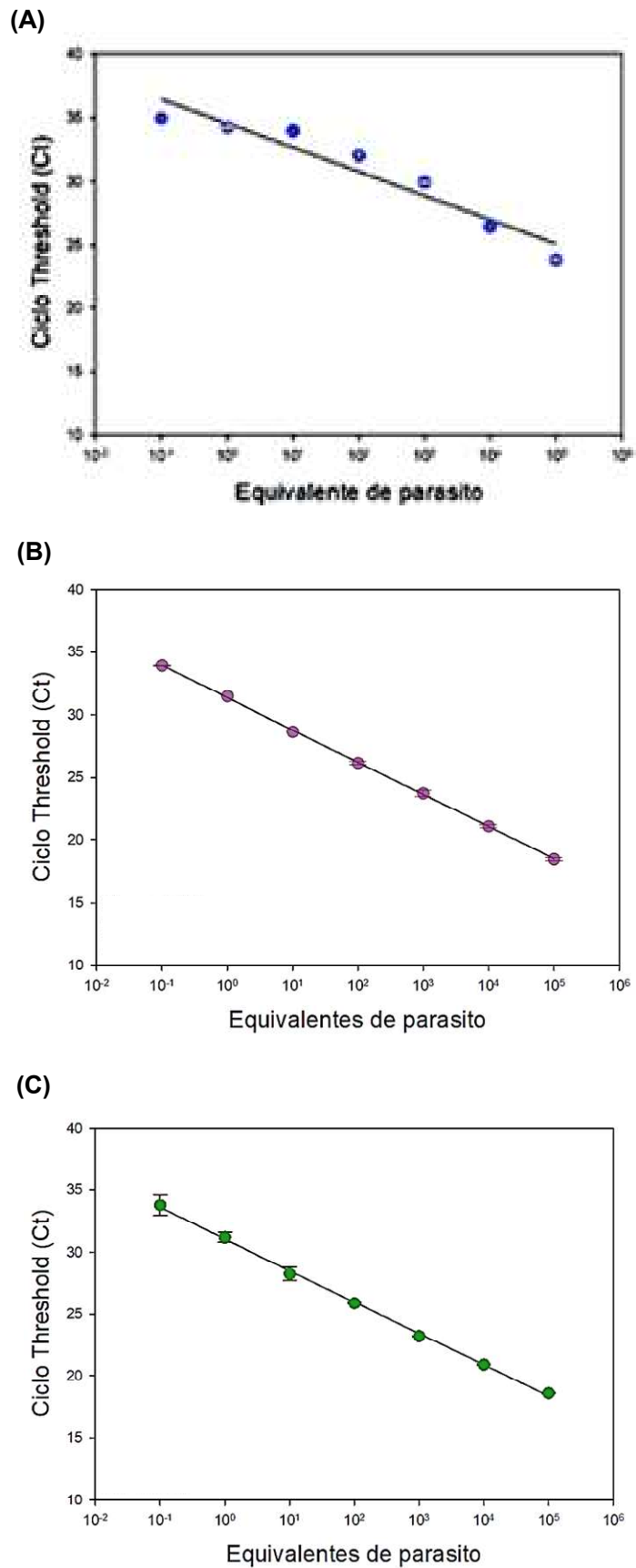


Figura 4-5. Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de *T. cruzi* em *R. prolixus* por qPCR, comparando três kits de extração de DNA. (A) Macherey-Nagel, (B) Roche e (C) QIAGEN. Amostras obtidas a partir de diluições seriadas de DNA extraído de epimastigotas em DNA de triatomíneo, na faixa de 10^5 a 10^{-1} equivalentes de parasito/triatomíneo.

Tabela 4.7. Parâmetros da curva padrão para o alvo DNA nuclear satélite do *T. cruzi*

Kits de Extração	Parâmetros da equação da reta [1]		R ² [2]	Eficiência de Amplificação (%)
	<i>Slope</i>	<i>Intercept</i>		
Macherey-Nagel	-1,95	30,11	0,92	226,7
ROCHE	-3,26	29,53	0,99	104,7
QIAGEN	-2,53	28,19	0,98	128,3

^[1] Coeficiente de linearidade de $y = ax + b$, onde a é o *slope* (inclinação da reta) e b é o *intercept*; ^[1] A regressão linear e a equação da reta foram calculadas pelo software Sigmaplot V12.0,

^[2] Coeficiente de determinação das curvas padrão.

Para este estudo, escolhemos seguir com o protocolo do kit da ROCHE, devido aos resultados obtidos nos dois grupos de amostras de intestino de triatomíneos, proporcionando o isolamento de DNA em quantidade e qualidade adequadas para a detecção e quantificação por qPCR, além de apresentar melhor reprodutibilidade, avaliada através da amplificação do IAC.

4.3 Avaliação da infecção de *R. prolixus* por diferentes DTUs de *T. cruzi*

Uma vez escolhido o melhor kit para extração do DNA em amostras de intestino de triatomíneo, analisamos os padrões de infecção que as diferentes DTUs de *T. cruzi* poderiam causar em *R. prolixus* especificamente, que foi o vetor escolhido como modelo para este estudo. A análise foi feita através da quantificação da carga parasitária, por qPCR, nos dias 7, 14, 21 e 28 após alimentação de seis grupos de *R. prolixus*. Cada grupo consistia em 15 ninfas de 5º estágio, que foram alimentadas com diferentes subpopulações de *T. cruzi* classificadas entre as DTUs I a VI (**Figura 4.6**).

A carga parasitária da **DTU I**, representada pela cepa Dm28c, não apresenta diferenças significativas entre 7 ($2,52 \times 10^5$ eq. parasito/triatomíneo) e 14 ($1,81 \times 10^5$ eq. parasito/triatomíneo) dias após alimentação. Após a segunda semana pós alimentação, entretanto, observamos uma diminuição gradativa na quantidade de parasitos, sendo observada uma carga de $1,10 \times 10^2$ eq.par/triat no último ponto da curva de alimentação. A **DTU II**, representada pela cepa Y, apresenta uma tendência de redução constante na quantidade de parasitos ao decorrer dos dias, sendo a diferença das cargas parasitárias entre os dias após alimentação estatisticamente significativa ($1,78 \times 10^5$ eq. parasito/triatomíneo., $8,52 \times 10^3$ eq. parasito/triatomíneo,

9,15x10² eq. parasito/triatomíneo e média de 46,68 eq. parasito/triatomíneo, respectivamente). As DTUs III e IV, representadas pelas cepas 3663 e 4167 respectivamente, apresentaram semelhantes padrões de infecção no trato digestivo de *R. prolixus*, com uma carga parasitária constante ao decorrer dos dias pós-alimentação e um pequeno aumento na quantidade de parasitos no último ponto. Apesar dos padrões semelhantes, a infecção pela **DTU III** mostrou uma carga parasitária menor (5,72x10⁴ eq. parasito/triatomíneo; 4,22 x 10⁵ eq. parasito/triatomíneo; 9,73x10³ eq. parasito/triatomíneo; e 5,22x10⁵ eq. parasito/triatomíneo) em comparação à carga parasitária observada pela **DTU IV** (4,72x10⁵ eq. parasito/triatomíneo; 8,38x10⁴ eq. parasito/triatomíneo; 1,55x10⁵ eq. parasito/triatomíneo; e 5,33x10⁵ eq. parasito/triatomíneo). A **DTU V**, representada pela cepa LL014, apresentou o maior índice de infecção em *R. prolixus*, quando comparada com as cepas das demais DTUs. Do dia 7 (1,53x10⁵ eq. parasito/triatomíneo) para o dia 14 (1,17x10⁸ eq. parasito/triatomíneo) observamos um aumento da carga parasitária seguido por uma tendência de queda nos dois últimos pontos do experimento (3,09x10⁵ eq. parasito/triatomíneo; e 4,98x10⁴ eq. parasito/triatomíneo). Por fim, a **DTU VI**, representada pela cepa CL Brener, teve uma redução na quantidade de parasitos ao longo dos dias pós alimentação (8,02x10⁵ eq. parasito/triatomíneo no dia 7, 1,31x10⁴ eq. parasito/triatomíneo no dia 14, e 1,54x10³ eq. parasito/triatomíneo no dia 21), com um aumento da carga parasitária no dia 28 (média de 9,15x10⁴ eq. parasito/triatomíneo) após alimentação.

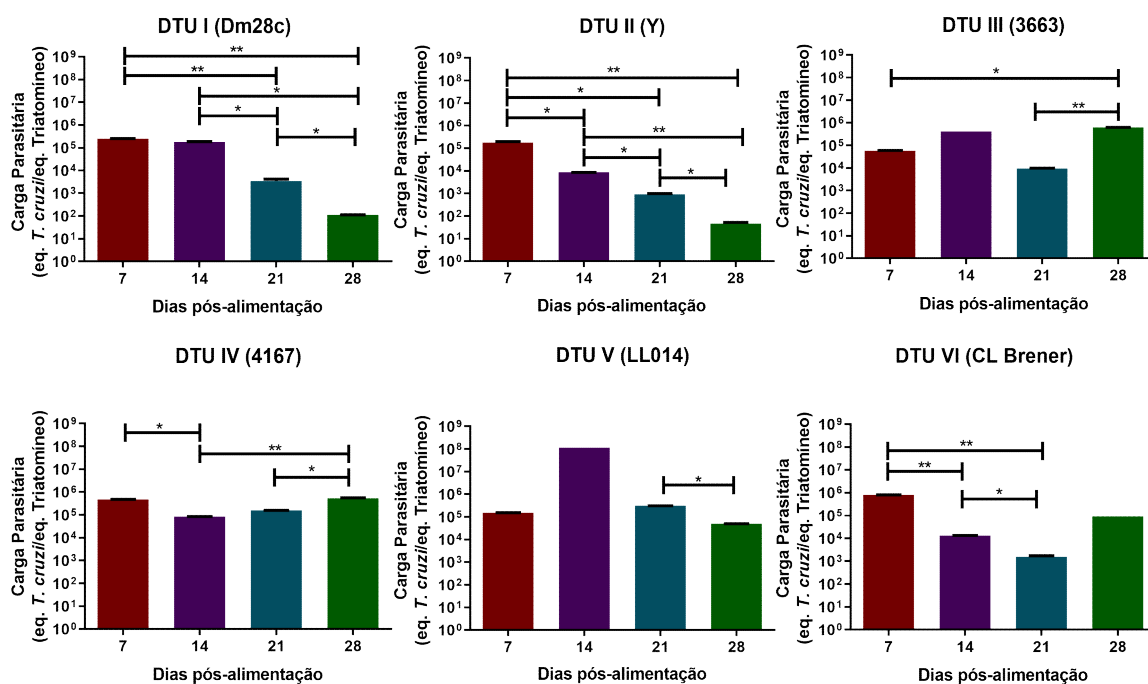


Figura 4-6. Comparação das cargas parasitárias em amostras de *R. prolixus* infectados experimentalmente com diferentes DTUs de *T. cruzi* DTU I, Dm28c; DTU II, Y; DTU III, 3663; DTU IV, 4167; DTU V, LL014; DTU VI, CL Brener. Dados, em duplicata, de uma rodada de alimentação de *R. prolixus* com sangue de coelho contendo seis diferentes DTUs do parasito. Análise feita com um tubo digestivo inteiro de *R. prolixus* 7, 14, 21 e 28 dias após alimentação. Gráfico apresentado em escala logarítmica (Log10). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

4.4 Padronização da RT-qPCR para a quantificação absoluta de *T. cruzi* viáveis

Buscando avaliar o potencial do RNA do parasito como um marcador molecular para quantificar parasitos viáveis no hospedeiro invertebrado, uma qPCR com transcrição reversa (RT-qPCR) foi padronizada com alvo no GAPDH do *T. cruzi* (TcGAPDH) e outro para a região 12s do rRNA do triatomíneo. Esta reação se mostrou específica para ambos os alvos, uma vez que não houve amplificação para o TcGAPDH em amostras de insetos não infectados (Figura 4.7A) e, da mesma forma, não houve amplificação para o alvo do triatomíneo em amostras contendo apenas o cDNA de *T. cruzi* (Figura 4.7C). Além disso, as curvas de dissociação, representadas nos subitens B e D da Figura 4.7, apresentaram um perfil com um pico único, afilado e sem formação de dímeros para ambos os conjuntos de primers.

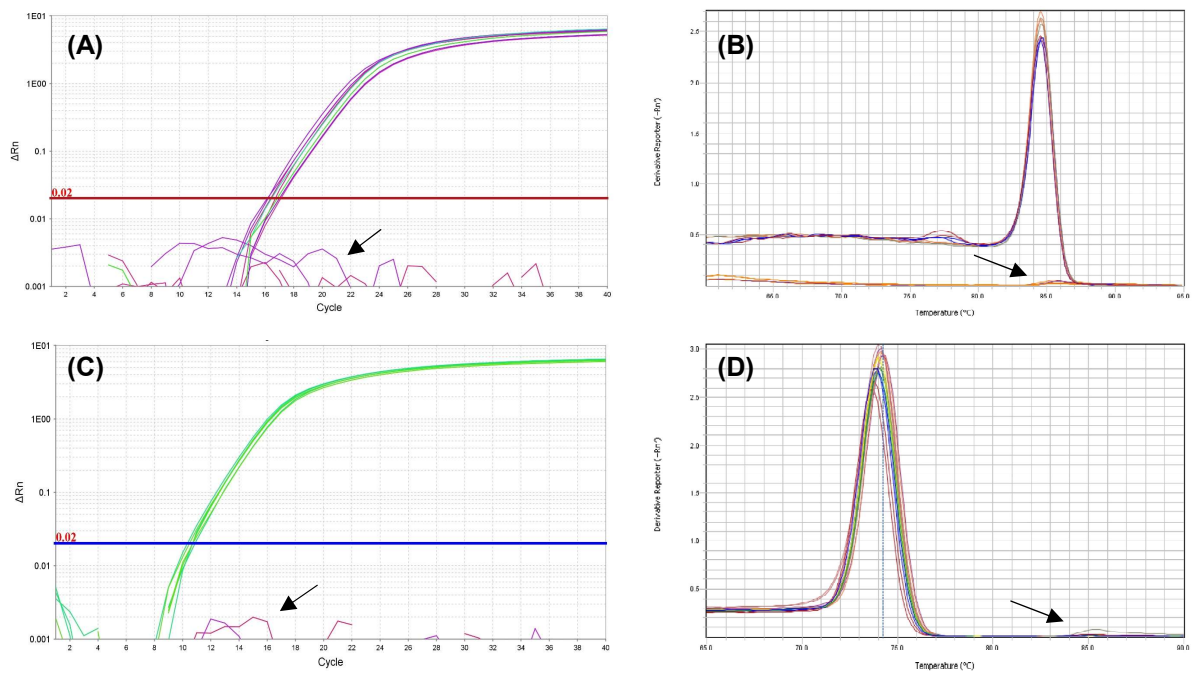


Figura 4-7. Curvas de amplificação e de dissociação da RT-qPCR, sistema SYBR Green. Os ensaios foram realizados com cDNA de *R. prolixus* infectados com *T. cruzi* (Dm28c). **(A)** Curvas de amplificação e **(B)** de dissociação para o alvo TcGAPDH. As setas indicam o controle negativo (NTC) e amostras de *R. prolixus* não infectado. **(C)** Curvas de amplificação e **(D)** de dissociação para o alvo para a região 12s do rRNA de triatomíneo. As setas indicam o NTC e amostras contendo 10⁴ *T. cruzi*/mL.

Em relação à linearidade da RT-qPCR, foram ensaiados cDNA de amostras contendo diferentes concentrações de *T. cruzi*, que variaram de 10⁷ a 10² equivalentes de parasito. Seguindo as concentrações dos *primers* TcGAPDH, que foram previamente definidas por Silva-Gomes et al (2014), foi possível obter uma linearidade elevada ($R^2 = 0,99$) e uma curva padrão com eficiência de 100,3% para a quantificação de parasitos viáveis em amostras de triatomíneos (**Figura 4.8A**). Já para avaliar a linearidade da reação para o alvo do triatomíneo, testamos os cDNA correspondentes a diferentes quantidades do intestino de *R. prolixus* não infectados, que variaram de 3 até 0,003 equivalentes de triatomíneo. Sendo assim, foi possível obter uma linearidade elevada ($R^2 = 0,98$) para a quantificação de amostras de triatomíneos, com uma eficiência de 102,8% (**Figura 4.8B, Tabela 4.8**).

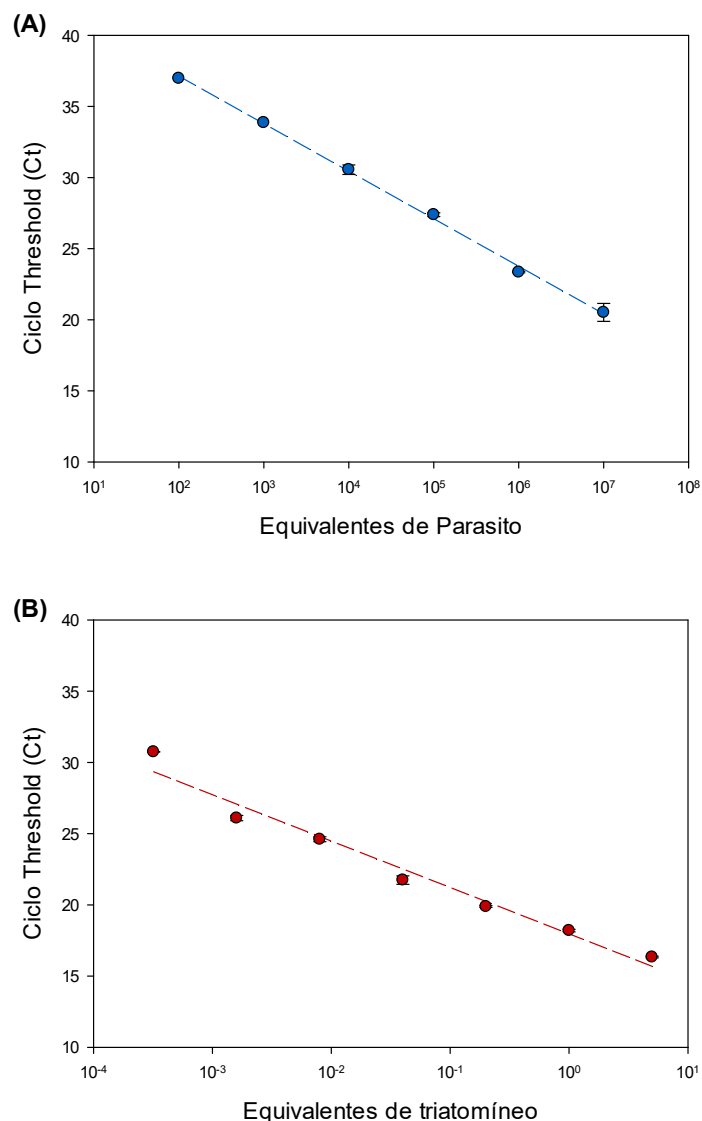


Figura 4-8. Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de *T. cruzi* viável em *R. prolixus*, por RT-qPCR *singleplex*. Para a construção da curva padrão de cada alvo foram feitas diluições seriadas de cDNA de **(A)** epimastigotas de *T. cruzi*, com uma linearidade variando de 10⁶ até 10 equivalentes de parasitos; e **(B)** de triatomíneo com uma linearidade variando de 3 até 0,003 equivalentes de triatomíneo.

Tabela 4.8. Parâmetros das curvas padrão para os alvos *T. cruzi* e triatomíneo.

Alvos	Parâmetros da equação da reta [1]		R ² [2]	Eficiência de Amplificação (%)
	<i>Slope</i>	<i>Intercept</i>		
A. TcGAPDH	-3,32	39,71	0,92	100,3
B. 12S rRNA Triatomíneo	-3,26	13,23	0,98	102,8

[1] Coeficiente de linearidade de $y = ax + b$, onde a é o *slope* (inclinação da reta) e b é o *intercept*; A regressão linear e a equação da reta foram calculadas pelo software Sigmaplot V12.0

[2] Coeficiente de determinação das curvas padrão.

Foram ensaiadas, também, duas curvas padrão independentes para a quantificação absoluta do DNA de *T. cruzi* e do DNA de intestino de triatomíneo

seguindo as concentrações de sondas e iniciadores definidas para a qPCR *multiplex* descrita por Moreira et al, 2017. 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 eficiências de 102,6% e 98,4% para a quantificação do parasito e do triatomíneo (**Figura 4.9, Tabela 4.9**). Sendo que as concentrações de DNA de *T. cruzi* variaram de 10^6 a 10^{-1} equivalentes de parasito (**Figura 4A**) e de triatomíneo foram de 3 até 0,0032 equivalentes de triatomíneo (**Figura 4B**).

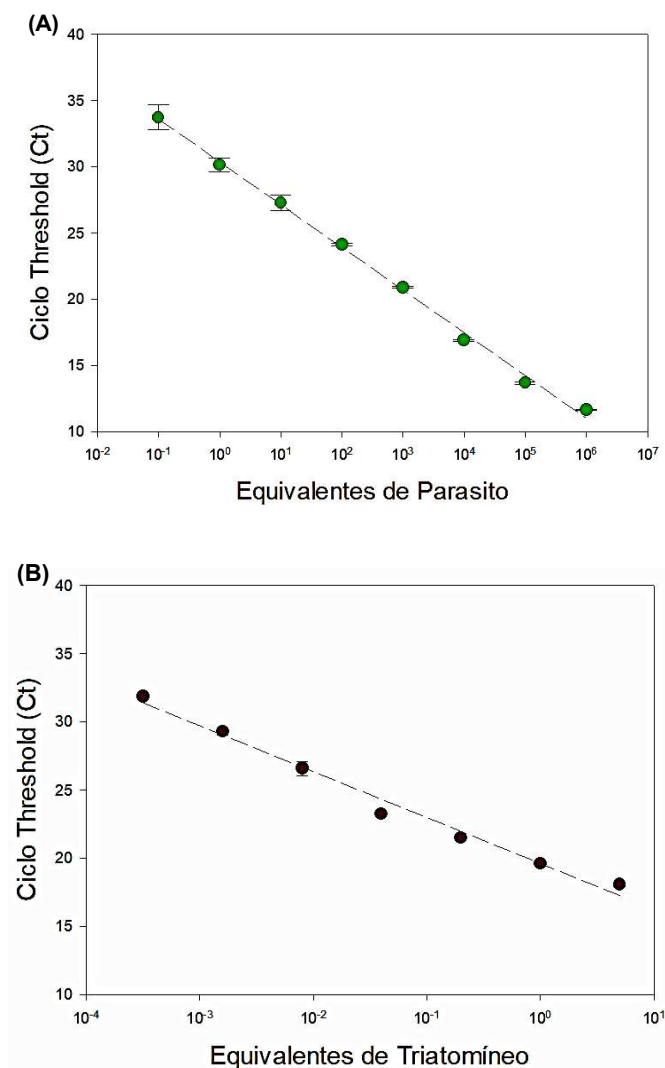


Figura 4-9. Extensão Dinâmica para detecção e quantificação de *T. cruzi* em *R. prolixus*, por qPCR *multiplex*. Para a construção da curva padrão de cada alvo foram feitas diluições seriadas de DNA de **(A)** epimastigotas de *T. cruzi*, com uma linearidade variando de 10^6 até 10^{-1} equivalentes de parasitos; e **(B)** de triatomíneo com uma linearidade variando de 3 até 0,003 equivalentes de triatomíneo.

Tabela 4.9. Parâmetros das curvas padrão para os alvos satDNA de *T. cruzi* e 12S rRNA triatomíneo.

Alvos	Parâmetros da equação da reta [1]		R ² [2]	Eficiência de Amplificação (%)
	<i>Slope</i>	<i>Intercept</i>		
A. SatDNA	-3,26	30,39	0,92	100,3
B. 12S rRNA Triatomíneo	-3,36	2,23	0,98	102,8

[1] Coeficiente de linearidade de $y = ax + b$, onde a é o *slope* (inclinação da reta) e b é o *intercept*; A regressão linear e a equação da reta foram calculadas pelo software Sigmaplot V12.0

[2] Coeficiente de determinação das curvas padrão.

Vale ressaltar que as curvas padrão foram incluídas em todos os ensaios quantitativos de DNA e cDNA, para calcular as frações de parasito obtidas a partir do lisado.

4.5 Monitoramento da infecção experimental de *T. cruzi* em *R. prolixus* após alimentação

Definidos os parâmetros para quantificação da carga parasitária, tanto por DNA quanto por RNA, foram avaliadas então, as cinéticas de infecção do *T. cruzi* em *R. prolixus*. Para determinar a quantidade de parasitos nas amostras de triatomíneos e para comparar as duas técnicas de quantificação, todo o trato digestivo destes insetos foi dissecado e analisado nos dias 5, 9, 15 e 29 após a alimentação. A carga parasitária do *T. cruzi* foi normalizada pela quantidade de DNA ou RNA do tubo digestivo de triatomíneo presente em cada amostra.

Ao compararmos os resultados de quantificação obtidos pelas duas técnicas moleculares, foi possível observar, na **figura 4.10**, uma diminuição na quantidade de parasitos ao longo dos dias após alimentação em ambos os casos. Todavia, a quantificação por mRNA, em verde, apresentou uma queda mais acentuada do parasito a partir do 9º dia após a alimentação ($1,22 \times 10^5$ equivalentes de parasito/triatomíneo) enquanto o DNA, em azul, não apresentou uma alteração significativa do dia 9 ($1,27 \times 10^5$ eq. parasito/triatomíneo) para o dia 15 ($5,31 \times 10^4$ eq. parasito/triatomíneo) após alimentação. Além disso, os valores da quantificação por detecção do RNA nos dias 15 e 29 ($1,43 \times 10^4$ eq. parasito/triatomíneo e $1,90 \times 10^4$ eq. parasito/triatomíneo, respectivamente) são menores que os valores observados na quantificação por detecção de DNA ($5,31 \times 10^4$ eq. parasito/triatomíneo e $2,13 \times 10^4$ eq. parasito/triatomíneo, respectivamente).

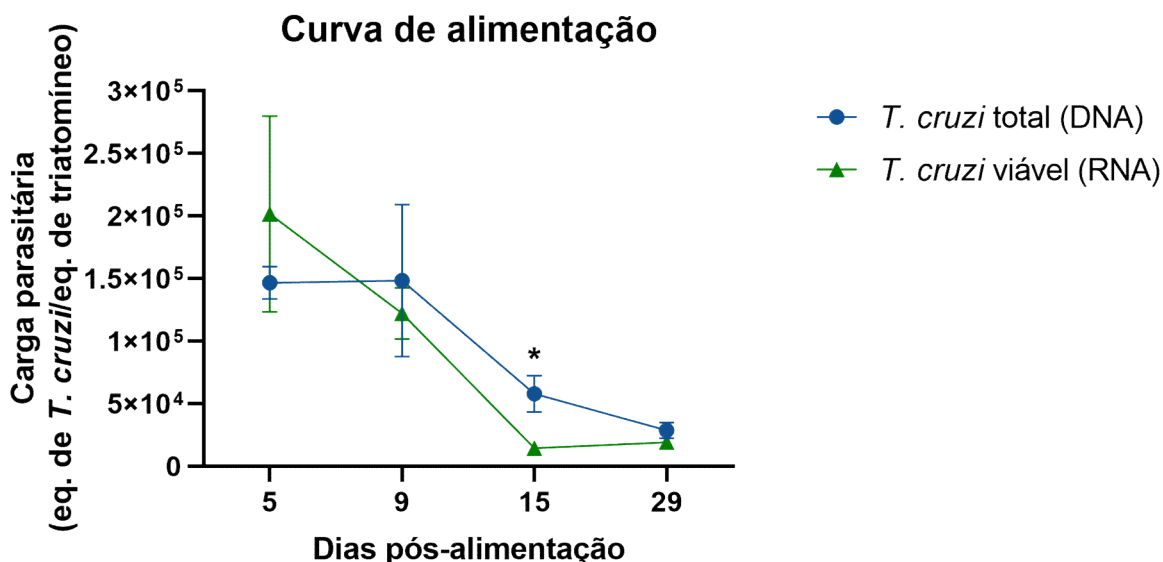


Figura 4-10. Comparação entre quantificação da carga parasitária por DNA e por RNA em amostras de triatomíneos infectados experimentalmente com *T. cruzi*. Dados de três alimentações com sangue de coelho contendo as formas epimastigotas do parasito (n = 3). Análise feita com um *pool* de 3 tubos digestivos inteiros de *R. prolixus* 5, 9, 15 e 29 dias após alimentação. *p<0,05

4.6 Análise da infecção de *T. cruzi* em diferentes porções do trato digestivo de *R. prolixus*

Após análise do desenvolvimento do *T. cruzi* em todo o trato digestivo do *R. prolixus*, foi feita então uma avaliação da dinâmica de infecção do parasito em diferentes segmentos do trato digestivo deste triatomíneo. Para tanto, um *pool* de 3 tubos digestivos de *R. prolixus* foi dissecado e separado em três porções distintas, Intestino Médio Anterior, Intestino Médio Posterior e Reto, que foram analisadas nos dias 5, 9, 15 e 29 após a alimentação. A quantificação da carga parasitária foi feita através da detecção do mRNA e foi normalizada pela quantidade de cDNA de triatomíneo presente em cada amostra.

Os resultados da quantificação do mRNA revelaram que o *T. cruzi* permanece, sem apresentar alterações significativas na sua quantidade, na porção posterior média do intestino desde o dia 5 ($5,26 \times 10^3$ eq. parasito/triatomíneo) até o dia 29 ($3,92 \times 10^3$ eq. parasito/triatomíneo) após alimentação. Em relação ao segmento do intestino médio anterior, há um aumento da carga parasitária do dia 5 ($1,03 \times 10^4$ eq. parasito/triatomíneo) para o dia 9 ($2,06 \times 10^4$ eq. parasito/triatomíneo), seguido de uma tendência de redução na quantidade de parasitos a partir do dia 15

($1,45 \times 10^3$ eq. parasito/triatomíneo). No entanto, essa redução na quantidade de parasitos no intestino médio anterior só se torna significativa no dia 29 ($1,28 \times 10^3$ eq. parasito/triatomíneo). Já na porção do Reto, um aumento estatisticamente significativo da carga parasitária é observado gradativamente do dia 5 ($5,64 \times 10^3$ eq. parasito/triatomíneo) para o dia 29 ($1,83 \times 10^5$ eq. parasito/triatomíneo) após alimentação (**Figura 4.11**). Concomitantemente ao aumento do número de parasitos no Reto ao longo dos dias, a população do Intestino Médio Anterior diminuiu significativamente do 5º ao 29º dia pós alimentação.

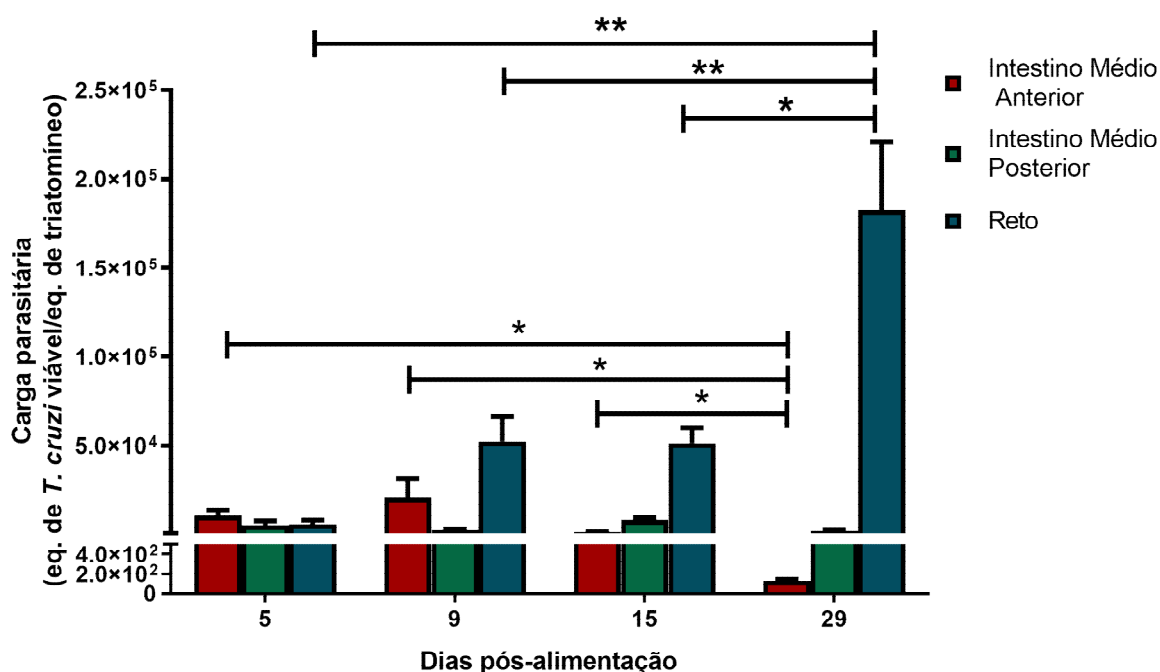


Figura 4-11. Quantificação da carga parasitária, por RT-qPCR, em diferentes porções do trato digestivo de *R. prolixus* infectados experimentalmente com *T. cruzi*. Dados de três alimentações com sangue de coelho contendo formas epimastigotas do parasito (n = 3). Análise feita com um *pool* de 3 intestinos médio anterior, um *pool* de 3 intestinos médio posterior e um *pool* de 3 retos de *R. prolixus*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.7 Comparação nas quantificações de parasitos totais, por qPCR, e de parasitos viáveis, por RTqPCR

Uma vez que o RNA foi escolhido como um potencial marcador molecular para avaliar a viabilidade do *T. cruzi*, nós analisamos e comparamos o tempo em que, tanto o DNA quanto o RNA de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c), podem ser detectados em meio LIT. Um grupo controle, contendo parasitos vivos, e um grupo

contendo parasitos lisados por fervura foram separados para a análise da durabilidade do DNA e do RNA ao longo do tempo.

Em relação à quantificação por qPCR (**Figura 4.12A**), observamos que enquanto o grupo controle apresenta um aumento gradual ao longo dos dias de incubação ($1,57 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 0; $2,35 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 1; $3,04 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 2; e $4,16 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 3), o grupo de parasitos lisados permanece com a detecção de DNA estável no mesmo período de tempo ($2,02 \times 10^4$ eq. parasito/mL; $2,00 \times 10^4$ eq. parasito/mL; $1,73 \times 10^4$ eq. parasito/mL; e $2,08 \times 10^4$ eq. parasito/mL). Ao mesmo tempo, a carga parasitária avaliada por RT-qPCR (**Figura 4.12B**) não demonstrou detecção de mRNA para o grupo lisado ao longo dos dias de incubação, enquanto o grupo controle mostrou um aumento do parasito durante o mesmo período de dias ($1,56 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 0; $2,25 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 1; $5,64 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 2; e $4,77 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 3). Além disso, a sobrevivência e viabilidade dos parasitos dos dois grupos também foi avaliada, até dez dias de incubação, através da contagem de parasito por câmara de Neubauer (**Figura 4.12C**) e comparada com a quantificação por qPCR e RT-qPCR. Os resultados da RT-qPCR concordaram com o exame microscópico, em que ambos foram negativos, em todos os dias de incubação, para o grupo lisado, diferentemente do que foi observado pela qPCR, onde foi possível detectar o DNA em todos os dias de incubação.

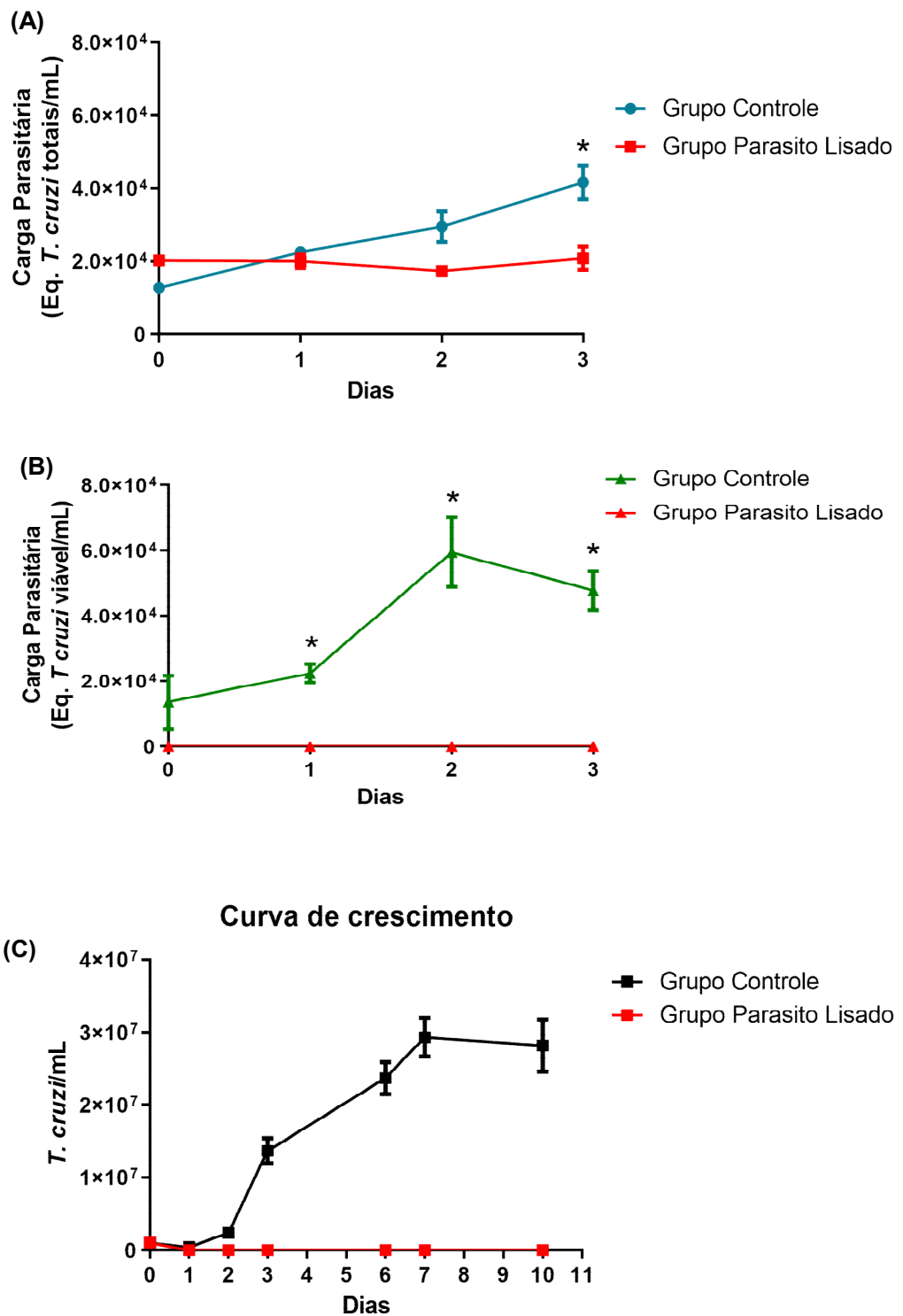


Figura 4-12. Comparação entre a detecção por DNA e por RNA de *T. cruzi* viáveis e não viáveis. Quantificação de parasitos vivos e lisados (A) por DNA; (B) por RNA (C) e através da contagem por microscopia, através da Câmara de Neubauer. Dados de três análises (triplicata). *p<0,05

4.8 Quantificação, por DNA e RNA, de *T. cruzi* viáveis e não viáveis em células H9C2 experimentalmente infectadas

Em seguida, analisamos a cinética da carga de parasitos viáveis (Grupo Controle) no interior de células H9C2 em diferentes pontos de tempo (dias 0, 1, 2, 3 e 4 após infecção) tanto por qPCR, quanto por RT-qPCR. Além disso, fizemos a quantificação, também, de H9C2 expostas experimentalmente a parasitos não viáveis (Grupo Parasito Lisado) para compararmos o tempo em que o DNA e o RNA eram detectados nessas amostras.

Como descrito no **item 3.5** da metodologia, as células H9C2 foram infectadas com tripomastigotas da cepa Dm28c, em um MOI de 10: 1 por 4 horas para permitir a interação parasita-célula, lavadas, e a taxa de infecção destas células foi analisada em 24 e 48 horas pós-infecção. A porcentagem de células infectadas apresentou aumento significativo pós-infecção ($23,35 \pm 5,34$ e $39,27 \pm 6,26$, respectivamente) na utilização do MOI de 10: 1 (**Figura 4.13A**). Ao contar o número de formas intracelulares de *T. cruzi* nas células infectadas, foi possível observar um aumento no número de amastigotas por célula ao longo dos dias analisados (**Figura 4.13B**). Já o índice endocítico (**Figura 4.13C**) mostrou valores aumentados usando um MOI de 10: 1 no dia 1 ($35,91 \pm 11,21$) e no dia 2 ($14,78 \pm 5,05$).

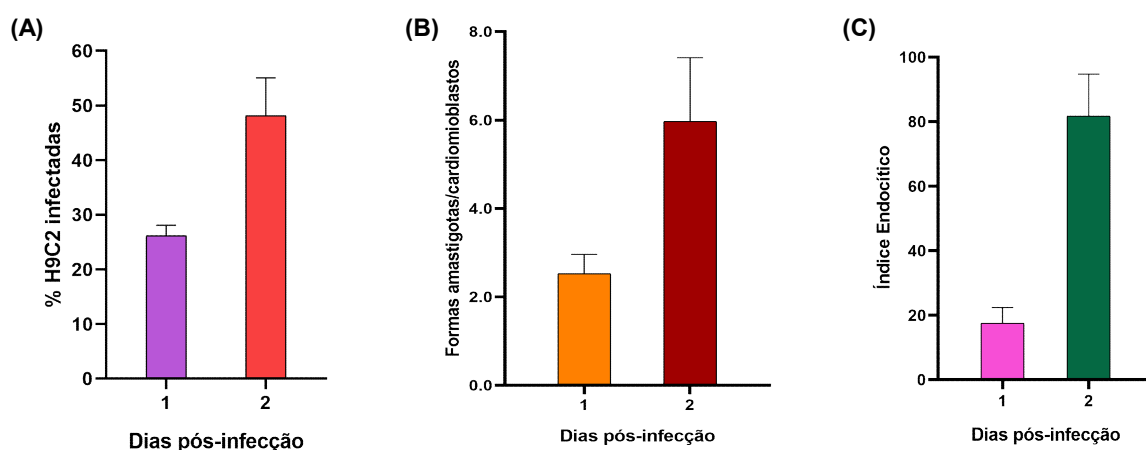


Figura 4-13. Padronização da infecção de células H9C2 utilizando MOI 10:1 de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Dm28c). (A) Porcentagem de cardiomioblastos infectados; (B) Taxa de formas intracelulares/cardiomioblastos; (C) Índice Endocítico.

Na quantificação por qPCR (**Figura 4.14A**), há uma tendência de aumento na quantidade de parasitos do grupo controle ($3,45 \times 10^4$ eq. par./mL no dia 0; e $2,28 \times 10^4$ eq. par./mL no dia 1; $1,47 \times 10^5$ eq. par./mL no dia 2; $2,42 \times 10^5$ eq. par./mL no dia 3), com a carga parasitária alcançando $3,23 \times 10^6$ eq. parasito/mL no dia 4 após infecção.

Em contrapartida, foi observada uma carga parasitária menor e cuja detecção permaneceu estável ao longo do mesmo período ($1,73 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 0; $5,97 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 1; $3,13 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 2; $2,58 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 3; e $1,98 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 4 após exposição ao parasito) no grupo de parasitos lisados. Devido ao aumento gradual da quantidade de parasitos do grupo controle, foi possível observar diferenças estatísticas nas cargas parasitárias entre os grupos controle e lisado após os dias 2, 3 e 4.

Avaliando a carga parasitária do grupo lisado por RT-qPCR (**Figura 4.14B**), foi possível detectar $2,05 \times 10^2$ eq. par./mL de mRNA de *T. cruzi* no dia 0 após exposição, diminuindo para 5,33 eq. par./mL no dia 1, e não sendo mais detectado mRNA de *T. cruzi* nos próximos pontos deste grupo. Já o grupo controle, tal qual foi observado por qPCR, demonstrou um aumento na quantidade de parasitos durante o mesmo período de dias após infecção ($3,14 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 0; $2,25 \times 10^4$ eq. parasito/mL no dia 1; $1,43 \times 10^5$ eq. parasito/mL no dia 2; $1,78 \times 10^5$ eq. parasito/mL no dia 3; e $3,22 \times 10^6$ eq. par./mL). Por conta da baixa quantidade de parasitos detectada no grupo de parasitos lisados nos primeiros dias, cuja detecção de mRNA não é mais observada a partir do dia 2 após exposição, e comparando com o aumento gradual observado no grupo controle, foram observadas diferenças estatísticas nas cargas parasitárias em todos os pontos analisados.

Finalmente, ao compararmos a quantificação por DNA e por RNA do grupo de parasito lisado, também observamos diferenças estatísticas em todos os pontos, já que o DNA do *T. cruzi* continua sendo detectado ao longo dos dias, enquanto o RNA é rapidamente degradado após a lise do parasito (**Figura 4.14C**).

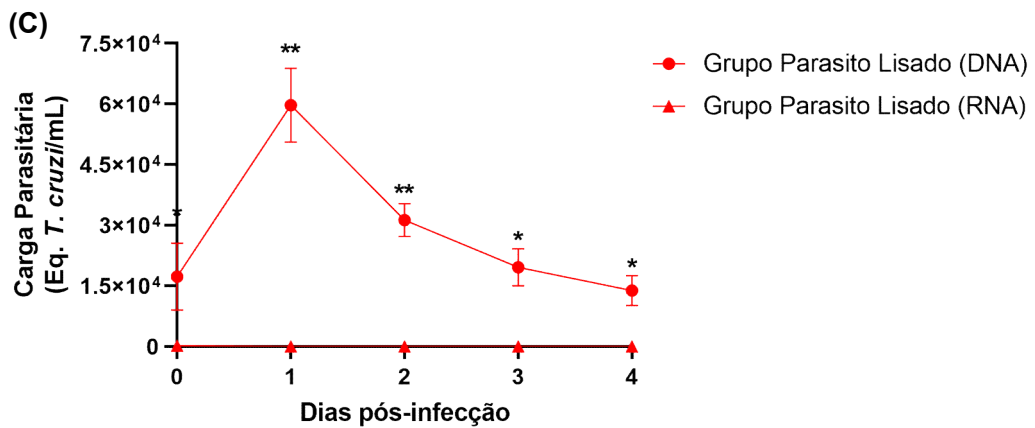
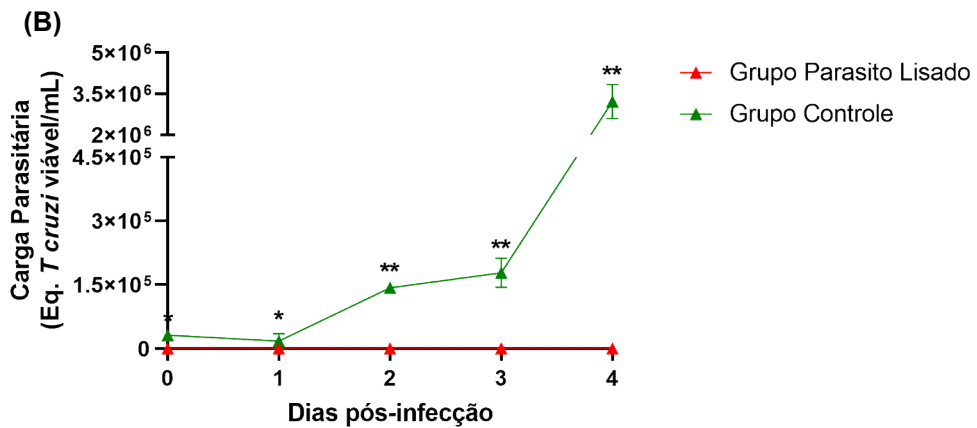
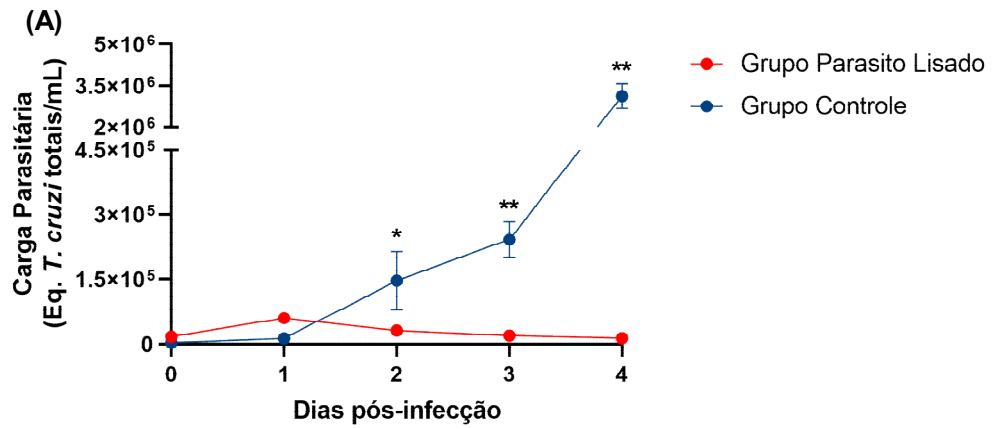


Figura 4-14. Quantificação da Carga Parasitária, por DNA e por RNA, nos dias 0, 1, 2, 3, 4 após infecção de células H9C2 infectadas experimentalmente com parasitos vivos e lisados. Quantificação de *T. cruzi* viáveis e não viáveis (A) por qPCR e (B) por RT-qPCR. (C) Comparação entre a quantificação por DNA e por RNA de parasitos lisados em amostras de H9C2. Dados de três análises (triplicata). * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$

4.9 Avaliação, através da qPCR e da RT-qPCR, do efeito do tratamento com Benznidazol em uma infecção experimental in vitro

Por fim, para comparar diferenças na quantificação da carga parasitária através da detecção do DNA e do RNA em células sob tratamento etiológico, cardiomioblastos H9C2 foram infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Dm28c) e submetidos a tratamento com Benznidazol (10 μ M) 24 horas depois. Através de ensaios de qPCR e RT-qPCR, a carga parasitária do grupo tratado com Bz foi, então, avaliada nos dias 2, 3, 4 e 5 após infecção. Fazendo uma análise em paralelo com o grupo controle (não tratado), a **Figura 4.15** nos mostra que, no geral, o benznidazol foi capaz de diminuir a carga parasitária nas células experimentalmente infectadas.

Pela qPCR (**Figura 4.15A**) foi possível observar que o grupo controle (não tratado) apresentou um aumento gradual na quantidade de parasitos (5×10^4 eq. par./mL no dia 0; $3,65 \times 10^4$ eq. par./mL no dia 2; $1,39 \times 10^5$ eq. par./mL no dia 3; $2,25 \times 10^5$ eq. par./mL no dia 4; e $7,03 \times 10^5$ eq. par./mL no dia 5) enquanto o grupo tratado com Bz teve uma carga parasitária significativamente menor, especialmente nos pontos 3, 4 e 5 dpi, e com uma tendência à diminuição na detecção de DNA ao longo dos dias ($7,99 \times 10^4$ eq. par./mL no dia 2; $3,93 \times 10^4$ eq. par./mL no dia 3; $2,49 \times 10^4$ eq. par./mL no dia 4; e $2,11 \times 10^4$ eq. par./mL no dia 5 após infecção). Em contrapartida com os resultados da RT-qPCR no grupo tratado com Bz, a **Figura 4.15B** mostra que, embora a detecção do mRNA do *T. cruzi* no grupo controle acompanhe esta queda inicial na quantidade de tripomastigotas (de 5×10^4 eq. par./mL no dia 0 para $3,18 \times 10^3$ eq. par./mL no dia 2), ela é seguida de um aumento gradual nos dias subsequentes ($3,59 \times 10^3$ eq. par./mL no dia 3; $1,80 \times 10^4$ eq. par./mL no dia 4; e $2,54 \times 10^4$ eq. par./mL no dia 5). Quanto ao grupo tratado, há uma redução na quantidade de parasitos (5×10^4 eq. par./mL no dia 0; $1,68 \times 10^2$ eq. par./mL no dia 2; e $3,91 \times 10^1$ eq. par./mL), até o mRNA do *T. cruzi* não ser mais detectado nos pontos 4 e 5 dpi. A **Figura 4.15C** mostra diferenças nas quantificações por DNA e por mRNA do grupo tratado com Bz, e já no dia 2 pós infecção há diferença estatística entre as metodologias, pois enquanto a detecção do DNA ocorre em todos os dias, o RNA é rapidamente degradado.

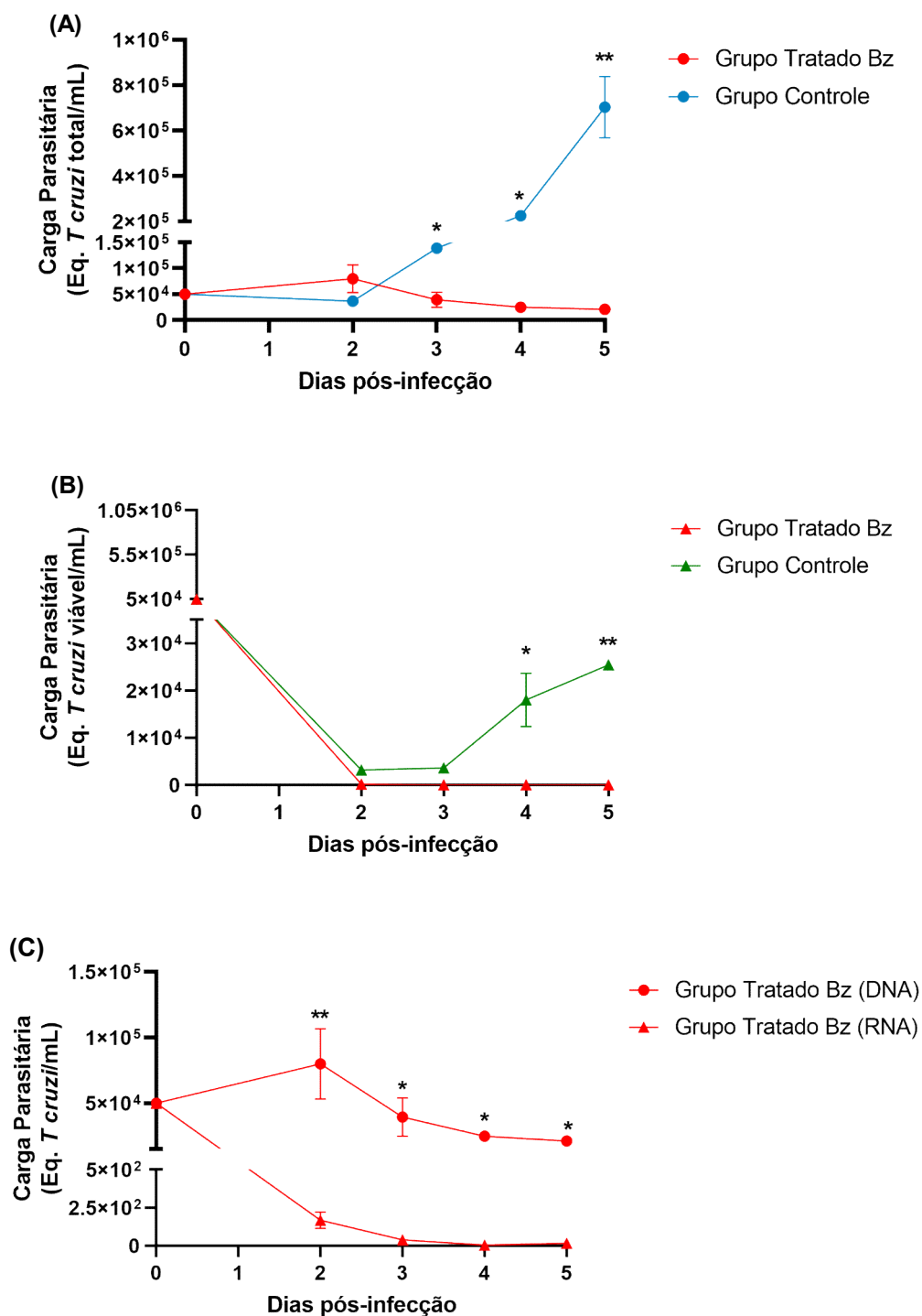


Figura 4-15. Quantificação da Carga Parasitária, por DNA e por RNA, nos dias 2, 3, 4 e 5 após infecção de células H9C2 infectadas experimentalmente com parasitos vivos e tratadas com 10 μ M de Benznidazol. Quantificação dos grupos controle e sob tratamento com Bz, (A) por qPCR e (B) por RT-qPCR. (C) Comparação entre a quantificação por DNA e por RNA em amostras de H9C2 do grupo tratado com Bz. Dados de três análises (triplicata). *p<0,05; **p≤0,01.

5 DISCUSSÃO

Mesmo com a diminuição significativa na incidência de novos casos observados na década de 90 em países latino-americanos (Silveira & Vinhaes, 1999; Dias, 2009; Coura & Viñas, 2010; Hashimoto & Schofield, 2012), a transmissão vetorial ainda oferece um risco para a saúde humana, uma vez que o *T. cruzi* circula entre outras espécies de triatomíneos e diversos mamíferos em ambientes silvestres em que há atividade humana (Dias, 2009; Gontijo et al., 2009; Hashimoto & Schofield, 2012; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). Além disso, vários surtos de infecção por via oral, geralmente devido à presença de vetores e reservatórios infectados pelo parasito nas proximidades, têm sido registrados (Steindel et al., 2008; Nóbrega et al., 2009).

A transmissão do *T. cruzi* por via oral não é um evento recente, representando uma via de contaminação importante entre vetores e animais além de ser um dos principais mecanismos de dispersão do parasita entre os mamíferos (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Jansen et al., 2015). Apesar disso, somente a partir de 2004 os surtos alimentares da doença de Chagas se tornaram um evento mais frequentemente discutido e investigado (Ferreira et al., 2016b). Relatada originalmente de forma esporádica, a doença de Chagas adquirida por via oral parece estar aumentando entre as populações em vários estados brasileiros (Yoshida et al., 2011; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012) bem como em outros países endêmicos da América Latina (De Noya et al., 2010; Blanchet et al., 2014; Franco-Paredes et al., 2020).

Em relação aos alimentos potencialmente envolvidos na transmissão oral do *T. cruzi* no Brasil, o açaí, que é macerado para a produção de uma pasta ou bebida, tem sido identificado como a fruta mais frequentemente envolvida nos casos de doença de Chagas Aguda Oral (Nóbrega et al., 2009; Passos et al., 2012; Ferreira et al., 2016b). E, mesmo que o açaí industrializado e exportado precise ser pasteurizado, a maior parte do açaí consumido pela população dos países latino-americanos muitas vezes não é tratada ou devidamente higienizada (Nóbrega et al., 2009; de Oliveira et al., 2019). Para tanto, é necessário avaliar a qualidade dos produtos de açaí que são vendidos e consumidos pela população. Alguns estudos, que permitem a identificação molecular do parasita em diferentes fontes alimentares, já estão sendo desenvolvidos e publicados (Ferreira et al., 2016b, 2018; de Souza Godoi et al., 2017; Mattos et al., 2017; de Oliveira et al., 2019; Cardoso et al., 2020;

Costa et al., 2021). Porém, não existe um método oficial regulamentado para a detecção molecular do *T. cruzi* em polpa de açaí. Assim, o desenvolvimento de uma metodologia molecular integrada, simples e reproduzível faz-se necessário para suprir essa demanda de controle de qualidade exigida pelo mercado local e global de segurança alimentar (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde (ANVISA-MS), 2008; Dias et al., 2016; Ferreira et al., 2016b).

Ensaio baseados em PCR e qPCR têm sido desenvolvidos nos últimos anos para a rápida detecção e quantificação do DNA do *T. cruzi* em diferentes amostras biológicas (Moser et al., 1989; Britto et al., 1995; Cummings & Tarleton, 2003; Dias et al., 2015; de Souza Godoi et al., 2017; Ferreira et al., 2018) e para genotipagem do parasito a fim de monitorar a diversidade na distribuição de DTUs do *T. cruzi* em diferentes regiões endêmicas (Britto et al., 2001; Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003; Britto, 2009; Zingales et al., 2012). Ademais, ensaios moleculares para o diagnóstico da doença de Chagas foram amplamente estabelecidos para determinar o estado da infecção e monitorar, com precisão, a carga parasitária em diversos tipos de amostras (Schijman, 2018)

No entanto, para ensaios diagnósticos com base em métodos moleculares, é necessária a obtenção de um DNA puro e em altas concentrações a partir da amostra biológica. Em outras palavras, para obtenção do DNA nas condições almeçadas, verifica-se a necessidade emergente de uma padronização de protocolos para extração e purificação do DNA, adaptada à amostra que está sendo analisada. Um dos maiores desafios para a extração de DNA de parasitas em uma matriz tão complexa, como é o caso de alimentos ou de insetos, está na presença de inibidores que podem ser co-purificados com o DNA durante a etapa de extração e podem reduzir a eficiência da PCR (Bergallo et al., 2006; Neves, 2010). Além disso, o emprego de um método de diagnóstico que apresente resultados satisfatórios e com boa reprodutibilidade é de extrema relevância, facilitando investigações epidemiológicas da doença de Chagas em diferentes localidades, bem como no controle de qualidade de alimentos envolvidos em surtos orais, especialmente os produtos à base de açaí, por diferentes laboratórios de análise.

Para tanto, a primeira etapa deste trabalho foi verificar se a metodologia escolhida para extração de DNA em amostras de açaí contaminadas foi eficiente para extrair um DNA genômico de alta qualidade de *T. cruzi*. O açaí é uma fruta composta por uma porção significativa de lipídios, proteínas, carboidratos, fibras alimentares solúveis e não solúveis, ácidos graxos, uma variedade de minerais e

alto teor de compostos antioxidantes, como antocianinas, e compostos fenólicos (Bichara & Rogez, 2011; Yamaguchi et al., 2015). Atualmente, existem vários métodos disponíveis para extração de DNA de diferentes tipos de amostras e eles podem ser baseados em kits comerciais ou métodos *in-house*. Porém, apesar de terem baixo custo e oferecerem uma alta concentração de DNA, os métodos *in-house*, como o fenol-clorofórmio e o CTAB, costumam ser trabalhosos, não sendo adequados para avaliar amostras em grande escala, justamente por não serem protocolos facilmente reproduzidos, simples e rápidos.

Em relação à extração de DNA por kit comercial, Mattos e cols. (2017) selecionaram dois kits de extração diferentes, sendo um deles específico para uso em amostras de fezes. Em seguida, observaram que o kit para fezes permitiu a retirada dos inibidores, enquanto os demais kits comerciais não apresentaram o mesmo desempenho para as amostras de açaí contaminadas experimentalmente. Ou seja, mesmo que muitos kits comerciais estejam disponíveis para extrair DNA de diferentes matrizes, apenas um número limitado pode ser usado para purificação de DNA de produtos alimentícios processados, o que pode encarecer esses kits. Particularmente, o *High Pure PCR Template Preparation Kit* (ROCHE), que não é um kit voltado para um tipo específico de amostra, contém um tampão que permite remover resíduos de inibidores (*Inhibitor Removal Buffer*) que poderiam ter permanecido nas amostras de açaí.

Com o intuito de melhorar a sensibilidade da metodologia e permitir a melhor estabilização e preservação das amostras, padronizamos a utilização de Guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M (pH 8,0) em amostras de açaí. A Guanidina-HCl é um sal caotrópico comumente usado para isolamento de ácidos nucleicos de extratos celulares que pode romper células, além de inibir as nucleases. Assim, este reagente facilita a preservação de ácidos nucleicos em fluidos biológicos (Bowtell, 1987; Avila et al., 1991) e o transporte da amostra do campo para o laboratório. Vários estudos relacionados ao diagnóstico molecular do *T. cruzi* em amostras de sangue já incorporaram essa etapa à metodologia, devido à sua importância como tampão estabilizador da amostra (Britto et al., 1993; Moreira et al., 2013; Rodrigues-Santos et al., 2018).

A utilização de controles positivos e negativos em qPCR é essencial para garantir a confiabilidade da reação, evitando resultados falso-positivos ou falso-negativos. No entanto, especialmente em ensaios de qPCR, também é necessário incluir um controle de amplificação interno, principalmente para monitorar a

reprodutibilidade da extração de DNA. Para o diagnóstico molecular da doença de Chagas, um alvo no DNA do hospedeiro, como a RNase P, ou um DNA exógeno, são geralmente usados como controle interno da amplificação (Moreira et al., 2013; Ramírez et al., 2015; Ferreira et al., 2018). Em 2018, Ferreira et al., empregou, em uma PCR convencional, um par de *primers* específico (Mbongolo-Mbella et al., 2011), que codifica o gene da ribulose 1,5-difosfato carboxilase/oxigenase (*rbcL*) do cloroplasto de planta para avaliar a amplificação do DNA do açaí. Porém, até o momento, apenas um estudo publicado sobre diagnóstico molecular do *T. cruzi* em alimentos, por meio de qPCR, incluiu um controle de amplificação interno específico para plantas (Costa et al., 2021) que codifica um gene de cópia única no açaí e em cana de açúcar, o apocitocromo b (*Cob 2*). Em nosso estudo, que já foi publicado (Finamore-Araujo et al., 2021), usamos um DNA sintético para monitorar a eficiência da extração de DNA e a ausência de inibidores na qPCR. A reprodutibilidade da reação foi confirmada uma vez que não houve variação nos valores de Exo-IPC, independentemente da concentração de *T. cruzi* nas amostras.

Na maioria dos surtos orais, a presença do *T. cruzi* é, normalmente, detectada por métodos tradicionais, como isolamento do parasita e investigação microscópica. E, embora essa prática apresente resultados com alta especificidade, o exame microscópico é um método trabalhoso, demorado e de baixa sensibilidade, sendo minimamente eficaz quando existem poucos microrganismos em uma amostra (Barbosa et al., 2012; Passos et al., 2012). Além disso, Barbosa et al. (2012) descreveu a não visualização, por microscopia de luz, dos parasitas diretamente da polpa de açaí. Ou seja, a cor escura característica da fruta, que está associada a altas concentrações de antocianinas e uma grande quantidade de matéria orgânica (Bichara & Rogez, 2011), limita muito a possibilidade de detecção de parasitas durante a visualização microscópica. Por esse motivo, o desenvolvimento de um ensaio molecular altamente sensível pode oferecer vantagens significativas, como a rápida identificação e quantificação do *T. cruzi*. A qPCR desenvolvida no presente estudo apresentou alta sensibilidade e linearidade, o que também foi observado e comparado com estudos anteriores, citados na **Tabela 5.1**.

Tabela 5.1. Comparação entre diferentes metodologias já publicadas para detecção molecular de *T. cruzi* em amostras de açaí

Publicação	Centrifugação pré-extração DNA	Técnica de Extração de DNA	Controle Interno Exógeno	Técnica de detecção molecular	Eficiência da qPCR	Validação com amostras de campo
Ferreira et al., 2016	Não	Kit Comercial: DNAzol (Invitrogen); NucleoSpin® Food Kit (Machery-Nagel) Método In-house: CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)	Não	PCR convencional Tc189Fw2/Tc189Rv3	-	Não
Godoi et al., 2017	Tripla centrifugação	Kit Comercial: - Método In house: Fenol-clorofórmio	Não	qPCR <i>singleplex SYBR Green</i> TCZ1/TCZ2; Ep1F/Ep1R; Bp1F/Bp1R	TCZ1/TCZ2: 80.82% Ep1F/Ep1R: 85.48%	Não
Mattos et al., 2017	Sim	Kit Comercial: QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen); QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) Método In-house: -	Não	qPCR <i>TaqMan Singleplex</i> Cruzi 32/148; sonda 71 (FAM-NFQ)	Cruzi32/148: 91.25%	Não
De Oliveira et al., 2019	Tripla centrifugação	Kit Comercial: - Método In house: Fenol-clorofórmio	Não	PCR convencional TCZ1/TCZ2	-	Não
Ferreira et al., 2018	Não	Kit Comercial: - Método In-House: CTAB	<i>rbcL</i> (plant chloroplast gene)	PCR convencional Tc189Fw2/Tc189Rv3	-	Sim. Validação qualitativa
Cardoso et al., 2020	Não	Kit Comercial: Illustra Tissue & Cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) Método In-house: -	Não	qPCR <i>Singleplex SYBR Green</i> TCZ3/TCZ4	TCZ3/TCZ4: 103.98%	Não

Para avaliar o desempenho da qPCR *multiplex*, com alvo no satDNA do *T. cruzi*, observamos a detecção, em todas as concentrações, das seis DTUs do *T. cruzi* no ensaio de inclusividade. Apesar deste resultado, também pudemos observar que a DTU I (Dm28c) apresentou valores de Ct mais altos em comparação com os CTs observados pelas demais DTUs. Este resultado corresponde a observações anteriores de que a DTU I apresenta um menor número de cópias para o DNA nuclear satélite (Duffy et al., 2009). Em relação ao ensaio de exclusividade, foi possível observar que não houve amplificação cruzada do DNA de outras espécies de tripanossomatídeos em nenhuma das concentrações testadas, com exceção do DNA de *T. rangeli*. As diferentes concentrações de DNA de *T. rangeli*, foram positivas na qPCR, confirmando a amplificação cruzada observada anteriormente de *T. rangeli* para este alvo (Duffy et al., 2013; Ramírez et al., 2015). Entretanto, ao contrário do que foi mostrado previamente, a qPCR com alvo em satDNA apresentou a mesma sensibilidade para a detecção de *T. cruzi* e *T. rangeli*.

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). Porém, ao contrário da infecção aguda desencadeada pelo *T. cruzi*, o *T. rangeli* não é considerado um patógeno de importância médica, pois não causa nenhuma sintomatologia em humanos. No entanto, a diferenciação no diagnóstico entre estas 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). Portanto, novos alvos moleculares precisam ser investigados a fim de aumentar a especificidade na quantificação da carga do parasita *T. cruzi*, especialmente em amostras de açaí.

Em relação à análise de amostras comerciais de açaí, este trabalho é, até o momento, o primeiro que avaliou, por meio de metodologia baseada em qPCR, amostras coletadas em pontos de venda de uma área endêmica. A triagem dessas 45 amostras de GEA comprovou que a qPCR é mais sensível que o exame microscópico. O método molecular revelou uma positividade de 20% (9/45) nos GEA examinados, enquanto as mesmas amostras foram todas negativas para *T. cruzi* por observação direta ao microscópio óptico. No estudo com PCR convencional de Ferreira et al. (2018), foram analisadas as taxas de contaminação e caracterização

molecular do *T. cruzi* em amostras de alimentos comercializados nos estados do Rio de Janeiro e Pará. O conjunto de *primers* selecionado neste estudo apresentou alta especificidade, sem amplificação para o DNA genômico de *T. rangeli* e outros tripanossomatídeos. Em contrapartida, o alvo escolhido apresentou uma menor sensibilidade na detecção do *T. cruzi*. Curiosamente, das 140 amostras de produtos à base de açaí que analisaram, 14 amostras (10%) foram positivas para DNA de *T. cruzi* sendo que, em uma dessas amostras também foi detectado DNA de triatomíneo. Freitas e cols. (2015) também encontrou fragmentos de insetos em amostras de açaí e esses importantes achados podem reforçar a associação entre o açaí e a presença de vetores ou mamíferos infectados próximos aos locais do surto (Freitas et al., 2015).

Em relação ao método clássico para avaliar a infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos, tem-se o exame microscópico do conteúdo intestinal dissecado. No entanto, como citado anteriormente, este é um procedimento com limitações e que pode apresentar dificuldades no exame de todos os estágios evolutivos do inseto (Pizarro et al. 2007; Moreira et al. 2017), podendo gerar resultados inconclusivos e discordantes. Porém, as taxas de infecção destes triatomíneos podem estar sendo subestimadas através do diagnóstico molecular devido a produtos derivados do trato digestivo que podem afetar a eficiência inibir a reação de qPCR (Schradler et al., 2012; Dias et al., 2015; Moreira et al., 2017). Dentre os inibidores do trato digestivo de triatomíneos 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 (Andersen et al., 1995). Com base nestas informações, nós buscamos avaliar o desempenho de três protocolos de kits comerciais para a extração de DNA de triatomíneos e selecionar o método de extração mais eficiente para extrair o DNA genômico do *T. cruzi* em amostras de intestino de triatomíneo. Neste trabalho, nós trabalhamos escolhemos insetos *R. prolixus* como modelo de estudo, por ser uma espécie de triatomíneo que se adapta facilmente a alimentação artificial do laboratório, além de terem diversos trabalhos relacionados à sua fisiologia e o genoma inteiramente sequenciado (Azambuja & Garcia, 2004, Garcia et al., 2007; Castro et al., 2012; Mesquita et al., 2015)..

Para a escolha do kit de extração que melhor se adequaria aos nossos ensaios, de acordo com parâmetros como praticidade da técnica, reprodutibilidade, concentração e grau de pureza do DNA obtido, testamos três kits comerciais, QIAGEN, Roche e Macherey-Nagel, que utilizam colunas de sílica para isolamento de ácidos nucléicos. Embora os três métodos escolhidos para teste tenham estratégias de extração semelhantes, no qual a molécula de DNA se liga por afinidade na membrana de sílica, os protocolos de cada fabricante possuem algumas diferenças em determinadas etapas que podem melhorar a eficiência do procedimento.

A etapa de lise celular é considerada crítica devido a presença de estruturas que podem interferir no processo de extração. Enquanto o kit Macherey-Nagel utiliza uma pré-etapa de homogeneização com *beads* para romper mecanicamente o trato digestivo dos triatomíneos, o que acelera o processo de extração, os kits de extração da QIAGEN e da ROCHE empregam uma etapa de digestão enzimática com proteinase K, no qual as amostras são incubadas a 56°C por, pelo menos, 1 hora antes de começar o processo de extração nas colunas de sílica. No presente estudo, e devido à quantidade de inibidores presentes no conteúdo intestinal do triatomíneo, optamos por manter as amostras de intestino incubadas a 56°C por 2 horas com proteinase K. Além disso, um problema em relação às membranas de sílica é a obstrução da coluna devido à viscosidade do material utilizado ou excesso de massa, especialmente no caso do *pool* de intestinos. Algumas amostras de *pool* processadas pelos kits da ROCHE e da QIAGEN, que utilizam de estratégias de lise similares no protocolo de extração, apresentaram entupimento da coluna, necessitando de uma etapa extra de centrifugação para que o material passasse pela coluna até o tubo coletor. No caso das amostras extraídas pelo protocolo da QIAGEN, em especial, a maioria das amostras contendo um *pool* de intestinos apresentou este problema na etapa de centrifugação após transferência para a coluna, bem como algumas amostras do grupo de um intestino. Com o método de lise empregado pelo kit Macherey-Nagel não houve entupimento da coluna para nenhuma das amostras e, por conseguinte, não foi necessário incluir uma etapa extra de centrifugação no protocolo.

No que diz respeito à remoção dos contaminantes, que é feita adicionando tampões de lavagem nas colunas, o kit Macherey-Nagel foi o que apresentou o menor número de lavagens com tampões, enquanto QIAGEN e ROCHE possuíam mais de uma etapa com diferentes tampões de lavagem. Adicionalmente, o kit da

ROCHE ainda possui uma etapa extra que inclui lavar a coluna com o tampão removedor de inibidores (*Inhibitor Removal Buffer*). Além dos parâmetros citados anteriormente, outros indicadores também devem ser considerados, como protocolos com menor número de etapas e de execução (Grutzmacher et al., 2002; Webster et al., 2003), uma vez que quanto menos se manipular o material, menor a chance de contaminação da amostra (Neves, 2010). No final, o Macherey-Nagel foi o protocolo com mais praticidade e rapidez no processo de extração de intestinos de triatomíneo por coluna de sílica, mas selecionamos para seguir com os experimentos de diagnóstico molecular o kit que utilizamos para extração de GEA, o *High Pure PCR Template Preparation Kit* (ROCHE), pois, além de ser mais barato, foi o protocolo que apresentou os melhores resultados de reprodutibilidade, concentração e grau de pureza do DNA obtido.

Para monitorar a carga parasitária de triatomíneos infectados por *T. cruzi*, a inclusão de um controle interno de amplificação é importante, também, pois são amostras que estão sujeitas às variações de tamanho entre espécies, estágio de desenvolvimento e quantidade, devido ao tempo pós-alimentação do inseto (Moreira et al., 2017). Para corrigir as variações citadas anteriormente, e certificar a qualidade das amostras de DNA extraídas a partir dos triatomíneos, nós utilizamos o gene 12S do RNA ribossomal do inseto (Uehara et al., 2012) como controle interno da reação e simultaneamente como normalizador da carga parasitária (Moreira et al., 2017). Nogueira e colaboradores (2015) também utilizaram como normalizador da PCR em tempo real, o DNA do triatomíneo, empregando iniciadores com alvo para um gene de proteína transmembrana em *R. prolixus*, que codifica uma proteína semelhante a aquaporina (Nogueira et al., 2015). Já Dias e colaboradores (2015) usaram como normalizador da carga parasitária um DNA de plasmídeo contendo uma sequência heteróloga (pLew82), adicionada antes de cada extração de DNA, para monitorar a quantidade de parasito no intestino de *R. prolixus*.

A cinética da colonização do *T. cruzi* no trato digestivo de triatomíneos depende de diversos parâmetros como a espécie do inseto vetor, a natureza da microbiota do intestino, e fatores antimicrobianos (Azambuja et al., 2004; Garcia et al., 2007; Schaub, 2009). Ademais, a cepa de parasito pode contribuir para a susceptibilidade do vetor, visto que cepas diferentes de *T. cruzi* mantêm níveis distintos de infecção no triatomíneo (Mello et al., 1996; Araújo et al., 2007, 2014; Garcia et al., 2007), bem como ativam diferentes perfis de resposta imune no inseto (Vieira et al., 2016). Sobre a cinética de infecção de diferentes cepas de *T. cruzi* em

R. prolixus percebe-se algumas diferenças no perfil de infecção entre algumas DTUs através da quantificação da carga parasitária destes grupos. Para uma infecção bem-sucedida no triatomíneo, o *T. cruzi* precisa se diferenciar em epimastigotas e se multiplicar ao alcançarem a porção do intestino médio anterior (Kollien & Schaub, 2000). Nossa análise da infecção pela DTU II, especialmente, pode nos indicar que, apesar da cepa Y conseguir estabelecer uma infecção no *R. prolixus*, o parasito não é capaz de se multiplicar, como as outras cepas, ao longo do trato digestivo desta espécie de triatomíneo. Nossos dados corroboram com estudos prévios sobre a interação parasito com a microbiota durante uma infecção em insetos da espécie *R. prolixus*, que demonstraram que a população de cepa Y do (DTU II) rapidamente é reduzida, enquanto a Dm 28c (DTU I) consegue se estabelecer no intestino de *R. prolixus* (Azambuja et al., 2004; Castro et al., 2012; Vieira et al., 2016). Para este trabalho, nós analisamos a cinética de infecção de *R. prolixus* por diferentes cepas de *T. cruzi*, correspondentes às seis DTUs (TcI-TcVI). Entretanto, é importante ressaltar que, para uma análise mais completa, mais ensaios sobre a cinética de infecção com outras espécies de vetores precisam ser feitos, principalmente com espécies de triatomíneos autóctones.

Embora os métodos de amplificação de DNA tenham sido amplamente relatados para diversas amostras (Schijman, 2018), não se está claramente elucidado se a detecção do DNA do parasito corresponde, necessariamente, à parasitos vivos na amostra analisada. Esta questão está especialmente relacionada à alta estabilidade da molécula de DNA e sua persistência após a morte do parasita (Souto & Zingales, 1993; Romero et al., 2010; Cancino-Faure et al., 2016; Norouzi et al., 2016). No geral, métodos moleculares alternativos usando o RNA do patógeno visando discriminar entre parasitas vivos ou mortos já foram publicados anteriormente (Van Der Meide et al., 2005, 2008; Romero et al., 2010; Payne et al., 2012; Norouzi et al., 2016). Van der Meide e colaboradores (2008) relataram uma ferramenta altamente sensível, baseada na amplificação quantitativa da sequência de ácido nucleico (QT-NASBA), capaz de detectar parasitas viáveis de *Leishmania*. O QT-NASBA detecta o RNA do parasita ao invés do DNA e já foi utilizado para avaliar a viabilidade de outros patógenos (Schoone et al., 2000; Schallig et al., 2003). No entanto, até o momento, são poucos os relatos comparando a aplicação de ferramentas de diagnóstico molecular que efetivamente diferenciem entre parasitas viáveis e não viáveis, especialmente quando se trata do diagnóstico de *T. cruzi*. Com base nisso, padronizamos uma PCR em Tempo real com Transcrição

Reversa (RT-qPCR), utilizando o RNA de *T. cruzi* como marcador de viabilidade celular para comparar a quantidade de parasitos em triatomíneos e células H9C2 (cardiomioblastos) experimentalmente infectadas. A capacidade da reação de RT-qPCR em quantificar parasitos viáveis, através da detecção do mRNA, foi avaliada em comparação com a reação de qPCR, previamente desenvolvida por Moreira et al. (2017), para quantificação do DNA genômico de triatomíneos infectados com *T. cruzi*.

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 a expressão constitutiva do gene GAPDH entre diferentes isolados do *T. cruzi* e entre seus diferentes estágios evolutivos. Com isso, avaliamos o desempenho analítico da RT-qPCR para a quantificação de parasitos viáveis em triatomíneos, usando os iniciadores para o gene GAPDH de *T. cruzi*, e, como normalizador e controle interno da reação, o conjunto de iniciadores 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, e a temperatura de dissociação para o GAPDH foi concordante com a publicada por Silva-Gomes (2014).

Conforme relatado em estudos publicados anteriormente (Pizarro et al., 2007; Dias et al., 2015), observamos que tanto a RT-qPCR como a qPCR nos permitiu determinar um número de parasitos em escalas muito abaixo do que se obtém usando a Câmara de Neubauer ($<10^2$ equivalentes de parasitas/inseto), que só conseguiria contar insetos com cargas parasitárias iguais ou acima de 10^4 parasitas/mL. Experimentos com amostras reconstituídas de sangue contaminado com *T. cruzi* mostraram que uma análise através de PCR convencional é capaz de detectar o equivalente à 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 1 eq. par. Com a aplicação da técnica.

Nossos dados sobre a cinética do *T. cruzi* (Dm28c) em *R. prolixus*, mostraram que, apesar de diferenças significativas na carga parasitária entre as metodologias de quantificação por DNA e por RNA, ambas as curvas de infecção 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.

Para verificar se redução na quantidade de parasitos ocorre por conta da migração do parasito pelo intestino do triatomíneo, nós quantificamos o mRNA do *T. cruzi* em diferentes porções do trato digestivo de *R. prolixus*. Sendo assim, foi possível observar uma diminuição na quantidade de parasitos no intestino médio anterior ao longo dos dias após infecção e, opostamente, um aumento no intestino médio posterior. Estes resultados concordam com trabalhos anteriores que avaliaram a carga do parasita em triatomíneos infectados experimentalmente por meio de bioluminescência ou ensaios baseados na detecção do DNA (Henriques et al., 2012; Dias et al., 2015; Nogueira et al., 2015). Sobre a cinética de colonização do *T. cruzi* (Dm28c) no trato digestivo de *R. prolixus*, foi demonstrado 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., 2004; Garcia et al., 2010). Depois disso, os parasitas restantes migram para o intestino médio posterior, onde podem proliferar (Alves et al., 2007; Garcia et al., 2007). Assim que o *T. cruzi* atingir o intestino grosso, esses parasitas serão eventualmente liberados na excreta (Kollien & Schaub, 2000; Schaub, 2009). Em conjunto, observamos uma carga parasitária constante no intestino médio posterior de *R. prolixus* e, enquanto a população de parasitas viáveis do intestino médio anterior diminuiu significativamente, o número de parasitas viáveis no reto aumentou concomitantemente ao longo dos dias após a alimentação.

Quanto à comparação na análise entre parasitos viáveis e não viáveis, os dois ensaios distintos (**itens 4.7**; e **4.8**) mostraram que a detecção de DNA de *T. cruzi* permaneceu estável ao longo dos dias nos grupos parasito lisado, enquanto a carga parasitária avaliada por RT-qPCR, dos mesmos grupos, não demonstrou amplificação para o grupo lisado desde o dia 0. Já os grupos controle, no qual foram analisados parasitos vivos, tiveram curvas de crescimento semelhantes se

compararmos as quantificações por DNA e por mRNA de *T. cruzi*. Vale ressaltar que a infecção de células H9C2 pela cepa Dm28c do *T. cruzi* revelou um aumento progressivo na taxa de infecção, com aumento de formas amastigotas, bem como a liberação de formas tripomastigotas. Este padrão de infecção também foi observado por Farani e colaboradores, (2021), no qual células H9C2 foram infectadas com formas tripomastigotas da cepa Colombiana, que também corresponde a DTU I (Farani et al., 2021). Isto nos sugere que a infecção foi bem-sucedida, como esperado para ser detectado em uma célula de mamífero (De Souza, 2002). Ou seja, estes resultados sugerem que a linhagem celular de cardiomiócitos H9C2 foi capaz de manter o ciclo de vida do *T. cruzi* e que no caso do grupo de células H9C2 que foram expostas ao parasito lisado, a infecção não foi estabelecida porque os parasitos não estavam, de fato, viáveis.

Por fim, levando em consideração a importância da intervenção terapêutica na infecção por *T. cruzi*, nós avaliamos o efeito do Benznidazol, um dos fármacos de primeira escolha para tratar a doença de Chagas, como tratamento em uma infecção experimental por *T. cruzi in vitro*. Além disso, diferenças nas cargas parasitárias através da quantificação por DNA e por RNA foram avaliadas e comparadas. Em relação ao ensaio com grupo tratado com Bz, foi possível observar que o uso do Benznidazol para o tratamento dos cardiomioblastos infectados experimentalmente com *T. cruzi* foi eficaz no controle da replicação do parasito. Ambas as metodologias moleculares demonstraram uma redução na carga parasitária. Porém, pela qPCR, a detecção do DNA permaneceu estável no grupo tratado enquanto o grupo controle (não tratado) teve um aumento na carga parasitária, mostrando um perfil de infecção semelhante ao que foi demonstrado nos ensaios anteriores com parasitos viáveis. Agora, se compararmos a quantificação da carga parasitária pelas duas metodologias no grupo tratado com Bz, observamos, novamente que, apesar do DNA do parasito apresentar uma tendência à diminuição ao longo dos dias após tratamento, sua detecção permanece estável enquanto o RNA é rapidamente degradado.

Apoiando nossos resultados, foi previamente observado que o DNA dos parasitas *Leishmania* pode permanecer detectável em cicatrizes de pacientes com leishmaniose cutânea meses após considerar a cura clínica (Schubach et al., 1998; Mendonça et al., 2004). Zhang & Tarleton (1999) relataram que o sinal do kDNA foi detectável em camundongos injetados com o kDNA do *T. cruzi* (Brasil e Sylvio X10/4) até 2 dias após a injeção (Zhang & Tarleton, 1999). Além disso, De Oliveira e

cols. (2019) mostraram que amostras de açaí experimentalmente contaminadas com DNA de parasitas não viáveis eram detectáveis por horas após a perda de viabilidade e, em contrapartida, observaram uma rápida degradação do mRNA de *T. cruzi* após amostras de açaí serem submetidas à higienização e tratamento térmico.

No geral, nossos dados sugerem que a detecção do DNA do *T. cruzi* por si só não significa a presença de parasita viável na amostra, uma vez que a molécula de DNA pode permanecer estável mesmo após a morte do parasita. A quantificação do mRNA de *T. cruzi*, por RT-qPCR, tem aplicação potencial na avaliação de viabilidade e levanta a possibilidade de monitoramento adicional da carga parasitária em insetos infectados ou estudos relacionados à capacidade vetorial. Igualmente, como inicialmente observado por De Oliveira e cols (2019), pode contribuir para a segurança alimentar, por meio do desenvolvimento de novos ensaios moleculares para análise de patógenos em amostras de alimentos, auxiliando no estudo de infecções orais e até mesmo na investigação de surtos.

6 PERSPECTIVAS

Uma vez completado o desenvolvimento da reação de RT-qPCR para quantificar parasitos viáveis, temos como perspectivas estudar o RNA como marcador de viabilidade em ensaios *in vivo*. Nestes ensaios buscaremos avaliar a viabilidade de *T. cruzi* em sangue e coração de camundongos por RT-qPCR, durante infecção experimental em animais submetidos ou não ao tratamento com Benznidazol, em comparação com os resultados de quantificação de parasitos totais (por qPCR).

Em relação aos estudos sobre infecção oral, também buscaremos analisar, em ensaios *in vivo*, um *cut off* da carga parasitária capaz de causar infecção em camundongos. Outra perspectiva para este trabalho é adaptar a reação de RT-qPCR para quantificar parasitos viáveis em amostras de alimentos à base de açaí, validando o ensaio com amostras coletadas na região do médio Solimões, que estão relacionadas a surto orais de doença de Chagas aguda. Por fim, com as amostras de GEA que testaram positivas para a presença de *T. cruzi*, almejamos realizar a genotipagem do parasito diretamente destas amostras, através de uma metodologia baseada em PCR convencional *multilocus*.

7 CONCLUSÕES

No presente trabalho foram geradas, com sucesso, metodologias para a extração, identificação e quantificação molecular do DNA de *T. cruzi* em amostras de polpa de açaí.

- A etapa de pré-lise e a etapa extra de centrifugação foram essenciais para a extração de DNA com elevado grau de pureza e em concentrações suficientes para a qPCR.
- A curva padrão ensaiada apresentou uma alta linearidade e uma eficiência de 89,65% para o alvo satDNA de *T. cruzi*.
- O ensaio de qPCR *multiplex* foi capaz de detectar todas as seis DTUs e, ao mesmo tempo, não apresentou amplificação para nenhuma espécie de tripanossomatídeo com exceção do *T. rangeli*, que não é um protozoário patogênico para o humano.
- Foi possível desenvolver uma metodologia *multiplex* simples, sensível e reproduzível.
- 20% das amostras de GEA de Coari testou positivo para *T. cruzi* pela qPCR, enquanto nenhuma amostra foi positiva para a microscopia óptica.

Em relação à comparação de kits para a extração de DNA de insetos, concluímos que:

- Os melhores resultados nos parâmetros concentração, grau de pureza e amplificação por PCR, foram apresentados pelo protocolo da ROCHE: *High Pure PCR Template Preparation Kit*.
- Na questão de custo, o kit da ROCHE mostrou ser o mais econômico.
- No geral, entre os três métodos de extração de DNA testados, o kit da ROCHE foi selecionado como o mais adequado para extração de DNA de amostras de intestino de triatomíneos.

Sobre as DTUs, embora mais ensaios monitorando a infecção de *R. prolixus* por diferentes DTUs de *T. cruzi* precisem ser realizados, os resultados obtidos até o momento nos sugerem:

- Diferenças no perfil de infecção entre as DTUs.
- A cepa Y (DTU II) se mostrou a única com tendência de redução constante da carga parasitária ao longo dos dias pós-alimentação.

- A cepa LL014 (DTU V) apresentou o maior índice de infecção em *R. prolixus*, quando comparada com as cepas das demais DTUs.

Considerando a análise para validar o RNA como marcador de viabilidade de *T. cruzi* em diferentes amostras (por RT-qPCR), e comparando os dados com os resultados obtidos através da quantificação do DNA (qPCR), observamos que:

- Ambas as técnicas moleculares apresentaram sensibilidade e especificidade para os alvos escolhidos.
- As curvas padrão geradas tanto para a qPCR quanto para a RT-qPCR mostraram linearidade e eficiências elevadas para todos os alvos.
- A reação de RT-qPCR, com iniciadores para o gene GAPDH, possibilitou a detecção/quantificação de parasitos viáveis.
- As diferenças observadas nas curvas de quantificação da carga parasitária, tanto na análise por DNA quanto por RNA, confirmaram a maior estabilidade do DNA no trato digestivo de *R. prolixus*.
- A análise molecular das diferentes porções do trato digestivo nos sugerem que, enquanto a população de parasitas viáveis do intestino médio anterior diminui significativamente, paralelamente no reto há um aumento da carga parasitária ao longo dos dias após a alimentação.
- As análises de qPCR confirmaram a maior estabilidade do DNA quanto à degradação mesmo após a lise do parasito.
- Observamos que a linhagem H9C2, infectada com a cepa Dm28c de *T. cruzi*, foi capaz de manter o ciclo do parasito com sucesso.
- A terapia utilizando Benznidazol mostrou uma redução na carga parasitária, observada por ambas as técnicas moleculares utilizadas no presente trabalho.
- Em conjunto, os resultados de viabilidade confirmam que o RNA é um potencial marcador molecular de viabilidade de *T. cruzi* em diferentes amostras sob diferentes condições.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde (ANVISA-MS) (2008). Informe nº 35 de 2008 — Português (Brasil). Available at: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/informes/copy_of_35de2008 [Accessed October 25, 2021].
- Alves, C. R., Albuquerque-Cunha, J. M., Mello, C. B., Garcia, E. S., Nogueira, N. F., Bourguignon, S. C., et al. (2007). *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 116, 44–52. Doi:10.1016/j.exppara.2006.11.012.
- Andersen, S. O., Hojrup, P., and Roepstorff, P. (1995). Insect cuticular proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 153–176. Doi:10.1016/0965-1748(94)00052-J.
- Antinori, S., Galimberti, L., Bianco, R., Grande, R., Galli, M., and Corbellino, M. (2017). Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *Eur. J. Intern. Med.* 43, 6–15. Doi:10.1016/j.ejim.2017.05.001.
- Araújo, C. A. C., Cabello, P. H., and Jansen, A. M. (2007). 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.* 101, 225–231. Doi:10.1016/j.actatropica.2007.02.004.
- Araújo, C. A. C., Waniek, P. J., and Jansen, A. M. (2014). TcI/TcII co-infection can enhance *Trypanosoma cruzi* growth in *Rhodnius prolixus*. *Parasites and Vectors* 7, 1–8. Doi:10.1186/1756-3305-7-94.
- Argolo, A. M., Felix, M., Pacheco, R., and Costa, J. (2008). Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. *Doença Chagas e seus ...*, 63. Doi:10.13140/2.1.1578.9449.
- Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., et al. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2034–2039. Doi:10.1073/pnas.0307312101.
- Ávila, A. R., Dallagiovanna, B., Yamada-Ogatta, S. F., Monteiro-Góes, V., Fragoso, S. P., Krieger, M. A., et al. (2003). Stage-specific gene expression during

- Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genet. Mol. Res.* 2, 159–168.
- Avila, H. A., Sigman, D. S., Cohen, L. M., Millikan, R. C., and Simpson, L. (1991). Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48, 211–221. Doi:10.1016/0166-6851(91)90116-N.
- Azambuja, P., Feder, D., and Garcia, E. S. (2004). Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: Impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp. Parasitol.* 107, 89–96. Doi:10.1016/j.exppara.2004.04.007.
- Azambuja, P., and Garcia, E. S. (1997). "Care and maintenance of triatomine colonies," in *Molecular Biology of Insect Disease Vectors: a methods manual*, eds. J. M. Crampton, C. Ben Beard, and C. Louis (Springer, Dordrecht), 55–64. Doi:https://doi.org/10.1007/978-94-009-1535-0_6.
- Azambuja, P., Garcia, E. S., and Ratcliffe, N. A. (2005). Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol.* 21, 568–572. Doi:10.1016/j.pt.2005.09.011.
- Barbosa-Ferreira, J. M., Guerra, J. A. de O., Santana Filho, F. S. de, Magalhães, B. M. L., Coelho, L. I. A. R. C., and Barbosa, M. das G. V. (2010). [Cardiac involvement in Acute Chagas' Disease cases in the Amazon region]. *Arq. Bras. Cardiol.* 94, 147–9. Doi:10.1590/s0066-782x2010000600023.
- Barbosa, R. L., Dias, V. L., Pereira, K. S., Schmidt, F. L., Franco, R. M. B., Guaraldo, A. M. A., et al. (2012). Survival in vitro and virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp in experimental acute chagas disease. *J. Food Prot.* 75, 601–606. Doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-233.
- Barbosa, R. L., Pereira, K. S., Dias, V. L., Schmidt, F. L., Alves, D. P., Guaraldo, A. M. A., et al. (2016). Virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai (*Euterpe oleracea* Martius) pulp following mild heat treatment. *J. Food Prot.* 79, 1807–1812. Doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-595.
- Barroso Ferreira, R. T., Branquinho, M. R., and Cardarelli-Leite, P. (2014).

- Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. *Vigilância Sanitária em Debate* 2, 4–11. Doi:10.3395/vd.v2i4.358.
- Bayer-Santos, E., Cunha-E-Silva, N. L., Yoshida, N., and Franco Da Silveira, J. (2013). Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasites and Vectors* 6, 1–10. Doi:10.1186/1756-3305-6-127.
- Bergallo, M., Costa, C., Gribaudo, G., Tarallo, S., Baro, S., Ponzi, A. N., et al. (2006). Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. *New Microbiol.* 29, 111–119.
- Bern, C. (2011). Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* 365, 1258–1259. Doi:10.1056/nejmc1108653.
- Bichara, C. M. G., and Rogez, H. (2011). *Açaí (Euterpe oleracea Martius)*. Woodhead Publishing Limited doi:10.1533/9780857092762.1.
- Blanchet, D., Brenière, S. F., Schijman, A. G., Bisio, M., Simon, S., Véron, V., et al. (2014). First report of a family outbreak of Chagas disease in French Guiana and posttreatment follow-up. *Infect. Genet. Evol.* 28, 245–250. Doi:10.1016/j.meegid.2014.10.004.
- Botto-Mahan, C., Ortiz, S., Rozas, M., Cattán, P. E., and Solari, A. (2005). DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 237–239. Doi:10.1590/S0074-02762005000300003.
- Bowtell, D. D. L. (1987). Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal. Biochem.* 162, 463–465. Doi:10.1016/0003-2697(87)90421-0.
- Braz, L. M. A., Raiz, R., Okay, T. S., Alárcon, R. S., Gakyia, E., and Amato Neto, V. (2007). The detection of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: Comparison of a PCR-based assay with microscopical examination. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 101, 461–465. Doi:10.1179/136485907X176535.
- Briceño-León, R. (2009). La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. *Cad. Saude Publica* 25, S71–S82. Doi:10.1590/s0102-

311x2009001300007.

- Britto, C. C. (2009). Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: Value and limitations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 122–135. Doi:10.1590/S0074-02762009000900018.
- Britto, C., Cardoso, M. A., Vanni, C. M. M., Hasslocher-Moreno, A., Xavier, S. S., Oelemann, W., et al. (1995). Polymerase Chain Reaction Detection of *Trypanosoma cruzi* in Human Blood Samples as a Tool for Diagnosis and Treatment Evaluation. *Parasitology* 110, 241–247. Doi:10.1017/S0031182000080823.
- Britto, C., Cardoso, M. A., Wincker, P., and Morel, C. M. (1993). 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* 88, 171–172. Doi:10.1590/S0074-02761993000100030.
- Britto, C., Silveira, C., Cardoso, M. A., Marques, P., Luquetti, A., Macêdo, V., et al. (2001). Parasite Persistence in Treated Chagasic Patients Revealed by Xenodiagnosis and Polymerase Chain Reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 823–826. Doi:10.1590/S0074-02762001000600014.
- Brondizio, E. S., and Moran, E. F. (2008). Human dimensions of climate change: The vulnerability of small farmers in the Amazon. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363, 1803–1809. Doi:10.1098/rstb.2007.0025.
- Brutus, L., Schneider, D., Postigo, J., Romero, M., Santalla, J., and Chippaux, J. P. (2008). Congenital Chagas disease: Diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta Trop.* 106, 195–199. Doi:10.1016/j.actatropica.2008.03.009.
- Burd, E. M. (2010). Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 550–576. Doi:10.1128/CMR.00074-09.
- Burgos, J. M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H. M. S., Seidenstein, M. E., et al. (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages

- of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 37, 1319–1327. Doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.015.
- Burgos, J. M., Begher, S., Silva, H. M. V., Bisio, M., Duffy, T., Levin, M. J., et al. (2008). Case report: Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in chagas reactivation due to AIDS. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 294–297. Doi:10.4269/ajtmh.2008.78.294.
- Burgos, J. M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., et al. (2010). Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 51, 485–495. Doi:10.1086/655680.
- Burgos, J. M., Risso, M. G., Brenière, S. F., Barnabé, C., Campetella, O., and Leguizamón, M. S. (2013). Differential Distribution of Genes Encoding the Virulence Factor Trans-Sialidase along *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units. *PLoS One* 8, 9–11. Doi:10.1371/journal.pone.0058967.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. Doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- Campbell, D., Westenberger, S., and Sturm, N. (2005). The Determinants of Chagas Disease: Connecting Parasite and Host Genetics. *Curr. Mol. Med.* 4, 549–562. Doi:10.2174/1566524043360249.
- Cancino-Faure, B., Fisa, R., Alcover, M. M., Jimenez-Marco, T., and Riera, C. (2016). Detection and quantification of viable and nonviable *Trypanosoma cruzi* parasites by a propidium monoazide real-time polymerase chain reaction assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 1282–1289. Doi:10.4269/ajtmh.15-0693.
- Cardoso, G. V. F., Lima, J. S., De Oliveira, A. C. D. S., Da Silva, J. B., Roos, T. B., and De Moraes, C. M. (2020). SYBR Green qPCR Technique for the Detection of *Trypanosoma cruzi* in Açai Pulp. *Foodborne Pathog. Dis.* 17, 466–469. Doi:10.1089/fpd.2019.2745.
- Castro, D. P., Moraes, C. S., Gonzalez, M. S., Ratcliffe, N. A., Azambuja, P., and

- Garcia, E. S. (2012). *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. *PloS One* 7, 3–10. Doi:10.1371/journal.pone.0036591.
- Cavalcante, P. B. (1979). Frutas comestíveis da Amazônia II. *Publicações Avulsas do Mus. Goeldi* 33, 1–61.
- Cevey, Á. C., Mirkin, G. A., Penas, F. N., and Goren, N. B. (2016). Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 6, 12–22. Doi:10.1016/j.ijpddr.2015.12.001.
- Chagas, C. (1909). 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* 1, 159–218.
- Cominetti, M. C., Ferreira, R., Almeida, C. De, and Maria, G. (2013). Case Report Article Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46, 277–280.
- Contreras, V. T., Morel, C. M., and Goldenberg, S. (1985). Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14, 83–96. Doi:10.1016/0166-6851(85)90108-2.
- Cordero, E. M., Gentil, L. G., Crisante, G., Ramírez, J. L., Yoshida, N., Añez, N., et al. (2008). Expression of GP82 and GP90 surface glycoprotein genes of *Trypanosoma cruzi* during in vivo metacyclogenesis in the insect vector *Rhodnius prolixus*. *Acta Trop.* 105, 87–91. Doi:10.1016/j.actatropica.2007.08.004.
- Costa, A. D. T., Jacomasso, T., Mattos, E. C., Farias, A. B., Rampazzo, R. C. P., Pinto, R. S., et al. (2021). Ready-to-use qPCR for detection of *Cyclospora cayentanensis* or *Trypanosoma cruzi* in food matrices. *Food Waterborne Parasitol.* 22, e00111. Doi:10.1016/j.fawpar.2021.e00111.
- Coura, J. R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed – A

- background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 113–122. Doi:10.1590/s0074-02762007007500001.
- Coura, J. R. (2015). The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions – A comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 277–282. Doi:10.1590/0074-0276140362.
- Coura, J. R., and Borges-Pereira, J. (2012). Doença de Chagas. O que é conhecido e o que deve ser melhorado: Uma visão sistêmica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45, 286–296. Doi:10.1590/S0037-86822012000300002.
- Coura, J. R., and Junqueira, A. C. V (2012). Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 145–154.
- Coura, J. R., and Viñas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 115, 14–21. Doi:10.1016/j.actatropica.2009.11.003.
- Coura, J. R., Viñas, P. A., and Junqueira, A. C. V. (2014). Ecoepidemiology, Short history and control of chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 856–862. Doi:10.1590/0074-0276140236.
- Cummings, K. L., and Tarleton, R. L. (2003). Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129, 53–59. Doi:10.1016/S0166-6851(03)00093-8.
- Dale, C., Justi, S. A., Galvão, C. (2021). *Belminus santosmalletae* (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae): New Species from Panama, with na Updated Key for *Belminus* Stål, 1859 Species. *Insects.* 12(8):686. Doi: 10.3390/insects12080686.
- Da Silva Valente, S. A., Da Costa Valente, V., and Fraiha Neto, H. (1999). Considerations on the Epidemiology and Transmission of Chagas Disease in the Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 395–398. Doi:10.1590/s0074-02761999000700077.
- De Freitas, V. L. T., da Silva, S. C. V., Sartori, A. M., Bezerra, R. C., Westphalen, E. V. N., Molina, T. D., et al. (2011). Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: Association with HIV

- viral load and CD4+ level. *PloS Negl. Trop. Dis.* 5. Doi:10.1371/journal.pntd.0001277.
- De Meis, J., Castro, R. S. S. (2017). Manual para diagnóstico da doença de Chagas para microscopistas de base no estado do Pará / Juliana de Meis, Rejane Seila da Silva Castro. Rio de Janeiro, 110p.
- De Noya, B. A., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., et al. (2010). Large urban outbreak of orally acquired acute chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J. Infect. Dis.* 201, 1308–1315. Doi:10.1086/651608.
- De Oliveira, A. C., Soccol, V. T., and Rogez, H. (2019). Prevention methods of foodborne Chagas disease: Disinfection, heat treatment and quality control by RT-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 301, 34–40. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.04.009.
- De Oliveira Filho, A. M. (1999). Differences of Susceptibility of Five Triatomine Species to Pyrethroid Insecticides – Implications for Chagas Disease Vector Control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 425–428. Doi:10.1590/s0074-02761999000700084.
- De Souza-Lima, R. de C., Barbosa, M. das G. V., Coura, J. R., Arcanjo, A. R. L., Nascimento, A. da S., Ferreira, J. M. B. B., et al. (2013). Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Na. Soc. Bras. Med. Trop.* 46, 510–514. Doi:10.1590/0037-8682-1367-2013.
- De Souza Godoi, P. A., Piechnik, C. A., de Oliveira, A. C., Sfeir, M. Z., de Souza, E. M., Rogez, H., et al. (2017). qPCR for the detection of foodborne *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Int.* 66, 563–566. Doi:10.1016/j.parint.2017.06.001.
- De Souza, R. C. M, Diotaiuti L. (2020). Desafios para o controle de triatomíneos no Brasil. In *Atualidades em Medicina Tropical No Brasil: Vetores*, 1st ed.; Oliveira, J., Chaboli, K., Aranha, L., Meneguetti, D., Eds.; Stricto Sensu: Rio Branco, Brazil, 85–98.
- De Souza, W. (2002). From the cell biology to the development of new

- chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: Dreams and reality. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 1, 1–21. Doi:10.1186/1475-9292-1-3.
- De Souza, W., de Carvalho, T. U., Barrias, E. S. (2017). *Ultrastructure of Trypanosoma cruzi and its interaction with host cells*. Second Edi. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-801029-7.00018-6
- Dias, F. de A., Guerra, B., Vieira, L. R., Perdomo, H. D., Gandara, A. C. P., Amaral, R. J. V. do, et al. (2015). Monitoring of the Parasite Load in the Digestive Tract of *Rhodnius prolixus* by Combined qPCR Analysis and Imaging Techniques Provides New Insights into the Trypanosome Life Cycle. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–23. Doi:10.1371/journal.pntd.0004186.
- Dias, J. C. P. (1997). Cecílio Romãña, o sinal de Romãña e a doença de Chagas. *Na. Soc. Bras. Med. Trop.* 30(5), 407-413. Doi: 10.1590/s0037-86821997000500012.
- Dias, J. C. P. (2009). Elimination of chagas disease transmission: Perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 41–45. Doi:10.1590/S0074-02762009000900007.
- Dias, J. C. P., Neto, V. A., and de Albuquerque Luna, E. J. (2011). Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. *Na. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 375–379. Doi:10.1590/S0037-86822011005000032.
- Dias, J. C. P., Ramos, A. N., Gontijo, E. D., Luquetti, A., Shikanai-Yasuda, M. A., Coura, J. R., et al. (2016). Aspectos Gerais da Epidemiologia da doença de Chagas com Especial Atenção ao Brasil. *Epidemiol. E Serv. Saude Na. Do Sist. Na Saude do Bras.* 25, 7–86. Doi:10.5123/S1679-49742016000500002.
- Dias, J. P., Bastos, C., Araújo, E., Mascarenhas, A. V., Netto, E. M., Grassi, F., et al. (2008). Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 296–300. Doi:10.1590/S0037-86822008000300014.
- Dorn, P. L., Engelke, D., Rodas, A., Rosales, R., Melgar, S., Brahney, B., et al. (1999). Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 740–745. Doi:10.4269/ajtmh.1999.60.740.

- Dorn, P. L., Flores, J., Brahney, B., Gutierrez, A., Rosales, R., Rodas, A., et al. (2001). 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* 96, 503–505. Doi:10.1590/S0074-02762001000400010.
- Duffy, T., Bisio, M., Altcheh, J., Burgos, J. M., Diez, M., Levin, M. J., et al. (2009). Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PloS Negl. Trop. Dis.* 3. Doi:10.1371/journal.pntd.0000419.
- Duffy, T., Cura, C. I., Ramirez, J. C., Abate, T., Cayo, N. M., Parrado, R., et al. (2013). 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.* 7. Doi:10.1371/journal.pntd.0002000.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., et al. (2005). The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science* (80-.). 309, 399–400. Doi:10.1126/science.309.5733.399.
- Elias, M. C., da Cunha, J. P. C., de Faria, F. P., Mortara, R. A., Freymüller, E., and Schenkman, S. (2007). Morphological Events during the *Trypanosoma cruzi* Cell Cycle. *Protist* 158, 147–157. Doi:10.1016/j.protis.2006.10.002.
- Esteves, M. (1989). Changes in fatty acid composition associated with differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 59, 31–34. Doi:10.1016/0378-1097(89)90453-9.
- Farani, P. S. G., Begum, K., Vilar-Pereira, G., Pereira, I. R., Almeida, I. C., Roy, S., et al. (2021). Treatment With Suboptimal Dose of Benznidazole Mitigates Immune Response Molecular Pathways in Mice With Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 1–20. Doi:10.3389/fcimb.2021.692655.
- Fernandes, M. C., and Andrews, N. W. (2013). Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A Unique Strategy that Promotes Persistence. *FEMS Microbiol* 36, 734–747. Doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x.Host.

- Fernandes, O., Mangia, R. H., Lisboa, C. V., Pinho, A. P., Morel, C. M., Zingales, B., et al. (1999). The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 118, 161–166. Doi:10.1017/S0031182098003709.
- Ferreira, R. C., Kessler, R. L., Lorenzo, M. G., Paim, R. M. M., Ferreira, L. D. L., Probst, C. M., et al. (2016a). Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. *Parasitology* 143, 434–443. Doi:10.1017/S0031182015001857.
- Ferreira, R. T. B., Cabral, M. L., Martins, R. S., Araujo, P. F., Da Silva, S. A., Britto, C., et al. (2018). Detection and genotyping of *Trypanosoma cruzi* from açai products commercialized in Rio de Janeiro and Pará, Brazil. *Parasites and Vectors* 11, 1–11. Doi:10.1186/s13071-018-2699-6.
- Ferreira, R. T. B., Melandre, A. M., Cabral, M. L., Branquinho, M. R., and Cardarelli-Leite, P. (2016b). Extraction of *Trypanosoma cruzi* DNA from food: A contribution to the elucidation of acute Chagas disease outbreaks. *Na. Soc. Bras. Med. Trop.* 49, 190–195. Doi:10.1590/0037-8682-0414-2015.
- Finamore-Araujo, P., Faier-Pereira, A., do Nascimento Brito, C. R., Peres, E. G., de Lima Yamaguchi, K. K., Ferreira, R. T. B., et al. (2021). Validation of a novel *multiplex* real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection and quantification in açai pulp. *PloS One* 16, 1–17. Doi:10.1371/journal.pone.0246435.
- Franco-Paredes, C., Villamil-Gómez, W. E., Schultz, J., Henao-Martínez, A. F., Parra-Henao, G., Rassi, A., et al. (2020). A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America – Public health and travel medicine importance. *Travel Med. Infect. Dis.* 36. Doi:10.1016/j.tmaid.2020.101565.
- Freire-de-Lima, L., Oliveira, I. A., Neves, J. L., Penha, L. L., Alisson-Silva, F., Dias, W. B., et al. (2012). Sialic acid: A sweet swing between mammalian host and *Trypanosoma cruzi*. *Front. Immunol.* 3, 1–12. Doi:10.3389/fimmu.2012.00356.
- Freitas, B., Bento, F. S., Santos, F. D. Q., Figueiredo, M., América, P., and Marçal, P. (2015). Características Físico-químicas, Bromatológicas, Microbiológicas e

Microscópicas de Polpas de Açaí (*Euterpe oleraceae*) Congeladas do Tipo B.
J. Applied Pharm. Sci. 2, 2–13.

Galvão C (2014). Vetores da doença de Chagas no Brasil. SciELO-Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014

Galvão, C (2020). Taxonomia dos Vetores da Doença de Chagas da Forma à Molécula, Quase Três séculos de História. In *Atualidades em Medicina Tropical No Brasil: Vetores*, 1st ed.; Oliveira, J., Chaboli, K., Aranha, L., Meneguetti, D., Eds.; *Stricto Sensu*: Rio Branco, Brazil, 9–37.

Garcia, E. S., Genta, F. A., De Azambuja, P., and Schaub, G. A. (2010). Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol.* 26, 499–505. Doi:10.1016/j.pt.2010.07.003.

Garcia, E. S., Ratcliffe, N. A., Whitten, M. M., Gonzalez, M. S., and Azambuja, P. (2007). Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J. Insect Physiol.* 53, 11–21. Doi:10.1016/j.jinsphys.2006.10.006.

Garzón, G. A., Narváez-Cuenca, C. E., Vincken, J. P., and Gruppen, H. (2017). Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. *Food Chem.* 217, 364–372. Doi:10.1016/j.foodchem.2016.08.107.

Gomes, M. L., Macedo, A. M., Vago, A. R., Pena, S. D. J., Galvão, L. M. C., and Chiari, E. (1998). *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp. Parasitol.* 88, 28–33. Doi:10.1006/expr.1998.4191.

Gontijo, E. D., Andrade, G. M. Q. de, Santos, S. E., Galvão, L. M. da C., Moreira, E. F., Pinto, F. S., et al. (2009). Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. *Epidemiol. E Serviços Saúde* 18. Doi:10.5123/s1679-49742009000300007.

Gourbière, S., Dorn, P., Tripet, F., and Dumonteil, E. (2012). Genetics and evolution of triatomines: From phylogeny to vector control. *Heredity (Edinb)*. 108, 190–

202. Doi:10.1038/hdy.2011.71.

Grutzmacher, D. D., Zimmer, P. D., Oliveira, A. C., Loeck, A. E., Fischer, S., Elias, S. A., et al. (2002). COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE *Acromyrmex heyeri*. *Curr. Agric. Sci. Technol.* 8, 165–167. Doi:10.18539/cast.v8i2.445.

Guedes-Da-Silva, F. H., Batista, D. G. J., Meuser, M. B., Demarque, K. C., Fulco, T. O., Araújo, J. S., et al. (2016). In vitro and in vivo trypanosomicidal action of novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2425–2434. Doi:10.1128/AAC.01667-15.

Guhl, F., and Vallejo, G. A. (2003). *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920 – Na Updated Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98(4), 435–442. Doi:10.1590/s0074-02762003000400001.

Hall, B. F., and Joiner, K. A. (1993). Developmentally-Regulated Virulence Factors of *Trypanosoma cruzi* and Their Relationship to Evasion of Host Defences. *J. Eukariotic Microbiol.* 40, 207–213. Doi:doi: 10.1111/j.1550-7408.1993.tb04905.x.

Hashimoto, K., and Schofield, C. (2012). Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasites and Vectors* 5, 1–10. Doi:10.1186/1756-3305-5-4522357219.

Hellyer, T. J., Desjardin, L. E., Hehman, G. L., Cave, M. D., and Eisenach, K. D. (1999). Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 290–295. Doi:10.1128/jcm.37.2.290-295.1999.

Henriques, C., Castro, D. P., Gomes, L. H. F., Garcia, E. S., and De Souza, W. (2012). Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection in *Rhodnius prolixus*. *Parasites and Vectors* 5, 1–15. Doi:10.1186/1756-3305-5-214.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnology* 11, 1026–1030. Available at: <http://www.nature.com/naturebiotechnology>.

Jansen, A. M., Xavier, S. C. C., and Roque, A. L. R. (2015). The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop.* 151, 1–15.

Doi:10.1016/j.actatropica.2015.07.018.

- Jurberg, J., and Galvão, C. (2006). Biology , ecology , and systematics of Triatominae (Heteroptera , Reduviidae), vectors of Chagas disease , and implications for human health 1. *Denisia* 50, 1096–1116.
- Kirchhoff, L. V. (2011). *Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease)*. 1st ed. Elsevier Ltd. Doi:10.1016/B978-0-12-385863-4.00001-0.
- Kirchhoff, L. V., Paredes, P., Lomelí-Guerrero, A., Paredes-Espinoza, M., Ron-Guerrero, C. S., Delgado-Mejía, M., et al. (2006). Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: Implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion* 46, 298–304. Doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00715.x.
- Kollien, A. H., and Schaub, G. A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol. Today* 16, 381–387. Doi:10.1016/S0169-4758(00)01724-5.
- Lascano, F., García Bournissen, F., and Altcheh, J. (2020). Review of pharmacological options for the treatment of Chagas disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 0–2. Doi:10.1111/bcp.14700.
- Lent, H., and Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas Disease. *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 163, 123–520.
- Lisboa, C. V., Pinho, A. P., Herrera, H. M., Gerhardt, M., Cupolillo, E., and Jansen, A. M. (2008). *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Vet. Parasitol.* 156, 314–318. Doi:10.1016/j.vetpar.2008.06.004.
- Liu, Q., and Zhou, X. N. (2015). Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries. *Infect. Dis. Poverty* 4. Doi:10.1186/s40249-015-0092-7.
- Macedo, A. M., and Pena, S. D. J. (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today* 14, 119–124. Doi:10.1016/S0169-4758(97)01179-4.

- Machado-de-Assis, G. F., Diniz, G. A., Montoya, R. A., Dias, J. C. P., Coura, J. R., Machado-Coelho, G. L. L., et al. (2013). A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 873–880. Doi:10.1590/0074-0276130122.
- Maldonado, C., Albano, S., Vettorazzi, L., Salomone, O., Zlocowski, J. C., Abiega, C., et al. (2004). Using polymerase chain reaction in early diagnosis of re-activated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation. *J. Hear. Lung Transplant.* 23, 1345–1348. Doi:10.1016/j.healun.2003.09.027.
- Marin, L. J., Cunha, A. A., Aquino, V. H., and Figueiredo, L. T. M. (2002). Desenvolvimento De Uma Metodologia De Pcr Semiquantitativa Utilizando Plasmídeo Clonado Com Parte Do Gene Gb De Citomegalovírus. *Med. (Ribeirao Preto. Online)* 35, 85. Doi:10.11606/issn.2176-7262.v35i1p85-94.
- Mattos, E. C. de, Meira-Strejevitch, C. da S., Marciano, M. A. M., Faccini, C. C., Lourenço, A. M., and Pereira-Chioccola, V. L. (2017). Molecular detection of *Trypanosoma cruzi* in acai pulp and sugarcane juice. *Acta Trop.* 176, 311–315. Doi:10.1016/j.actatropica.2017.08.025.
- McDaniel, J. P., and Dvorak, J. A. (1993). Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, 213–222. Doi:10.1016/0166-6851(93)90197-6.
- Mello, C. B., Azambuja, P., Garcia, E. S., and Ratcliffe, N. A. (1996). Differential in vitro and in vivo behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 82, 112–121. Doi:10.1006/expr.1996.0015.
- Mendonça, M. G., De Brito, A. E. F., Rodrigues, E. H. G., Bandeira, V., Jardim, M. L., and Abath, F. G. C. (2004). Persistence of Leishmania parasites in scars after clinical cure of american cutaneous leishmaniasis: Is there a sterile cure? *J. Infect. Dis.* 189, 1018–1023. Doi:10.1086/382135.
- Mesquita, R. D., Vionette-Amaral, R. J., Lowenberger, C., Rivera-Pomar, R., Monteiro, F. A., Minx, P., et al. (2015). Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas Disease, reveals unique adaptations to hematophagy and

parasite infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(48):14936-41. doi: 10.1073/pnas.1506226112.

Miles, M. A., Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., et al. (2009). The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: Looking back and to the future. *Parasitology* 136, 1509–1528. doi:10.1017/S0031182009990977.

Miles, M. A., Povoas, M. M., Prata, A., Cedillos, R., Souza, A. A., and Macedo, V. (1981). Do Radically Dissimilar *Trypanosoma*. *Lancet*, 1338–1340.

Molyneux, D. H., and Morel, C. (1998). Onchocerciasis and Chagas' disease control: The evolution of control via applied research through changing development scenarios. *Br. Med. Bull.* 54, 327–339. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a011691.

Moncayo, Á., and Silveira, A. C. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 17–30. doi:10.1590/S0074-02762009000900005.

Moreira, O. C., Ramírez, J. D., Velázquez, E., Melo, M. F. A. D., Lima-Ferreira, C., Guhl, F., et al. (2013). Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop.* 125, 23–31. doi:10.1016/j.actatropica.2012.08.020.

Moreira, O. C., Verly, T., Finamore-Araujo, P., Gomes, S. A. O., Lopes, C. M., De Sousa, D. M., et al. (2017). Development of conventional and real-time *multiplex* PCR-based assays for estimation of natural infection rates and *Trypanosoma cruzi* load in triatomine vectors. *Parasites and Vectors* 10, 1–14. doi:10.1186/s13071-017-2343-x.

Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Rosas, F., et al. (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 373, 1295–1306. doi:10.1056/nejmoa1507574.

Moser, D. R., Kirchhoff, L. V., and Donelson, J. E. (1989). Detection of *Trypanosoma*

- cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1477–1482. doi:10.1017/S0031182000061023.
- Müller Kratz, J., Garcia Bournissen, F., Forsyth, C. J., and Sosa-Estani, S. (2018). Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 11, 943–957. doi:10.1080/17512433.2018.1509704.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17–27.
- Neri-Numa, I. A., Soriano Sancho, R. A., Pereira, A. P. A., and Pastore, G. M. (2018). Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. *Food Res. Int.* 103, 345–360. doi:10.1016/j.foodres.2017.10.053.
- Neves, V. da C. (2010). Avaliação de Protocolos de Extração de DNA Empregados na Detecção de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 por PCR em Triatomíneos.
- Nóbrega, A. A., Garcia, M. H., Tatto, E., Obara, M. T., Costa, E., Sobel, J., et al. (2009). Oral transmission of chagas disease by consumption of Açaí palm fruit, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 653–655. doi:10.3201/eid1504.081450.
- Nogueira, N. P., Saraiva, F. M. S., Sultano, P. E., Cunha, P. R. B. B., Laranja, G. A. T., Justo, G. A., et al. (2015). Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: Redox status. *PLoS One* 10, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0116712.
- Norouzi, R., Dalimi, A., and Moghadam, M. F. (2016). Comparison of a Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) and real-time reverse transcriptase PCR methods for detection of *Toxoplasma gondii* in rat blood samples. *J. Zoonotic Dis.* 1, 15–23.
- Nunes, M. C. P., Beaton, A., Acquatella, H., Bern, C., Bolger, A. F., Echeverría, L. E., et al. (2018). *Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association.* doi:10.1161/CIR.0000000000000599.

- Oliveira, P. A. A. C. de, Silva, I. G. da, Souza, M. L. de, Furtado, C. M., and Silva, R. F. da (2011). In natura açai beverage: quality, pasteurization and acidification. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 31, 502–507. doi:10.1590/s0101-20612011000200035.
- Oliveira, M. F., Silva, J. R., Dansa-Petretski, M., De Souza, W., Lins, U., Braga, C. M. S., et al. (1999). Haem detoxification by an insect [3]. *Nature* 400, 517–518. doi:10.1038/22910.
- Organization, W. H. (2020). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) [Accessed September 21, 2020].
- Parodi-Talice, A., Monteiro-Goes, V., Arrambide, N., Avila, A. R., Duran, R., Correa, A., et al. (2007). Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *J. mass Spectrom.*, 1342–1347. doi:10.1002/jms.
- Passos, L. A. C., Guaraldo, A. M. A., Barbosa, R. L., Dias, V. L., Pereira, K. S., Schmidt, F. L., et al. (2012). Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açai: estudo in vitro e in vivo. *Epidemiol. e Serviços Saúde* 21, 223–232. doi:10.5123/s1679-49742012000200005.
- Payne, R. E., Wang, F., Su, N., Krell, J., Zebrowski, A., Yagüe, E., et al. (2012). Viable circulating tumour cell detection using *multiplex* RNA in situ hybridisation predicts progression-free survival in metastatic breast cancer patients. *Br. J. Cancer* 106, 1790–1797. doi:10.1038/bjc.2012.137.
- Pereira, K. S., Schmidt, F. L., Guaraldo, A. M. A., Franco, R. M. B., Dias, V. L., and Passos, L. A. C. (2009). Chagas' disease as a foodborne illness. *J. Food Prot.* 72, 441–446. doi:10.4315/0362-028X-72.2.441.
- Pérez-Molina, J. A., and Molina, I. (2018). Chagas disease. *Lancet* 391, 82–94. doi:10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- Pinto Dias, J. C. (2006). Chagas disease: Successes and challenges. *Cad. Saude Publica* 22, 2020–2021. doi:10.1590/s0102-311x2006001000001.

- Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergés, M., et al. (2007). Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 103, 195–200. doi:10.1016/j.actatropica.2007.05.019.
- Pizarro, J. C., Lucero, D. E., and Stevens, L. (2007). 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.* 7, 1–8. doi:10.1186/1471-2334-7-66.
- Ponce, C. (2007). Current situation of Chagas disease in Central America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 41–44. doi:10.1590/S0074-02762007005000082.
- Portela-Lindoso, A. A. B., and Shikanai-Yasuda, M. A. (2003). Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase
Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saúde Pública* 37, 107–115. Available at: www.fsp.usp.br/rsp.
- Prata A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of chagas disease. *Lancet infection disease. Clin. Epidemiol. Asp. Chagas Dis.* 1, 92–100.
- Ramírez, J. C., Cura, C. I., Da Cruz Moreira, O., Lages-Silva, E., Juiz, N., Velázquez, E., et al. (2015). Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from chagas disease patients. *J. Mol. Diagnostics* 17, 605–615. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.04.010.
- Rassi, A., Marin-Neto, J. A., and Rassi, A. (2017). Chronic chagas cardiomyopathy: A review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 224–235. doi:10.1590/0074-02760160334.
- Rassi, A., Rassi, A., and Marcondes de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26, 275–291. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002.
- Robertson, L. J., Devleeschauwer, B., Alarcón de Noya, B., Noya González, O., and

- Torgerson, P. R. (2016). *Trypanosoma cruzi*: Time for International Recognition as a Foodborne Parasite. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 3–8. doi:10.1371/journal.pntd.0004656.
- Rodrigues-dos-Santos, Í., Melo, M. F., de Castro, L., Hasslocher-Moreno, A. M., do Brasil, P. E. A. A., Silvestre de Sousa, A., et al. (2018). Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, 1–19. doi:10.1371/journal.pntd.0006939.
- Romaña C. (1935). Dos casos agudos más de enfermedad de Chagas en el Norte Santafesino. *MEPRA.* 21:14-18.
- Romero, I., Téllez, J., Suárez, Y., Cardona, M., Figueroa, R., Zelazny, A., et al. (2010). Viability and burden of *Leishmania* in extralesional sites during human dermal leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4. doi:10.1371/journal.pntd.0000819.
- Rubin-de-Celis, S. S. C., Uemura, H., Yoshida, N., and Schenkman, S. (2006). Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell. Microbiol.* 8, 1888–1898. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00755.x.
- Russomando, G., De Arias, A. R., Almiron, M., Figueredo, A., Ferreira, M. E., and Morita, K. (1996). *Trypanosoma cruzi*: Polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.* 83, 62–66. doi:10.1006/expr.1996.0049.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., et al. (1992). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology* 24, 476–480. doi:10.1007/BF00985904.
- Sales-Campos, H., Kappel, H. B., Andrade, C. P., Lima, T. P., Mattos, M. E., De Castilho, A., et al. (2014). A DTU-dependent blood parasitism and a DTU-independent tissue parasitism during mixed infection of *Trypanosoma cruzi* in immunosuppressed mice. *Parasitol. Res.* 113, 375–385. doi:10.1007/s00436-013-3665-z.

- Salvatella, R., Irabedra, P., Sánchez, D., Castellanos, L. G., and Espinal, M. (2013). South-south cooperation for Chagas disease. *Lancet* 382, 395–396. doi:10.1016/S0140-6736(13)61671-2.
- Schallig, H. D. F. H., Schoone, G. J., Lommerse, E. J. M., Kroon, C. C. M., De Vries, P. J., and Van Gool, T. (2003). Usefulness of quantitative nucleic acid sequence-based amplification for diagnosis of malaria in an Academic Hospital setting. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 555–557. doi:10.1007/s10096-003-0985-4.
- Schaub, G. A. (2009). *Interactions of Trypanosomatids and Triatomines*. doi:10.1016/S0065-2806(09)37004-6.
- Schijman, A. G. (2018). Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 184, 59–66. doi:10.1016/j.actatropica.2018.02.019.
- Schijman, A. G., Altcheh, J., Burgos, J. M., Biancardi, M., Bisio, M., Levin, M. J., et al. (2003). Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 441–449. doi:10.1093/jac/dkg338.
- Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 75–85. doi:10.1590/s0074-02762007005000093.
- Schofield, C. J., and Dias, J. C. P. (1999). The Southern Cone initiative against Chagas disease. *Adv. Parasitol.* 42, 1–27. doi:10.1016/s0065-308x(08)60147-5.
- Schofield, C. J., and Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 110, 88–100. doi:10.1016/j.actatropica.2009.01.010.
- Schoone, G. J., Oskam, L., Kroon, N. C. M., Schallig, H. D. F. H., and Omar, S. A. (2000). Detection and quantification of *Plasmodium falciparum* in blood samples using quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4072–4075. doi:10.1128/jcm.38.11.4072-4075.2000.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., and Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014–1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.

- Schubach, A., Haddad, F., Neto, M. P. O., Degraive, W., Pirmez, C., Grimaldi, G., et al. (1998). Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J. Infect. Dis.* 178, 911–914. doi:10.1086/515355.
- Seccadio, L. L. (2013). Fatores De Possível Influência Comportamental Em Triatomíneos Durante a Pós-Colheita De Frutos Em Triatomíneos Durante a Pós-Colheita De Frutos.
- Serrano, A. A., Schenkman, S., Yoshida, N., Mehlert, A., Richardson, J. M., and Ferguson, M. A. J. (1995). The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. *J. Biol. Chem.* 270, 27244–27253. doi:10.1074/jbc.270.45.27244.
- Shikanai-Yasuda, M. A., and Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of chagas disease. *Clin. Infect. Dis.* 54, 845–852. doi:10.1093/cid/cir956.
- Shikanai-Yasuda, M. A., Ochs, D. E., Tolezano, J. E., and Kirchhoff, L. V. (1996). Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90, 649–651. doi:10.1016/S0035-9203(96)90419-8.
- Silva-Gomes, N. L., Ennes-Vidal, V., Carolo, J. C. F., Batista, M. M., Soeiro, M. N., Menna-Barreto, R., et al. (2014). Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (TcNTPDase-1) gene expression is increased due to heat shock and in infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasites and Vectors* 7, 1–6. doi:10.1186/s13071-014-0463-0.
- Silveira, A. C., and Vinhaes, M. C. (1999). Elimination of Vector-borne Transmission of Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 405–411. doi:10.1590/S0074-02761999000700080.
- Silveira, A. C., and Dias, J. C. P. (2011). O controle da transmissão vetorial. *Rev Soc Bras Med Tropical*, v.44, v.Suppl II, p.52-63. doi: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000800009>
- Souto, R. P., and Zingales, B. (1993). Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol.*

Biochem. Parasitol. 62, 45–52. doi:10.1016/0166-6851(93)90176-X.

- Souza, E.S.; Von Atzingen, N.C.B.; Furtado, M.B.; Oliveira, J.; Nascimento, J.D.; Vendrami, D.P.; Gardim, S.; Rosa, J.A. (2016) Description of *Rhodnius marabaensis* sp. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará State, Brazil. *ZooKeys*, v.621, p.45-62. doi: 10.3897/zookeys.621.9662
- Steindel, M., Kramer Pacheco, L., Scholl, D., Soares, M., de Moraes, M. H., Eger, I., et al. (2008). 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.* 60, 25–32. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.016.
- Sturm, N. R., and Campbell, D. A. (2010). Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 115, 35–43. doi:10.1016/j.actatropica.2009.08.018.
- Sturm, N. R., Degraeve, W., Morel, C., and Simpson, L. (1989). 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.* 33, 205–214. doi:10.1016/0166-6851(89)90082-0.
- Teixeira, A. R. L., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., and Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 592–630. doi:10.1128/CMR.00063-10.
- Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guerrini, F., Skarecky, D., and Ayala, F. J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1335–1339. doi:10.1073/pnas.90.4.1335.
- Torma, P. do C. M. R., Brasil, A. V. S., Carvalho, A. V., Jablonski, A., Rabelo, T. K., Moreira, J. C. F., et al. (2017). Hydroethanolic extracts from different genotypes of açai (*Euterpe oleracea*) presented antioxidant potential and protected human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Food Chem.* 222, 94–104. doi:10.1016/j.foodchem.2016.12.006.
- Uehara, L. A., Moreira, O. C., Oliveira, A. C., Azambuja, P., Lima, A. P. C. A., Britto,

- C., et al. (2012). Cruzipain Promotes *Trypanosoma cruzi* Adhesion to *Rhodnius prolixus* Midgut. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6. doi:10.1371/journal.pntd.0001958.
- Vallejo, G. A., Guhl, F., Chiari, E., and MacEdo, A. M. (1999). 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.* 72, 203–212. doi:10.1016/S0001-706X(98)00085-0.
- Van Der Meide, W. F., Schoone, G. J., Faber, W. R., Zeegelaar, J. E., De Vries, H. J. C., Özbel, Y., et al. (2005). Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5560–5566. doi:10.1128/JCM.43.11.5560-5566.2005.
- Van Der Meide, W., Guerra, J., Schoone, G., Farenhorst, M., Coelho, L., Faber, W., et al. (2008). Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. *J. Clin. Microbiol.* 46, 73–78. doi:10.1128/JCM.01416-07.
- Van Kuppeveld, F. J. M., Johansson, K. E., Galama, J. M. D., Kissing, J., Bolske, G., Logt, J. T. M. V. Der, et al. (1994). Detection of *Mycoplasma* Contamination in Cell Cultures by a *Mycoplasma* Group-Specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 149–152. doi:10.1159/000163929.
- Van Kuppeveld, F. J. M., Van der Logt, J. T. M., Angulo, A. F., Van Zoest, M. J., Quint, W. G. V., Niesters, H. G. M., et al. (1992). Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2606–2615. doi:10.1128/aem.58.8.2606-2615.1992.
- Vanhamme, L., and Pays, E. (1995). Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol. Rev.* 59, 223–240. doi:10.1128/mmbr.59.2.223-240.1995.
- Vicente Amato Neto (2008). *Parasitologia: uma abordagem clínica*. [1^a ed]. Rio de Janeiro, editora Elsevier.
- Vieira, C. S., Waniek, P. J., Castro, D. P., Mattos, D. P., Moreira, O. C., and Azambuja, P. (2016). Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide

gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasites and Vectors* 9, 1–12. doi:10.1186/s13071-016-1398-4.

Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., and Bertocchi, G. (2006). Annals of Internal Medicine Article Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment. *Ann. Intern. Med.*

Virreira, M., Torrico, F., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Solano, M., Carlier, Y., et al. (2003). Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 574–582. doi:10.4269/ajtmh.2003.68.574.

Webster, G., Newberry, C. J., Fry, J. C., and Weightman, A. J. (2003). Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: A cautionary tale. *J. Microbiol. Methods* 55, 155–164. doi:10.1016/S0167-7012(03)00140-4.

World Health Organization (2018). WHO | Epidemiology. WHO. Available at: <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/> [Accessed September 21, 2020].

Xavier, S. C. das C., Roque, A. L. R., Bilac, D., de Araújo, V. A. L., Neto, S. F. da C., Lorosa, E. S., et al. (2014). Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8. doi:10.1371/journal.pntd.0002878.

Yamaguchi, K. K. D. L., Pereira, L. F. R., Lamarão, C. V., Lima, E. S., and Da Veiga-Junior, V. F. (2015). *Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review*. Elsevier Ltd doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.055.

Yoshida, N., Tyler, K. M., and Llewellyn, M. S. (2011). Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 27, 459–466. doi:10.1016/j.pt.2011.06.006.

Yuyama, L. K. O., Aguiar, J. P. L., Filho, D. F. S., Yuyama, K., de Jesus Varejão, M., Fávaro, D. I. T., et al. (2011). Caracterização físico-química do suco de açaí de euterpe precatória mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. *Acta Amaz.* 41, 545–552. doi:10.1590/S0044-59672011000400011.

Zhang, L., and Tarleton, R. L. (1999). Parasite persistence correlates with disease

severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* 180, 480–486. doi:10.1086/314889.

Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 184, 38–52. doi:10.1016/j.actatropica.2017.09.017.

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., et al. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* 12, 240–253. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.009.

RESEARCH ARTICLE

Validation of a novel multiplex real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection and quantification in açai pulp

Paula Finamore-Araujo¹, Amanda Faler-Peres¹, Carlos Ramon do Nascimento Brito², Eldirnel Gomes Peres³, Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi⁴, Renata Trotta Barroso Ferrelira⁵, Otacilio Cruz Moreira^{1*}

1 Plataforma Flocruz de PCR em Tempo Real PPT09A—Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil, **3** Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil, **4** Instituto de Saúde e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas—Campus Coari, Amazonas, Brazil, **5** Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

* otacilio@ioc.fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Finamore-Araujo P, Faler-Peres A, Ramon do Nascimento Brito C, Gomes Peres E, Kazumy de Lima Yamaguchi K, Trotta Barroso Ferrelira R, et al. (2021) Validation of a novel multiplex real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection and quantification in açai pulp. PLOS ONE 16(2): e0246435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246435>

Editor: Luzia Helena Carvalho, Instituto Rene Rachou, BRAZIL

Received: October 15, 2020

Accepted: January 19, 2021

Published: February 2, 2021

Copyright: © 2021 Finamore-Araujo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information files](#).

Funding: This work received financial support from Flocruz (Inova Flocruz/VPPCB), CNPq, FAPERJ and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001. OC Moreira is a researcher fellow of CNPq (308411/2017-0) and FAPERJ (JCNE-E-25/

Abstract

In Brazil, orally acquired *T. cruzi* infection has become the most relevant transmission mechanisms from public health perspective. Around 70% of new Chagas disease cases have been associated with consumption of contaminated food or beverages. Açai (*Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*) is currently one of the most commercialized Amazonian fruits in the Brazilian and international markets. Therefore, it has become important to incorporate in the production process some procedures to measure out effective hygiene and product quality control required by global market. Molecular methods have been developed for rapid detection and quantification of *T. cruzi* DNA in several biological samples, including food matrices, for epidemiological investigation of Chagas disease and food quality control. However, a high-performance molecular methodology since DNA extraction until detection and quantification of *T. cruzi* DNA in açai berry pulp is still needed. Herein, a simple DNA extraction methodology was standardized from the supernatant of açai berry pulp stabilized in a 6M Guanidine-HCl/0.2M EDTA buffer. In addition, a multiplex real time qPCR assay, targeting *T. cruzi* DNA and an Exogenous Internal Positive Control was developed and validated, using reference from all *T. cruzi* DTUs and commercial samples of açai pulp, from an endemic municipality with previous history of oral Chagas disease outbreak. Thus, a high-sensitivity qPCR assay, that could detect up to 0.01 parasite equivalents/mL in açai, was reached. As of the 45 commercial samples analyzed, 9 (20%) were positive for *T. cruzi*. This high-sensitive, fast, and easy-to-use molecular assay is compatible with most of the laboratories involved in the investigations of oral Chagas disease outbreaks, representing an important tool to the epidemiology, control, and surveillance of Chagas disease.

PLOS Neglected Tropical Diseases

RNA as a Feasible Marker of *Trypanosoma cruzi* Viability During the Parasite Interaction with the Triatomine Vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	RNA as a Feasible Marker of <i>Trypanosoma cruzi</i> Viability During the Parasite Interaction with the Triatomine Vector <i>Rhodnius prolixus</i> (Hemiptera, Triatominae)
Short Title:	<i>T. cruzi</i> RNA detection in <i>R. prolixus</i> by RT-qPCR
Article Type:	Research Article
Keywords:	<i>Trypanosoma cruzi</i> ; <i>Rhodnius prolixus</i> ; viability marker; RNA; parasite load
Corresponding Author:	Otacílio Cruz Moreira, Ph.D. Fundacao Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Fundacao Oswaldo Cruz
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Otacílio Cruz Moreira, Ph.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Otacílio Cruz Moreira, Ph.D. Paula Finamore-Araujo Gabriel Lucio Silva da Fonseca Cecília Stahl Vieira Daniele Pereira de Castro
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Qualitative or quantitative molecular diagnosis of <i>T. cruzi</i> infection in invertebrate hosts, based on qPCR, presents several advantages over optical microscopy, considered the classical method of diagnosis. Nevertheless, a recurring question concerning <i>T. cruzi</i> DNA detection/quantification is related to the fact that DNA amplification, by itself, does not differentiate between viable or dead parasites. On the other hand, RNA can be considered a potential molecular marker of pathogens viability. Herein, we developed a quantitative real-time PCR with reverse Transcription (RT-qPCR) to quantify viable <i>T. cruzi</i> in artificially infected <i>Rhodnius prolixus</i> whilst evaluating the differences between DNA and mRNA quantification along the insect midgut during 5, 9, 15 and 29 days after feeding. The RT-qPCR presented an improved performance with linearities ranging from 10^{-7} to 10^{-2} parasites equivalents and 3 to 0.0032 intestine unit equivalents, and efficiencies of 100.3% and 102.8% for both <i>T. cruzi</i> and triatomine targets, respectively. Comparing both RT-qPCR and qPCR, we confirmed that RNA is shortly degraded, no longer being detected at day 1 after parasite lysis, while DNA detection was stable, with no decrease in parasite load over the days, even after parasite lysis. We also observed statistical differences between the quantification of the parasite load by DNA and by RNA, especially on day 15 after feeding of experimentally infected <i>R. prolixus</i> . Moreover, when assessing different portions of the digestive tract, by RT-qPCR, we could detect a statistically significant reduction in the parasite amount in the anterior midgut of these insects on day 29 after feeding. Oppositely, we could observe a statistically significant increase of the parasite load in the hindgut on the same day. Assessing the parasite's viability using mRNA as a molecular viability marker will contribute to understanding the dynamics of the parasite infection in vertebrate and invertebrate hosts and explore new possibilities for trypanocidal drugs evaluation as

Powered by Editorial Manager® and ProXion Manager® from Artes Systems Corporation

RESEARCH ARTICLE

Validation of a novel multiplex real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection and quantification in açai pulp

Paula Finamore-Araujo¹, Amanda Faier-Pereira¹, Carlos Ramon do Nascimento Brito², Eldrinei Gomes Peres³, Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi⁴, Renata Trotta Barroso Ferreira⁵, Otacilio Cruz Moreira^{1*}

1 Plataforma Fiocruz de PCR em Tempo Real RPT09A –Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil, **3** Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil, **4** Instituto de Saúde e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas—Campus Coari, Amazonas, Brazil, **5** Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

* otacilio@ioc.fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Finamore-Araujo P, Faier-Pereira A, Ramon do Nascimento Brito C, Gomes Peres E, Kazumy de Lima Yamaguchi K, Trotta Barroso Ferreira R, et al. (2021) Validation of a novel multiplex real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection and quantification in açai pulp. PLoS ONE 16(2): e0246435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246435>

Editor: Luzia Helena Carvalho, Instituto Rene Rachou, BRAZIL

Received: October 15, 2020

Accepted: January 19, 2021

Published: February 2, 2021

Copyright: © 2021 Finamore-Araujo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Funding: This work received financial support from Fiocruz (Inova Fiocruz/VPPCB), CNPq, FAPERJ and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001. OC Moreira is a researcher fellow of CNPq (308411/2017-0) and FAPERJ (JCNE- E-26/

Abstract

In Brazil, orally acquired *T. cruzi* infection has become the most relevant transmission mechanisms from public health perspective. Around 70% of new Chagas disease cases have been associated with consumption of contaminated food or beverages. Açai (*Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*) is currently one of the most commercialized Amazonian fruits in the Brazilian and international markets. Therefore, it has become important to incorporate in the production process some procedures to measure out effective hygiene and product quality control required by global market. Molecular methods have been developed for rapid detection and quantification of *T. cruzi* DNA in several biological samples, including food matrices, for epidemiological investigation of Chagas disease and food quality control. However, a high-performance molecular methodology since DNA extraction until detection and quantification of *T. cruzi* DNA in açai berry pulp is still needed. Herein, a simple DNA extraction methodology was standardized from the supernatant of açai berry pulp stabilized in a 6M Guanidine-HCl/0.2M EDTA buffer. In addition, a multiplex real time qPCR assay, targeting *T. cruzi* DNA and an Exogenous Internal Positive Control was developed and validated, using reference from all *T. cruzi* DTUs and commercial samples of açai pulp, from an endemic municipality with previous history of oral Chagas disease outbreak. Thus, a high-sensitivity qPCR assay, that could detect up to 0.01 parasite equivalents/mL in açai, was reached. As of the 45 commercial samples analyzed, 9 (20%) were positive for *T. cruzi*. This high-sensitive, fast, and easy-to-use molecular assay is compatible with most of the laboratories involved in the investigations of oral Chagas disease outbreaks, representing an important tool to the epidemiology, control, and surveillance of Chagas disease.

203.031/2018). We are grateful for support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Chagas disease is a neglected tropical illness, caused by the flagellated and heteroxenous protozoan *Trypanosoma cruzi*. Although it is considered endemic in 21 countries in America, mainly affecting Latin America, Chagas disease has now spread to previously non-endemic areas, due to the increased population migration between Latin America and the rest of the world [1]. As of today, it is estimated that six to seven million people are infected by *T. cruzi*, mostly in the endemic areas, and approximately 75 million people are at risk of infection [2]. *T. cruzi* is represented by a set of sub-populations, comprising isolates and strains, which alternates between mammalian hosts and insect vectors, with high genetic variability and notable heterogeneity of clinical behavior and parasite-host relationship. Currently, seven genotypes, or Discrete Typing Units (DTUs) are recognized: TcI-TcVI, and Tcbat, this being last reported as TcVII [3, 4].

While Chagas disease is still often associated as a vector borne disease, its transmission can occur in other different routes besides vectorial such as blood transfusions, organs transplantation, congenital, laboratory accidents and oral transmission [5]. However, foodborne outbreaks of Chagas disease seem to be importantly increasing through Latin America [6]. Oral transmission can occur due to the consumption of complete triatomines or its feces, containing metacyclic trypomastigotes, which is inadvertently processed with food, especially fruits preparations [7–9].

In Brazil, the oral route of *T. cruzi* infection has become one of the most relevant transmission mechanisms from the public health perspective. Between the years 2000 and 2011, 1252 cases of acute Chagas disease were reported and, in these, 70% have been associated with consumption of contaminated food or beverages [6, 10]. Some of these orally acquired Chagas Disease are related to the consumption of fresh foods or drinks, as sugar cane juice, açai berry (*Euterpe oleracea*) and bacaba wine (*Oenocarpus bacaba*) [6, 11]. Among the Brazilian outbreaks, it is worth mentioning a suspected *T. cruzi* oral transmission through açai juice in the Northern Brazil, where cases of this transmission route show signs of increase. The outbreak occurred in 2008 at Coari city, in the interior of the Amazonas state, where 25 people got infected by *T. cruzi* [12]. Other countries around Latin America, suchlike Argentina, Bolivia, Colombia, Ecuador, and Venezuela, also have reported multiple Chagas disease outbreaks acquired orally [11]. The largest outbreak described so far occurred in Venezuela, in 2007, affecting 103 people, adults and children from a school in Caracas, that got infected by *T. cruzi* after the consumption of contaminated guava juice [13].

The açazeiro is one of the most socio-economically important palm trees that occurs especially throughout the Amazon region and is particularly abundant in the Eastern Amazon. Three species are popularly known as açai, *Euterpe edulis*, *E. oleracea* and *E. precatoria* [14], however, only the last two have agro-industrial interest. Both species have been shown antioxidant and anti-inflammatory properties with bioactive compounds as anthocyanins, flavonoids and phenolics, more than other fruits, such as grapes, blackberries, blueberries, and strawberries [15, 16]. Most of the açai is derived from the extractive activity, which is the main source of income for the riverine population of the Amazon Basin. In the North of Brazil, mainly, most of the production is still consumed by the local population, in which açai is traditionally ingested "in natura", especially in Para and amazon states, the biggest producers and consumers of açai around the world [17]. Furthermore, in the last ten years, there has been an important economic increase, nationally and internationally, in açai-based drinks commercialization. Açai is currently one of the most commercialized Amazonian fruits, not only in the Brazilian market, but also at an international level [18]. Even so, the national and international markets still have potential for considerable expansion of açai commercialization. Therefore, it has become important to incorporate in the production process some

procedures to measure out effective hygiene and product quality control required by global market [19, 20].

Until now, the evaluation of the potential for oral transmission of Chagas disease through the consumption of açai-based products is determined by clinical or parasitological investigations and are based on traditional methods, such as culture and microscopic observations [17]. Molecular methods based on PCR have been developed for the rapid detection and quantification of *T. cruzi* DNA in several biological samples [21]. More recently, it has also begun to be used to test food matrices, as a powerful tool in the epidemiological investigation of Chagas disease [22–26]. Moreover, the use of PCR for the detection of *T. cruzi* DNA has already been described in literature, since several studies demonstrate that this methodology presents greater sensitivity and specificity in the face of conventional parasitological methods [21]. Nevertheless, it is still demanded the development of methodologies capable to detect *T. cruzi* in food samples and, thereby, plan strategies to get a better understanding of oral transmission outbreaks and to assure the quality of the products that are being commercialized.

Results

In this study, an efficient DNA extraction method for açai pulp samples stabilized in guanidine-EDTA solution, in conjunction with a real-time PCR assay to rapidly assess, with reproducible protocols, the presence of *T. cruzi* DNA in açai pulp samples, were developed and validated. To increase the sensitivity of the methodology, artificially contaminated açai samples were submitted to a pre-lysis stage followed by a centrifugation step as described in material and methods section. To monitor the entire procedure concerning the stability of DNA and its loss during sample processing, a normalized amount of an exogenous internal positive control DNA (EXO-IPC DNA) was added to each GEA prior DNA extraction. Then, through qPCR assays, EXO-IPC DNA amplification from GEA samples with low *T. cruzi* concentrations was assessed (Fig 1).

To evaluate the analytical sensitivity for the *T. cruzi* detection in the multiplex assay, GEA samples were spiked with *T. cruzi* and serially diluted to reach from 10 to 0.01 parasite equivalents/mL, prior the supernatant isolation and DNA extraction. In addition, 300 μ L supernatant aliquots were spiked with EXO-IPC DNA, and satDNA and Exo-IPC amplifications were monitored through the Ct values at the multiplex real time PCR assay. As shown in Table 1, it is possible to observe the satDNA amplification in all concentrations tested, with Ct values from 27.32 ± 0.34 to 36.82 ± 1.3 , reaching a Limit of Detection of 0.01 *T. cruzi* equivalents/mL. Furthermore, the Ct values for the Exo-IPC varies only from 30.50 ± 0.12 to 30.92 ± 0.44 , regardless the *T. cruzi* concentration at the samples, in the range tested.

Following the analytical validation, the reportable range for the *T. cruzi* load quantification in açai pulp samples was determined. It was possible to observe that the *T. cruzi* DNA detection presented an improved linearity ($r^2 = 0.99$) in the range from 10^6 to 1 parasite equivalents/mL, to the serial dilution of DNA extracted from GEA spiked with *T. cruzi* epimastigotes

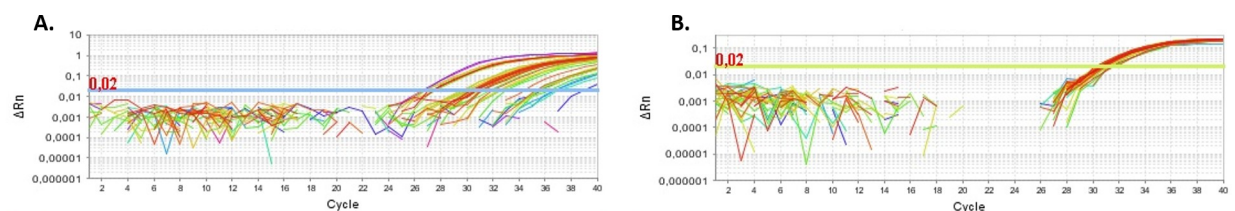


Fig 1. Representative amplification plots, targeting *T. cruzi* nuclear satellite DNA (A) and EXO-IPC DNA (B). DNA samples were extracted from GEA spiked with EXO-IPC synthetic DNA, using a silica-column based commercial kit.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246435.g001>

Table 1. Analytical sensitivity for the satDNA detection in GEA samples spiked with *T. cruzi* and Exo-IPC DNA. Assay was tested with genomic DNA extracted from GEA samples with different *T. cruzi* (Dm28c) concentrations, ranging from 10 to 0.01 *T. cruzi* equivalents/mL. All GEA supernatant samples were spiked with 2 μ L EXO-IPC DNA prior DNA extraction. Results are shown as Ct mean \pm SD for satDNA and Exo-IPC at the multiplex real time PCR assay.

Targets	<i>T. cruzi</i> equivalents/mL						
	10	1	0.75	0.5	0.25	0.1	0.01
satDNA	27.32 \pm 0.34	30.22 \pm 0.44	30.52 \pm 0.31	31.34 \pm 0.79	32.14 \pm 0.77	35.47 \pm 0.68	36.82 \pm 1.30
Exo-IPC	30.57 \pm 0.17	30.59 \pm 0.24	30.92 \pm 0.44	30.84 \pm 0.16	30.50 \pm 0.12	31.10 \pm 0.39	30.84 \pm 0.47

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246435.t001>

in DNA from negative GEA, as described in the Methods section (Fig 2). Under these conditions, it was possible to obtain a PCR efficiency of 89.65% to the amplification of the satDNA target.

Thereafter, inclusivity and exclusivity assays were performed. For the inclusivity assay, Table 2 shows that the multiplex qPCR could detect all the six *T. cruzi* DTUs, from 10^4 to 0.1 Par. Eq./mL, with Ct values varying from 20.37 ± 1.25 (to TcV, at 10^4 Par. Eq./mL) to 42.80 (to TcVI, at 0.1 Par. Eq./mL).

Regarding the exclusivity assay, it is possible to observe in Table 3 that DNA of other trypanosomatids, as *Leishmania (L.) amazonensis*, *L (V.) braziliensis*, *Crithidia* sp. and *Herpetomonas* sp., showed no amplification in any concentration tested. However, qPCR was positive for all concentration of DNA extracted from GEA spiked with *T. rangeli*, from 10^4 parasites equivalents/mL to 0.1 par. Eq./mL.

The last step of this study was to perform the validation of the multiplex qPCR assay with field samples. Therefore, 45 samples of açai pulp were collected from different street markets in the city of Coari (Amazonas State, Brazil) and investigated for the presence of *T. cruzi* by direct observation at an optical microscope and by the qPCR assay. No *T. cruzi* could be detected by microscopy in the açai pulp samples. Afterwards, DNA was extracted from the 45 açai field samples, following the standardized methodology. The mean DNA concentration (\pm standard deviation) was 86.2 ± 54.3 ng/ μ L, with minimal and maximal concentration been 36.9

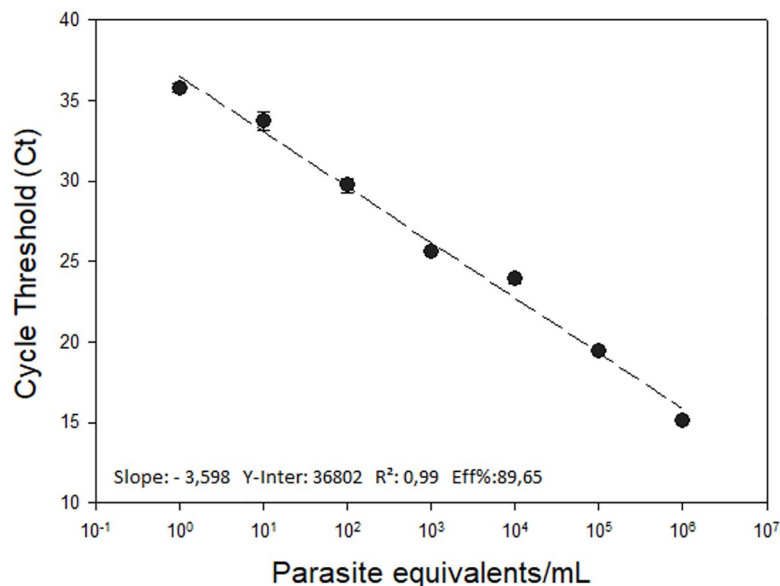


Fig 2. Reportable range for the quantification of *T. cruzi* in açai samples by real-time qPCR. A ten-fold serial dilution of DNA extracted from GEA spiked with *T. cruzi* was used to generate the standard curve for sat-DNA target, ranging from 10^6 to 1 Par. Eq./mL. The bottom of the graphic shows the standard curve parameters of the assay.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246435.g002>

Table 2. Inclusivity assay for *T. cruzi* DTUs. Assay was tested with genomic DNA obtained from a panel of GEA samples spiked with *T. cruzi* from six different DTUs. DNA concentrations ranged from 10^4 to 10^{-1} parasites equivalents/mL. Results are shown as Ct mean \pm SD obtained from duplicates of each DNA concentration.

DTUs	10^4 par.Eq/mL	10^3 par.Eq/mL	10^2 par.Eq/mL	10 par.Eq/mL	1 par.Eq/mL	0.1 par.Eq/mL
	Ct \pm SD	Ct \pm SD	Ct \pm SD	Ct \pm SD	Ct \pm SD	Ct \pm SD
TcI (Dm28c)	24.60 \pm 0.61	29.67 \pm 2.03	32.25 \pm 0.16	34.32 \pm 1.59	37.50 \pm 0.17	40.99 \pm 1.82
TcII (Y)	20.39 \pm 0.02	24.35 \pm 0.02	28.44 \pm 0.09	30.50 \pm 0.51	35.57 \pm 0.80	37.28 \pm 0.44
TcIII (3663)	23.00 \pm 1.29	26.79 \pm 0.50	32.94 \pm 2.80	34.77 \pm 1.30	41.18 \pm 3.19	39.39 \pm 1.26
TcIV (4167)	22.57 \pm 0.40	27.45 \pm 0.30	31.71 \pm 0.26	34.42 \pm 0.36	38.00 \pm 5.13	39.58
TcV (LL014)	20.37 \pm 1.25	24.14 \pm 0.27	28.27 \pm 0.20	30.51 \pm 0.62	34.71 \pm 1.22	36.74 \pm 2.00
TcVI (CL Brener)	20.50 \pm 0.05	25.20 \pm 0.62	28.34 \pm 0.73	30.96 \pm 0.45	34.67 \pm 0.25	42.80*

*The amplification occurred for one technical replicate only.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246435.t002>

and 347.1 ng/ μ L, respectively. Regarding the DNA purity, the mean 260/280 and 260/230 nm ratios were 1.8 ± 0.1 and 2.1 ± 0.5 , respectively (S1 Table). It was possible to detect and quantify *T. cruzi* in 9 samples (20%) by the multiplex qPCR, with parasite loads ranging from 0.002 to 19,05 par. Eq./mL, as shown in Table 4. However, 6 from the 9 positive samples presented parasite load below the reportable range (10^6 to 1 par. Eq./mL). In addition, all samples amplified the Exo-IPC target, with Cts from 28.51 ± 0.75 to 34.94 ± 0.48 , validating the true-negative samples.

Discussion

In the early 1990s, there was a milestone in the control of Chagas disease in South America. Countries in the Southern Cone (Argentina, Bolivia, Brazil, Chile, Paraguay, and Uruguay) adopted measures to control the vector and to screen and test blood banks [27]. The implementation of programs for the triatomine elimination in Latin American countries has resulted in the control of the transmission in several endemic areas by its main vector, and a significant decrease in the incidence of new cases [1, 28]. Nevertheless, the possibility of vector transmission still prevails since *T. cruzi* circulates among other triatomines species and several small mammals in sylvatic environments in which there is human activity [4, 6]. In addition, several outbreaks of oral infection in endemic areas are generally related to the consumption of contaminated [29].

T. cruzi transmission via the oral route is not a recent event since it represents the main route of contamination between vectors and animals and is one of the main mechanisms of parasite dispersion among mammals [4]. Originally sporadic reported, orally acquired Chagas disease seem to be increasing among populations in several Brazilian states [6] and in other

Table 3. Exclusivity assay with other Trypanosomatids. Assay was tested with serial dilutions of purified DNAs from different species of Trypanosomatids that ranged from 10^4 to 0.1 parasites equivalents/mL. Results are shown as Ct mean \pm SD obtained from duplicates of each DNA concentration.

Samples	10^4 par.Eq/mL	10^3 par.Eq/mL	10^2 par.Eq/mL	10 par.Eq/mL	1 par.Eq/mL	0.1 par.Eq/mL
	Ct \pm SD	Ct \pm SD	Ct \pm SD	Ct \pm SD	Ct \pm SD	Ct \pm SD
<i>L. amazonensis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>L. braziliensis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Crithidia</i> sp.	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Herpetomonas</i> sp.	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>T. rangeli</i>	22.95 \pm 0.58	27.83 \pm 0.62	31.18 \pm 0.30	32.95 \pm 0.20	33.94 \pm 0.64	38.91 \pm 0.60

NA: No amplification

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246435.t003>

Table 4. Validation of the multiplex real time qPCR assay. Forty-five açai pulp samples were obtained from different points of sale at the Coari city (Amazonas State, Brazil). *T. cruzi* was detected and quantified using primers targeting satDNA in the multiplex qPCR assay. Results are indicated as Ct mean \pm SD and parasite load is shown as parasite equivalents/mL.

Açai Samples	Targets	Ct \pm SD	Parasite Load (Par.Eq/mL)*	Microscopy
1	satDNA	36.42	19.05	Negative
	Exo-IPC	33.17 \pm 0.39		
2	satDNA	34.64	0.21*	Negative
	Exo-IPC	33.23 \pm 0.66		
3	satDNA	35.97	0.10*	Negative
	Exo-IPC	31.24 \pm 2.56		
4	satDNA	41.99	0.002*	Negative
	Exo-IPC	34.94 \pm 0.48		
5	satDNA	37.49	10.60	Negative
	Exo-IPC	34.27 \pm 0.12		
6	satDNA	37.91	8.44	Negative
	Exo-IPC	32.84 \pm 0.06		
7	satDNA	39.31 \pm 1.90	0.02 \pm 0.01*	Negative
	Exo-IPC	33.40 \pm 0.47		
8	satDNA	37.67	0.03*	Negative
	Exo-IPC	28.53 \pm 0.42		
9	satDNA	37.29	0.04*	Negative
	Exo-IPC	29.88 \pm 0.02		
10	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.20 \pm 0.42		
11	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	34.80 \pm 0.94		
12	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	33.09 \pm 0.21		
13	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	33.99 \pm 0.08		
14	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.54 \pm 0.07		
15	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.82 \pm 0.12		
16	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	33.11 \pm 0.08		
17	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	33.02 \pm 0.28		
18	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.88 \pm 0.37		
19	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.54 \pm 0.41		
20	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.72 \pm 0.15		
21	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.23 \pm 0.73		
22	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	31.89 \pm 0.25		
23	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	31.61 \pm 0.25		

(Continued)

Table 4. (Continued)

Açai Samples	Targets	Ct ± SD	Parasite Load (Par.Eq/mL)*	Microscopy
24	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	31.92 ± 0.27		
25	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.90 ± 0.19		
26	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.18 ± 0.16		
27	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.63 ± 0.16		
28	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.62 ± 0.90		
29	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	31.78 ± 0.16		
30	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	33.42 ± 0.21		
31	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	33.07 ± 0.05		
32	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	34.10 ± 0.26		
33	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	33.39 ± 0.02		
34	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.94 ± 0.16		
35	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	31.54 ± 0.86		
36	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	32.73 ± 0.31		
37	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	29.41 ± 0.24		
38	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	29.20 ± 0.60		
39	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	29.63 ± 0.45		
40	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	28.51 ± 0.75		
41	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	29.23 ± 0.11		
42	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	28.68 ± 0.01		
43	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	30.20 ± 0.19		
44	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	29.87 ± 0.40		
45	satDNA	NA	Negative	Negative
	Exo-IPC	34.08 ± 0.52		

ND: Non-detected. Sample did not show any Ct value to this target, to the threshold set at 0.02.

*Parasite Load is below the reportable range (10^6 to 1 par. Eq./mL). The sample is positive for *T. cruzi* detection, but the Parasite Load is not quantifiable with accuracy.

*Samples without standard deviation for the parasite load amplified in only one technical replicate, at the qPCR assay targeting *T. cruzi* satDNA.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246435.t004>

Table 5. Comparison between different published methodologies for molecular detection of *T. cruzi* in açai samples.

Reference	Centrifugation prior DNA purification	DNA purification methodology	Exogenous Internal Control	DNA detection molecular-based methodology	qPCR efficiency	Validation with field samples
Ferreira et al., 2016 [30]	No	DNAzol (Invitrogen); NucleoSpin Food Kit (Machery-Nagel); CTAB	No	Conventional PCR Tc189Fw2/Tc189Rv3	-	No
Godoi et al., 2017 [24]	Triple centrifugation	Phenol-chloroform	No	Singleplex SYBR Green qPCR TCZ1/TCZ2; Ep1F/Ep1R	TCZ1/TCZ2: 80.82% Ep1F/Ep1R: 85.48%	No
Mattos et al., 2017 [22]	Yes	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen); QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	No	Singleplex TaqMan qPCR Cruzi 32/148 and TaqMan probe71 (FAM-NFQ)	Cruzi32/148: 91.25%	No
De Oliveira et al., 2019 [23]	Triple centrifugation	Phenol-chloroform	No	Conventional PCR TCZ1/TCZ2	-	No
Ferreira et al., 2018 [25]	No	CTAB	<i>rbcL</i> (plant chloroplast gene)	Conventional PCR Tc189Fw2/Tc189Rv3	-	Yes. Qualitative validation
Cardoso et al., 2020 [26]	No	Illustra Tissue and Cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)	No	Singleplex SYBR Green qPCR TCZ3/TCZ4	TCZ3/TCZ4: 103.98%	No
Present study	Yes	High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Life Science)	Synthetic DNA (EXO-IPC, Applied Biosystems)	Multiplex TaqMan qPCR Cruzi1/Cruzi2 and TaqMan probe Cruzi3 (FAM-NFQ); EXO-IPC (Applied Biosystems)	Cruzi1/Cruzi2: 89.65%	Yes. Qualitative and quantitative validations

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246435.t005>

endemic Latin American countries as well [11]. However, in the Northern region of Brazil, the oral transmission poses significant importance, mainly due to the daily diet based on the consumption of food *in natura*, which means unpasteurized homemade or artisan fresh food. Besides that, açai, which is macerated to produce a paste or drink, has been identified as the most frequent food involved in cases of orally acquired acute Chagas disease in Brazil [30, 31].

T. cruzi oral transmission prevention has proved to be relatively difficult, giving rise to the public health system a new demand to face orally acquired Chagas disease. Although guidelines for minimizing contamination by microorganisms and parasites during the processing in the food chain have already been established [20, 32], it is necessary to assess the quality of açai products that are sold and consumed by the population. Some studies that allow the molecular identification of the parasite in different food sources are already being developed and published [22–26, 30]. Table 5 resumes all the recent manuscripts reporting the use of molecular methods to detect *T. cruzi* in açai samples in comparison to the present study. It is possible to observe important differences between them, especially regarding DNA extraction methodologies and the use of internal controls.

The first step of the present work was to verify if the methodology chosen for DNA extraction was efficient to extract a high-quality genomic DNA from *T. cruzi* in açai samples. One of the biggest challenges for DNA extraction from parasites in such a complex food matrix lies on the presence of inhibitors that can be co-purified with the DNA during the extraction step and can reduce the efficiency of the PCR. Açai is composed of a significant portion of lipids, proteins, carbohydrates, soluble and non-soluble dietary fibers, fatty acids, a variety of minerals, and high antioxidant compound content, like anthocyanins, and phenolic compounds [33]. Presently, there are several methods available for DNA extraction from different sorts of samples, food matrices included, and they can be based on commercial kits or can be in-house methods. Despite being low cost and offer a high concentration of DNA, in-house methods, such as phenol-chloroform and CTAB are often laborious and not suitable to assess large-scale analyzes, since they are not reproducible, simple, or rapid protocols. In relation to DNA

extraction using a commercial kit, there is a concern due to açai viscosity, which can impair the procedure [22], mainly because of clogging of the silica-membrane. Because of that, even though many commercial kits are available for extracting DNA from different matrices, only a limited number can be used for DNA purification from processed food products, which can make these kits even more expensive. Particularly, the kit used in this study has an inhibitor removal buffer that permits removing inhibitors residues that could have remained in açai samples.

As a first attempt to increase the sensitivity of the methodology in this study, artificially contaminated açai samples were submitted to a pre-lysis stage, through mixing an equal volume of açai and 2X of a lysis buffer (Guanidine-HCl 6M/EDTA 0.2M pH 8.0) at room temperature. Guanidine-HCl can disrupt cells in addition to inhibiting nucleases, being a chaotropic salt commonly used for isolation of nucleic acids from cellular extracts. Thus, this reagent facilitates the preservation of nucleic acids in biological fluids [34, 35] and the sample transport from the field to the laboratory. Several previous studies related to molecular diagnosis of *T. cruzi* in blood samples have already incorporated this step into the methodology, due to its importance as a stabilizing buffer to the sample [36–39].

The use of negative and positive controls in qPCR is essential to ensure the reliability of the reaction, avoiding false-positive or false-negative results. However, especially in qPCR assays it is also necessary to include an internal amplification control to monitor the reproducibility of DNA extraction and the absence of PCR inhibition (total or partial). In previous studies for the molecular diagnosis of Chagas disease, a target at the host DNA, such as RNase P, or an exogenous DNA, were used as internal amplification controls, to avoid false negative results, which can occur when working with highly complex material [40], and to correct and normalize DNA variations between samples. However, to date, published studies related to *T. cruzi* molecular diagnosis in food samples, through qPCR, have not included an internal amplification control, despite using negative and positive controls in the reactions. In our study, we used a synthetic DNA to monitor the efficiency of the DNA extraction and the absence of inhibitors at qPCR. The reproducibility of the qPCR was confirmed since there was no variation in Exo-IPC Ct values, regardless *T. cruzi* concentration at the samples. Besides that, our internal amplification control was amplified in all açai samples, validating the true-negative results.

In most outbreaks, the presence of *T. cruzi* in food is, normally, detected by traditional methods, such as parasite isolation and microscopic investigation. And, although this practice presents results with high specificity, microscopic examination is a labor-intensive, time-consuming method and has low sensitivity, being minimally effective when only a few microorganisms exist in a sample [41]. Namely, the characteristic dark color of the açai fruit, which is associated with high anthocyanin concentrations and a large amount of organic matter [33], greatly limit the possibility of parasites detection during microscopic visualization [42]. In this context, molecular methods can overcome these limitations and provide specific diagnosis and *T. cruzi* genotyping [25]. The qPCR developed in the present study showed improved sensitivity and linearity, that have also been observed in previous studies. Besides that, in the inclusivity assay, it was possible to observe that all the six *T. cruzi* DTUs could be detected in GEA samples. Despite the remarkable inclusivity of the multiplex real time PCR assay, we could also observe that the Dm28c (TcI) presented higher Ct values for the satDNA target than the other DTUs, in general. This result corresponds with previous observations that the *T. cruzi* DTU I present a lower number of copies for the nuclear satellite DNA [43]. Regarding the exclusivity assay, it was possible to observe that DNA of other trypanosomatids species showed no cross-amplification in any concentration tested. However, when we tested different concentrations of *T. rangeli* DNA, qPCR was positive, confirming the previously observed cross-amplification

of *T. rangeli* with the selected primers and probe set [44, 45]. This expected result did not impair the use of this methodology to detect and quantify *T. cruzi* in açai samples, in cases of Chagas disease oral outbreaks, since *T. rangeli* will not cause any symptoms in humans, in contrast to the acute infection triggered by *T. cruzi*. In addition, there are important differences in the biological cycles of *T. rangeli* and *T. cruzi* inside the insect vector, where the former is practically not founded at the triatomine feces since it colonizes the salivary gland of the insects. On the other hand, it is expected that the açai contamination by *T. cruzi* occurs mostly due to triatomine feces contaminated with the parasite prior the insect itself. Thus, even in the presence of mixed contaminations *T. cruzi* + *T. rangeli* in triatomines at the açai palm tree, the presence of *T. rangeli* DNA in açai pulp should be rare. However, new molecular targets should be investigated to enhance the specificity for the *T. cruzi* parasite load quantification in açai samples.

In relation to the analysis of commercial açai-based samples, this work is, until now, the first one that has assessed, using a methodology based on Real-Time quantitative PCR, samples gathered from street markets of an endemic area. To build the standard curve to estimate the parasite load in the açai pulp samples, a *T. cruzi* clone from DTU I (TcI) was chosen, due to the previous identification of the high prevalence of TcI in samples from the Amazon region in Brazil [25, 46, 47]. The qPCR screening of these 45 GEA samples was shown to be more sensitive than microscopic examination, since the molecular method revealed a positivity of 20% (9/45), whereas all samples were negative for *T. cruzi* by direct observation at optical microscope. Probably it occurs due to the very low parasite load observed in most of samples, where 6 from the 9 positive samples presented parasite load below the reportable range (10^6 to 1 par. Eq./mL), being detectable by the qPCR but not quantifiable with acceptable accuracy. Ferreira et al. [25] determined, in food samples commercialized in Rio de Janeiro and Pará states, *T. cruzi* contamination rates and molecular characterization through conventional PCR and multilocus PCR analysis, respectively. And, although the set of primers showed high specificity, since there was no amplification for *T. rangeli* and other trypanosomatids genomic DNA, the chosen target had lower sensitivity. Interestingly, from the 140 samples of açai-based products they analyzed, 14 samples (10%) were positive for *T. cruzi* DNA and triatomine DNA was also detected in one of these 14 samples. A previous study [48] also found insect fragments in açai samples and these findings may reinforce the link between açai and the presence of infected vectors or mammals near of the outbreak locations.

Regarding the use of molecular methodologies as a diagnosis tool, *T. cruzi* DNA detection by itself does not mean the presence of viable parasite in the sample, once DNA molecule can remain stable even a little after parasite death [23, 49, 50]. Nevertheless, the detection of the parasite DNA can be important to identify problems related to good manufacturing practices throughout the production chain and in the epidemiological investigation of orally acquired Chagas disease outbreaks. In this context, our results present a simple and rapid extraction protocol, directly from açai samples, with a simple step for sample stabilization and DNA extraction based on silica-membrane spin columns. In addition to a highly sensitive multiplex qPCR-based methodology, which includes a commercial exogenous internal positive control. The integrated methodologies standardized herein can assist in the surveillance of commercialized açai-based products, in a large-scale basis, and can be a powerful tool for a better understanding about orally acquired Chagas disease and for strategies to assure the safety of açai, such as in prevention, and control analysis. Of note, only the detection of *T. cruzi* DNA in açai pulp samples should not lead to the discarding of the food products, since this detection can remain positive even after the açai sterilization by blanching or pasteurization. Therefore, more studies should be performed to evaluate the potential of DNA and other molecules to detect infectant parasites in açai samples.

Methods

Ethics statement

The study was approved by the ethical committees of the *Universidade Federal do Amazonas* (CAAE: 97439918.5.1001.5020, Approval number: 2.961.307) following the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Written informed consents were obtained from the owners of the street market stores.

Açai samples

Forty-Five açai pulp samples, gathered randomly from different street markets in the Coari municipality (Amazonas States, Brazil) in June 2018, were used in this study. The açai pulps were purchased in a region comprised between 4°05'02.0"S 63°08'36.0"W at North, 4°06'04.0"S 63°08'49.0"W at South, 4°05'14.0"S 63°08'06.0"W at East and 4°06'01.0"S 63°09'02.0"W at West of the city. Prior the pulp preparation, açai fruits were submitted to sterilization at the stores, by blanching (the fruits are immersed in a water bath at 80°C for 10", followed by the immersion in a water bath at room temperature for 2 minutes). Then, the pulps were prepared by the smashing of the açai fruit and mixing with water. All the açai fruits were collected at palms from the Coari municipality, except for 1 sample, collected at the Codajás municipality, also in the Amazon state.

Trypanosoma cruzi cultivation

Strains and clones of *Trypanosoma cruzi*, belonging to subpopulations classified between DTUs I to VI: Dm28c (TcI), Y (TcII), INPA 3663 (TcIII), INPA 4167 (TcIV), LL014 (TcV) and CL (TcVI), were obtained from *Coleção de Protozoários* of *Fundação Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Brazil (Fiocruz, COLPROT, <http://www.colprot.fiocruz.br>). Epimastigotes were cultured in LIT (Liver Infusion Tryptose—BD, USA) medium supplemented with 10% of heat-inactivated Bovine Fetal Serum (Invitrogen, Massachusetts, USA), at 28°C for 5 days, to reach logarithmic growth phase. Parasites were harvested by centrifugation (3000x g for 10 minutes, at 4°C), washed three times with 0.15 M NaCl, 0.01 M phosphate buffer pH 7.2 (PBS) and resuspended in the same solution, prior to artificial contamination of açai pulp samples and DNA extraction. Parasite growth was estimated by counting cells in the Neubauer Chamber hemocytometer using an optical microscope and expressed as parasites/mL.

Preparation of Guanidine-EDTA Açai (GEA) samples

For analytical validation, açai pulp samples were provided by the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil.

Samples were separated into 5mL aliquots and mixed with an equal volume of a lysis solution containing 6M Guanidine-HCL/0.2 N EDTA pH 8.0 (1:1 ratio). The total volume of açai lysate (GEA) was centrifugated at 10,000 xg for 10 minutes at room temperature. After the centrifugation, GEA supernatants were recovered and stored at 4°C until DNA extraction (Fig 3).

DNA extraction

Each 300 µL of GEA supernatant sample was extracted using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Life Science, Mannheim, Germany), a kit based on silica-membrane spin columns technology. The DNA purification protocol was carried out according to the manufacturer's instructions, with some modifications, including the volume of sample that was increased from 200 to 300 µL. Briefly, during the proteinase K lysis step, the GEA samples were incubated for 2 hours at 56°C. In addition, at the DNA elution step, a volume of 100 µL

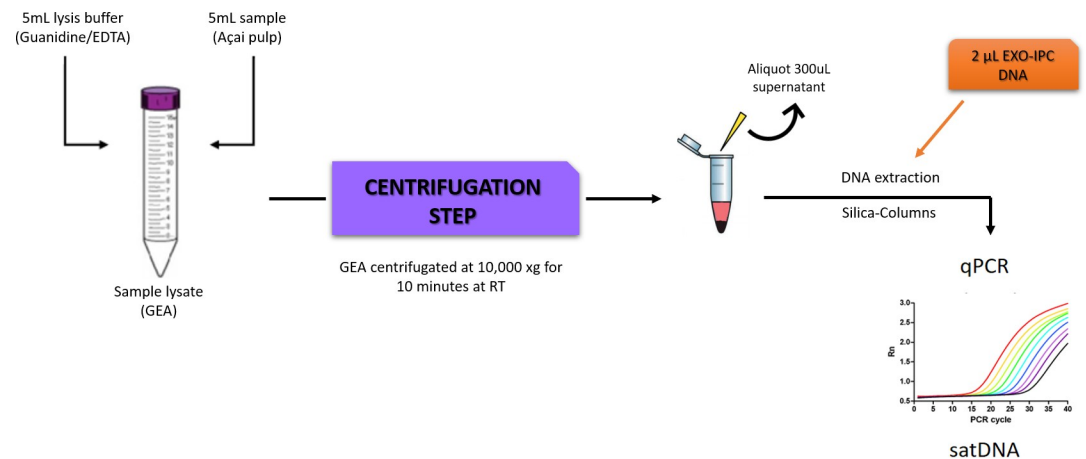


Fig 3. Scheme for the preparation of Guanidine-EDTA Açai (GEA) samples and DNA extraction using the Exogenous Internal Positive Control (Exo-IPC). The scheme shows the DNA extraction from the supernatant of the GEA spiked with EXO-IPC synthetic DNA, using a silica-column based commercial kit.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246435.g003>

of elution buffer was used to elute the purified DNA. The DNA samples were stored at -20°C and their purity and concentration were estimated using a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) at 260/280 and 260/320 nm.

In the present study, to monitor the reproducibility of the DNA extraction and the absence of inhibitors at PCR, the commercial kit TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used. The EXO-IPC DNA is a synthetic molecule that presents no homology to any DNA sequences available in public databases. Thus, 300 μL GEA supernatant were spiked with 2 μL of the EXO-IPC DNA before DNA extraction. This EXO-IPC is supplied in a commercial kit format that also contains a set of pre-designed primers and TaqMan probe (VIC/TAMRA), targeting the synthetic DNA sequence.

For each DNA extraction batch (containing up to 11 samples), one negative control of the DNA extraction step was included, using a negative GEA supernatant sample. A sample was considered valid when the EXO-IPC target amplified with expected Ct values.

Quantitative multiplex real-time PCR (qPCR) assays

Multiplex real time PCR assays were performed for the detection and absolute quantification of the Exo-IPC and *T. cruzi* satDNA targets in GEA samples, respectively. Reactions were carried out in a final volume of 20 μL , containing 5 μL of DNA as a template, 10 μL of 2 \times FastStart TaqMan[®] Probe Master Mix (Roche Life Science, Mannheim, Germany), 750 nM cruzi1 and cruzi2 primers and 250 nM cruzi3 probe (FAM/NFQ-MGB) targeting *T. cruzi* nuclear satellite DNA (satDNA) and 1 μL of the 10 \times EXO-IPC Mix from the TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents commercial kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), that contains a set of primers and probe (VIC/TAMRA) targeting the synthetic EXO-IPC DNA. Sequences of both sets of primers and probes are described in Table 6. Quantitative assays were performed on the Viia7 equipment (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the following cycling conditions: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 45 cycles at 95°C for 15 s and 58°C for 1 min. The threshold was set at 0.02 for both targets in all real time PCR assays.

To build the standard curves for the *T. cruzi* absolute quantification, negative GEA samples were spiked with *T. cruzi* (Dm28c clone, TcI) to reach the 10^6 epimastigotes/mL concentration, prior to supernatant isolation and DNA extraction. In parallel, DNAs were extracted

Table 6. Primer sets and probes sequences for the multiplex qPCR assay.

Target	Primers/Probes	Sequences	Amplicon size	Reference
<i>T. cruzi</i> satellite DNA (Sat-DNA)	Cruzi 1 (Forward)	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA	165 bp	Piron et al., 2007 [51]
	Cruzi 2 (Reverse)	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA		
	Cruzi 3 (Probe)	FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB		
EXO-IPC (VIC/TAMRA)	Not Available	Not Available	Not Available	Applied Biosystems (4308323)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246435.t006>

from negative GEA sample supernatants and pooled, to be used as diluent for the standard curve. The curves were generated by ten-fold serial dilution of DNA from spiked GEA sample in DNA from negative GEA sample, ranging from 10^6 to 1 *T. cruzi* equivalents/mL.

Each 96-well reaction plate included the standard curve, Negative Template Control (ultra-pure water instead DNA template) and two positive controls (*T. cruzi* DNA at 10 fg/ μ L and 1 fg/ μ L).

Inclusivity and exclusivity assays

For the development of qPCR methods some parameters for analytical validation were included, such as: Inclusivity study (i), comprising the detection of the target strains, and exclusivity study (ii), involving the lack of response of closely related non-target strains, which can be potentially cross reactive, but are not expected to be detected [52]. **(i) Inclusivity study:** to assess the ability of this qPCR methodology to detect the *T. cruzi* target, genomic DNA were tested from a representative panel of *T. cruzi* strains/clones belonging to the six different DTUs: Dm28c (TcI); Y (TcII); INPA 3663 (TcIII); INPA 4167 (TcIV); LL014 (TcV); CL Brener (TcVI). Samples were obtained from the serial dilution of DNA extracted from GEA spiked with 10^6 parasites/mL, in negative GEA DNA, and assayed in duplicates, with concentrations ranging from 10^4 to 10^{-1} parasite equivalents/mL. **(ii) Exclusivity study:** to assess this qPCR methodology's lack of response from closely related non-target strains, serial dilutions of genomic DNA obtained from other species of trypanosomatids were tested: *Trypanosoma rangeli*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Herpetomonas muscarum*, and *Crithidia fasciculata*. Samples were assayed in duplicates, with concentrations ranging from 10^4 to 0.1 parasite equivalents/mL.

Optical microscopy

Açai pulp samples were analyzed for the presence of *T. cruzi* epimastigotes or trypomastigotes by optical microscopic examination. One drop from açai pulp was diluted in one drop of sterile saline solution, NaCl 0.85% (c.50 μ L), on a glass slide and examined by microscopy between slide and coverslip, at magnifications of 200–400 \times .

Statistical analysis

All experiments were performed at least in biological triplicates and experimental duplicates and data are reported as arithmetic mean \pm standard deviation. All statistical tests were conducted using the SigmaPlot for Windows Version 12.0 (Systat Software, Inc., California, USA). Student's t test or Mann-Whitney Rank-Sum tests were adopted to analyze the statistical significance of the apparent differences, according to the parametric or non-parametric distribution of the data. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant ($p < 0.05$).

The Tukey's criterion (boxplots) [53] was used to detect samples with outlier Ct values for Exo-IPC (Cts > 75th percentile + 1.5 \times interquartile distance of median Ct), which would indicate inhibition or material loss in samples from a same experimental group with $n > 10$.

Supporting information

S1 Table. Concentration and purity (260/280 and 260/230nm ratios) of DNA extracted from açai samples purchased at Coari municipality (Amazonas States, Brazil). Açai samples were mixed with guanidine hydrochloride 6M-EDTA 0.2M pH 8.0 solution and centrifuged, as described. DNA was extracted from 300 µL of the supernatant.

(DOCX)

S1 File.

(ZIP)

Acknowledgments

We thank to Instituto Oswaldo Cruz (IOC) and Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) for supplying facilities.

Author Contributions

Conceptualization: Paula Finamore-Araujo, Renata Trotta Barroso Ferreira, Otacilio Cruz Moreira.

Data curation: Paula Finamore-Araujo, Carlos Ramon do Nascimento Brito, Otacilio Cruz Moreira.

Formal analysis: Otacilio Cruz Moreira.

Funding acquisition: Otacilio Cruz Moreira.

Investigation: Paula Finamore-Araujo, Amanda Faier-Pereira, Carlos Ramon do Nascimento Brito, Eldrinei Gomes Peres, Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi.

Methodology: Paula Finamore-Araujo, Amanda Faier-Pereira, Otacilio Cruz Moreira.

Project administration: Otacilio Cruz Moreira.

Resources: Renata Trotta Barroso Ferreira, Otacilio Cruz Moreira.

Supervision: Otacilio Cruz Moreira.

Validation: Otacilio Cruz Moreira.

Visualization: Paula Finamore-Araujo, Renata Trotta Barroso Ferreira, Otacilio Cruz Moreira.

Writing – original draft: Paula Finamore-Araujo, Amanda Faier-Pereira.

Writing – review & editing: Paula Finamore-Araujo, Amanda Faier-Pereira, Carlos Ramon do Nascimento Brito, Eldrinei Gomes Peres, Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi, Renata Trotta Barroso Ferreira, Otacilio Cruz Moreira.

References

1. Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010; 465 (Suppl.): S6–7. <https://doi.org/10.1038/nature09221> PMID: 20571554
2. World Health Organization. WHO | Chagas disease (also known as American trypanosomiasis) [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 21]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
3. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research

- applications. *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009> PMID: 22226704
4. Jansen AM, Xavier SC, Roque AL. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop.* 2015; 151: 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.018> PMID: 26200785
 5. 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. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140362> PMID: 25466622
 6. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho BN. Oral Transmission of Chagas Disease. *Clin Infect Dis.* 2012; 54 (6): 845–52. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956> PMID: 22238161
 7. Dias JP, Bastos C, Araujo E, Mascarenhas AV, Netto EM, Grassi F, et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(3): 296–300 <https://doi.org/10.1590/s0037-86822008000300014> PMID: 18719812
 8. Nobrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of Açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15 (4): 653–655. <https://doi.org/10.3201/eid1504.081450> PMID: 19331764
 9. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AMA, Franco RMB, Dias VL, Passos LAC. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot.* 2009; 72 (2): 441–446. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.2.441> PMID: 19350996
 10. Robertson LJ, Devleeschauwer B, Noya BA, González ON, Torgerson PR. *Trypanosoma cruzi*: Time for international recognition as a foodborne parasite. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10 (6): e0004656. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004656> PMID: 27253136
 11. Franco-Paredes C, Villamil-Gómez WE, Schultz J, Henao-Martínez AF, Parra-Henao G, Rassi A Jr, et al. A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America—Public health and travel medicine importance. *Travel Med Infect Dis.* 2020; 101565. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101565> PMID: 32004732
 12. Souza-Lima RC, Barbosa MGV, Coura JR, Arcanjo ARL, Nascimento AS, Ferreira JMBB, et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013; 46 (4): 510–514. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-1367-2013> PMID: 23681429
 13. Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010; 201 (9): 1308–15. <https://doi.org/10.1086/651608> PMID: 20307205
 14. Cavalcante PB. Frutas comestíveis da Amazônia II. In: *Publicações Avulsas do Mus Goeldi*; 1974. pp. 279.
 15. Yuyama LKO, Aguiar JPL, Silva Filho DF, Yuyama K, Varejão MJ, Fávoro DIT, et al. Caracterização físico-química do suco de açai de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. *Acta Amaz.* 2011; 41 (4): 545–552.
 16. Yamaguchi KKL, Pereira LFR, Lamarão CV, Lima ES, Veiga Júnior VF. Amazon açai: Chemistry and biological activities: A Review. *Food Chem.* 2015; 179: 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.055> PMID: 25722148
 17. Barbosa RL, Dias VL, Lorosa ES, Costa EG, Pereira KS, Gilioli R, et al. Virulence of *Trypanosoma cruzi* from vector and reservoir in *in natura* açai pulp resulting in foodborne acute Chagas disease at Pará State, Brazil. *Exp Parasitol.* 2019; 197: 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.10.012> PMID: 30439347
 18. Brondizio ES. The Amazonian Caboclo and the Acai Palm: Forest Farmers in the Global Market. 1. ed. New York: The New York Botanical Garden Press, 2008. v. 1. 403p. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.0025> PMID: 18267908
 19. Dias JCP, Amato-Neto V, Luna EJA. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44 (3): 375–379. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822011005000032> PMID: 21625803
 20. Agência Nacional de Vigilância Sanitária—Ministério da Saúde (ANVISA—MS). Informe Técnico n° 35 de 19 de junho de 2008. Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2008 [cited 2020 Sep 21]. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Informes+Tecnicos/2008-06-19-35>
 21. Schijman AG. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2018; 184:59–66. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.019> PMID: 29476727

22. Mattos EC, Meira-Strejevitch CS, Marciano MAM, Faccini CC, Lourenço AM, Pereira-Chiccola VL. Molecular detection of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp and sugarcane juice. *Acta Trop*. 2017; 311–315. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.025> PMID: 28859960
23. De Oliveira AC, Soccol VT, Rogez H. Prevention methods of foodborne Chagas disease: Disinfections, heat treatment and quality control by RT-PCR. *Int J food Microbiol*. 2019; 301: 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.04.009> PMID: 31082698
24. Godoi PAS, Piechnik CA, Oliveira AC, Sfeir MZ, Souza EM, Rogez H, et al. qPCR for the detection of foodborne *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Int*. 2017; 66 (5): 563–566. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.06.001> PMID: 28602861
25. Ferreira RTB, Cabral ML, Martins RS, Finamore-Araujo P, Silva SA, Britto C, et al. Detection and genotyping of *Trypanosoma cruzi* from açai products commercialized in Rio de Janeiro and Pará, Brazil. *Parasit Vectors*. 2018; 11 (1): 233 <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2699-6> PMID: 29636097
26. Cardoso GVF, Lima JS, Oliveira ACS, Silva JB, Roos TB, Moraes CM. SYBR Green qPCR technique for the detection of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp. *Foodborne Pathog Dis*. 2020; 17 (7): 466–469. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2745> PMID: 32077756
27. Schofield CJ, Dias JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol*. 1999; 42: 1–27. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60147-5](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60147-5) PMID: 10050271
28. Dias JCP. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102 (Suppl I): 11–18. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000092> PMID: 17891281
29. Steindel M, Kramer-Pacheco L, Scholl D, Soares M, Moraes MH, Eger I, et al. 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. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.016> PMID: 17889480
30. Ferreira RTB, Melandre AM, Cabral ML, Branquinho MR, Cardarelli-Leite P. Extraction of *Trypanosoma cruzi* DNA from food: a contribution to the elucidation of acute Chagas disease outbreaks. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016; 49 (2). <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0414-2015> PMID: 27192588
31. Oliveira MSP, Schwartz G. Açai—*Euterpe oleracea*. In: Rodrigues S, Silva EO, Brito ES, editors. *Exotic Fruits*. Academic Press, 2018, pp. 1–5.
32. Dias JCP, Ramos NA Jr., Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Epidemiol Serv Saúde*. 2015; 25. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742016000500002>
33. Bichara CMGR, Rogez H. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). In: Yahia EM, editor. *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. Oxford, England, Woodhead Publishing; 2011. pp. 1–23.
34. Bowtell DDL. Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal. Biochem*. 1987; 162, 463–465. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90421-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90421-0) PMID: 3037944
35. Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1991; 48 (2): 211–21. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90116-n](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90116-n) PMID: 1662334
36. 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. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761993000100030> PMID: 8246754
37. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a Simplified Polymerase Chain Reaction Procedure to Detect *Trypanosoma cruzi* in Blood Samples from Chronic Chagasic Patients in a Rural Endemic Area. *Am J Trop Med and Hyg*. 1994; 51 (6): 771–777.
38. Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MF, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. 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. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.020> PMID: 22982466
39. Rodrigues-dos-Santos I, Melo MF, Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Brasil PEAA, Sousa AS, et al. Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12 (11): e0006939. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006939> PMID: 30418976
40. Burd EM. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23 (3): 550–576. <https://doi.org/10.1128/CMR.00074-09> PMID: 20610823

41. Passos LAC, Guaraldo AMA, Barbosa RL, Dias VL, Pereira KS, Schmidt FL, et al. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açai: estudo in vitro e in vivo. *Epidemiol. Serv. Saude*. 2012; 21 (2), 213–222.
42. Barbosa RL, Dias VL, Pereira KS, Schmidt FL, Franco RMB, Guaraldo AMA, et al. Survival in vitro and virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp in experimental acute Chagas disease. *J Food Prot*. 2012; 75 (3): 601–6. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-233> PMID: 22410239
43. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3 (4): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000419> PMID: 19381287
44. Ramírez JC, Cura CI, Moreira OC, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, et al. Analytical validation of quantitative Real-Time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *J Mol Diagn*. 2015; 17 (5): 605–15 <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.010> PMID: 26320872
45. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(1): e419. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002000> PMID: 23350002
46. Xavier SCC, Roque ALR, Bilac D, Araújo VAL, Costa-Neto SFC, Lorosa ES, et al. Distinct transmission of *Trypanosoma cruzi*: A new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8 (5): e2878. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002878> PMID: 24854494
47. Dias FBS, Quartier M, Diotaiuti L, Mejía G, Harry M, Lima ACL, et al. Ecology of *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Attalea palm trees of the Tapajós River Region (Pará State, Brazilian Amazon). *Parasit. Vectors*. 2014; 1; 7: 154 <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-154> PMID: 24690302
48. Freitas B, Bento FS, Santos FQ, Figueiredo M, América P, Marçal P. Características físico-químicas, bromatológicas, microbiológicas e microscópicas de polpa de açai (Euterpe oleraceae) congeladas do tipo B. *J Appl Pharm Sciences*. 2015; 2(2):2–13.
49. Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 62 (1): 45–52. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90176-x](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90176-x) PMID: 8114825
50. Cancino-Faure B, Fisa R, Alcover MM, Jimenez-Marco T, Riera C. Detection and quantification of viable and nonviable *Trypanosoma cruzi* parasites by a propidium monoazide real-time polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hyg*. 2016; 194 (6), 1282–1289. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0693> PMID: 27139452
51. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, Lopez-Chejade P, Puig L, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007; 103: 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.019> PMID: 17662227
52. International Organization for Standardization. ISO 16140–1:2016(en), Microbiology of the food chain—Method validation—Part 1: Vocabulary [Internet]. 2016 [cited 2020 Sep 21]. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:16140:-1:ed-1:v1:en>
53. Burns MJ, Nixon GJ, Foy CA, Harris N. Standardization of data from real-time quantitative PCR methods—Evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol*. 2005; 5: 31. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-5-31> PMID: 16336641

PLOS Neglected Tropical Diseases

RNA as a Feasible Marker of Trypanosoma cruzi Viability During the Parasite Interaction with the Triatomine Vector Rhodnius prolixus (Hemiptera, Triatominae) --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	RNA as a Feasible Marker of Trypanosoma cruzi Viability During the Parasite Interaction with the Triatomine Vector Rhodnius prolixus (Hemiptera, Triatominae)
Short Title:	T. cruzi RNA detection in R. prolixus by RT-qPCR
Article Type:	Research Article
Keywords:	Trypanosoma cruzi; Rhodnius prolixus; viability marker; RNA; parasite load
Corresponding Author:	Otacilio Cruz Moreira, Ph.D. Fundacao Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Fundacao Oswaldo Cruz
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Otacilio Cruz Moreira, Ph.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Otacilio Cruz Moreira, Ph.D. Paula Finamore-Araujo Gabriel Lucio Silva da Fonseca Cecília Stahl Vieira Daniele Pereira de Castro
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Qualitative or quantitative molecular diagnosis of T. cruzi infection in invertebrate hosts, based on qPCR, presents several advantages over optical microscopy, considered the classical method of diagnosis. Nevertheless, a recurring question concerning T. cruzi DNA detection/quantification is related to the fact that DNA amplification, by itself, does not differentiate between viable or dead parasites. On the other hand, RNA can be considered a potential molecular marker of pathogens viability. Herein, we developed a quantitative real-time PCR with reverse Transcription (RT-qPCR) to quantify viable T. cruzi in artificially infected Rhodnius prolixus whilst evaluating the differences between DNA and mRNA quantification along the insect midgut during 5, 9, 15 and 29 days after feeding. The RT-qPCR presented an improved performance with linearities ranging from 10 ⁷ to 10 ² parasites equivalents and 3 to 0.0032 intestine unit equivalents, and efficiencies of 100.3% and 102.8% for both T. cruzi and triatomine targets, respectively. Comparing both RT-qPCR and qPCR, we confirmed that RNA is shortly degraded, no longer being detected at day 1 after parasite lysis, while DNA detection was stable, with no decrease in parasite load over the days, even after parasite lysis. We also observed statistical differences between the quantification of the parasite load by DNA and by RNA, especially on day 15 after feeding of experimentally infected R. prolixus. Moreover, when assessing different portions of the digestive tract, by RT-qPCR, we could detect a statistically significant reduction in the parasite amount in the anterior midgut of these insects on day 29 after feeding. Oppositely, we could observe a statistically significant increase of the parasite load in the hindgut on the same day. Assessing the parasite's viability using mRNA as a molecular viability marker will contribute to understanding the dynamics of the parasite infection in vertebrate and invertebrate hosts and explore new possibilities for trypanocidal drugs evaluation as

	epidemiological investigation of Chagas disease.
Suggested Reviewers:	Rita Souza Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas René Rachou: Fundacao Oswaldo Cruz Instituto Rene Rachou rita.souza@fiocruz.br Expert in the field
	Cícero Brasileiro UFF: Universidade Federal Fluminense cicerobrasileiro@globo.com Expert in the field
	Rosa Maldonado UTEP: The University of Texas at El Paso ramaldonado@utep.edu Expert in the field
	Inés Zulantay Universidad de Chile izulanta@med.uchile.cl Expert in the field
Opposed Reviewers:	Juan David Ramirez Icahn School of Medicine at Mount Sinai Conflict of interest
	Hervé Rogez UFPA: Universidade Federal do Para Conflict of interest
	Vanete Soccol UFPR: Universidade Federal do Parana Conflict of Interest
	Ana Caroline Oliveira UFPR: Universidade Federal do Parana Conflict of interest
	Michelle Sfeir UFPR: Universidade Federal do Parana Conflict of interest
	Emanuel Maltempi de Souza UFPR: Universidade Federal do Parana Conflict of interest
	Maria Elena Crespo López UFPA: Universidade Federal do Para Conflict of interest
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure Enter a financial disclosure statement that describes the sources of funding for the work included in this submission. Review the submission guidelines for detailed	This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) - Finance Code 001. This work also received financial support from Inova Fiocruz (VPPCB/Fiocruz), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ). OC Moreira is a researcher fellow of CNPq1D

requirements. View published research articles from [PLOS NTDs](#) for specific examples.

This statement is required for submission and **will appear in the published article** if the submission is accepted. Please make sure it is accurate.

Unfunded studies

Enter: *The author(s) received no specific funding for this work.*

Funded studies

Enter a statement with the following details:

- Initials of the authors who received each award
- Grant numbers awarded to each author
- The full name of each funder
- URL of each funder website
- Did the sponsors or funders play any role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript?
- **NO** - Include this sentence at the end of your statement: *The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.*
- **YES** - Specify the role(s) played.

* typeset

Competing Interests

Use the instructions below to enter a competing interest statement for this submission. On behalf of all authors, disclose any [competing interests](#) that could be perceived to bias this work—acknowledging all financial support and any other relevant financial or non-

(311539/2020-3) and FAPERJ (JCNE, E-26/203.031/2018). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

The authors have declared that no competing interests exist.

financial competing interests.

This statement **will appear in the published article** if the submission is accepted. Please make sure it is accurate. View published research articles from [PLOS NTDs](#) for specific examples.

NO authors have competing interests

Enter: *The authors have declared that no competing interests exist.*

Authors with competing interests

Enter competing interest details beginning with this statement:

I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: [insert competing interests here]

* typeset

This statement is **required** for submission and **will appear in the published article** if the submission is accepted. Please make sure it is accurate and that any funding sources listed in your Funding Information later in the submission form are also declared in your Financial Disclosure statement.

Data Availability

Yes - all data are fully available without restriction

Authors are required to make all data underlying the findings described fully available, without restriction, and from the time of publication. PLOS allows rare exceptions to address legal and ethical concerns. See the [PLOS Data Policy](#) and [FAQ](#) for detailed information.

A Data Availability Statement describing where the data can be found is required at submission. Your answers to this question constitute the Data Availability Statement and **will be published in the article**, if accepted.

Important: Stating 'data available on request from the author' is not sufficient. If your data are only available upon request, select 'No' for the first question and explain your exceptional situation in the text box.

Do the authors confirm that all data underlying the findings described in their manuscript are fully available without restriction?

Describe where the data may be found in full sentences. If you are copying our sample text, replace any instances of XXX with the appropriate details.

- If the data are **held or will be held in a public repository**, include URLs, accession numbers or DOIs. If this information will only be available after acceptance, indicate this by ticking the box below. For example: *All XXX files are available from the XXX database (accession number(s) XXX, XXX).*
- If the data are all contained **within the**

All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

manuscript and/or Supporting Information files, enter the following:

All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

- If neither of these applies but you are able to provide **details of access elsewhere**, with or without limitations, please do so. For example:

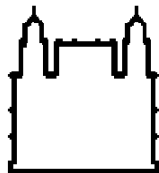
Data cannot be shared publicly because of [XXX]. Data are available from the XXX Institutional Data Access / Ethics Committee (contact via XXX) for researchers who meet the criteria for access to confidential data.

The data underlying the results presented in the study are available from (include the name of the third party and contact information or URL).

- This text is appropriate if the data are owned by a third party and authors do not have permission to share the data.

* typeset

Additional data availability information:



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, December 14th 2021

To: Editor - PLoS Neglected Tropical Diseases

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript entitled “RNA as a Feasible Marker of *Trypanosoma cruzi* Viability During the Parasite Interaction with the Triatomine Vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae)” by Paula Finamore-Araujo, Gabriel Lucio Celestino da Silva, Cecília Stahl Vieira, Daniele Pereira de Castro and Otacilio Cruz Moreira, to be submitted as an original research article to PLoS Neglected Tropical Diseases.

Chagas disease (CD) is a neglected tropical illness caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, still endemic in 21 countries in America. It affects approximately 6 million people and causes, on average, about 14,000 deaths per year. In the last decade, this neglected tropical disease has become a global concern because of the increasing migration from Latin America to non-endemic countries. *T. cruzi* has a complex biological cycle, as it develops between vertebrate hosts, including several domestic and sylvatic mammal species, and vectors belonging to the subfamily Triatominae (Hemiptera: Reduviidae).

Currently, there has been interest in distinguishing DNA and RNA amplification signals of several pathogens for viability assessment. However, a recurring question regarding the quantification of *T. cruzi* through its DNA detection extends to the fact that it is not clearly elucidated if the presence of DNA is related to the detection of viable infectious parasites. In this context, developing a highly sensitive molecular assay can offer significant advantages such as rapid identification and quantification of *T. cruzi* viability. Furthermore, the analysis of parasite viability may contribute to better investigations of the parasite infection dynamics in invertebrate hosts and vector competence. In this study, we developed a quantitative real-time PCR with reverse Transcription (RT-qPCR) to quantify viable *T. cruzi* in artificially infected *Rhodnius prolixus* whilst evaluating the differences between DNA and mRNA quantification along the insect midgut in different days after feeding and in different portions of the digestive tract. We note important differences between *T. cruzi* DNA and RNA quantification and could accurately observe the dynamic of parasite-invertebrate host interaction.

The manuscript has not been published before nor will be presently submitted or published elsewhere. We believe this investigation is in accordance with the Journal scope. All authors responsible for its content approved the present form of the manuscript and declare that they have no competing interests.

Corresponding authors: Otacilio C. Moreira E-mail: otacilio@ioc.fiocruz.br
Telephone contact: (+55 21) 2562-1773

Sincerely yours,

Dr. Otacilio C. Moreira

Plataforma de PCR em Tempo Real RPT09A
Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas
Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, 21045-900, Brasil

1

2

3 RNA as a Feasible Marker of *Trypanosoma cruzi* Viability During the
4 Parasite Interaction with the Triatomine Vector *Rhodnius prolixus*
5 (Hemiptera, Triatominae)

6 Paula Finamore-Araujo¹, Gabriel Lucio Silva da Fonseca¹, Cecília Stahl Vieira²,
7 Daniele Pereira de Castro², Otacilio Cruz Moreira^{1*}

8

9

10

11

12 ¹Real Time PCR Platform RPT09A, Laboratory of Molecular Biology and Endemic
13 Diseases, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro,
14 Brazil.

15 ²Laboratory of Biochemistry and Physiology of Insects, Oswaldo Cruz Institute,
16 Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

17

18 *Corresponding author

19 E-mail: otacilio@ioc.fiocruz.br

20

21

22

23

24 **Abstract**

25 Qualitative or quantitative molecular diagnosis of *T. cruzi* infection in invertebrate
26 hosts, based on qPCR, presents several advantages over optical microscopy,
27 considered the classical method of diagnosis. Nevertheless, a recurring question
28 concerning *T. cruzi* DNA detection/quantification is related to the fact that DNA
29 amplification, by itself, does not differentiate between viable or dead parasites.
30 On the other hand, RNA can be considered a potential molecular marker of
31 pathogens viability. Herein, we developed a quantitative real-time PCR with
32 reverse Transcription (RT-qPCR) to quantify viable *T. cruzi* in artificially infected
33 *Rhodnius prolixus* whilst evaluating the differences between DNA and mRNA
34 quantification along the insect midgut during 5, 9, 15 and 29 days after feeding.
35 The RT-qPCR presented an improved performance with linearities ranging from
36 10^7 to 10^2 parasites equivalents and 3 to 0.0032 intestine unit equivalents, and
37 efficiencies of 100.3% and 102.8% for both *T. cruzi* and triatomine targets,
38 respectively. Comparing both RT-qPCR and qPCR, we confirmed that RNA is
39 shortly degraded, no longer being detected at day 1 after parasite lysis, while
40 DNA detection was stable, with no decrease in parasite load over the days, even
41 after parasite lysis. We also observed statistical differences between the
42 quantification of the parasite load by DNA and by RNA, especially on day 15 after
43 feeding of experimentally infected *R. prolixus*. Moreover, when assessing
44 different portions of the digestive tract, by RT-qPCR, we could detect a
45 statistically significant reduction in the parasite amount in the anterior midgut of
46 these insects on day 29 after feeding. Oppositely, we could observe a statistically
47 significant increase of the parasite load in the hindgut on the same day.
48 Assessing the parasite's viability using mRNA as a molecular viability marker will

49 contribute to understanding the dynamics of the parasite infection in vertebrate
50 and invertebrate hosts and explore new possibilities for trypanocidal drugs
51 evaluation as epidemiological investigation of Chagas disease.

52

53 **Author Summary**

54 In this study, we developed and standardized a Real-Time PCR with Reverse
55 Transcription (RT-qPCR) to determine *T. cruzi* viability in *R. prolixus* samples.
56 Moreover, we aimed to assess differences between the amplification signals of
57 DNA and mRNA on a *T. cruzi* colonization kinetics in experimentally infected *R.*
58 *prolixus*. Thus, it was possible to analyze the potential of parasite's RNA as a
59 molecular viability marker in parasite-vector interaction. This novel RT-qPCR
60 methodology has potential application in viability assessment and raises the
61 possibility for further monitoring of the parasite load in infected insects or studies
62 related to vectorial capacity. Furthermore, the analysis of parasite viability by RT-
63 qPCR could be an especially effective tool for Chagas disease diagnostic
64 purposes.

65

66 **Introduction**

67 Chagas disease is a neglected tropical illness, caused by the flagellated
68 protozoan *Trypanosoma cruzi*, which involves a major social and economic
69 problem in several countries in Latin America. It is estimated that six to seven
70 million individuals are infected, mainly in Central and South America (1).
71 Moreover, although it is considered a neglected disease, Chagas disease has a

72 worldwide prevalence and its presence in several countries out of the endemic
73 ones has turned it into a global health problem in recent years (2). This parasitosis
74 caused by *T. cruzi* infection evolved from a primitive enzooty and became a
75 human health problem, due to many factors such as population migrations and
76 increased human changes in the environment (3).

77 *T. cruzi* is represented by a group of isolates, which comprises clones and
78 strains, presenting great heterogeneity in biological behavior (4,5). Currently,
79 seven genotypes, or Discrete Typing Units (DTUs) are recognized (TcI-TcVI and
80 TcBat) and identifiable by specific molecular markers (6,7). In addition, *T. cruzi*
81 has a complex biological cycle, as it develops between vertebrate hosts, including
82 several domestic and sylvatic mammal species, and strictly hematophagous
83 insect vectors belonging to the subfamily Triatominae (Hemiptera: Reduviidae)
84 (8,9). During its biological cycle, *T. cruzi* alternates between four main
85 development stages which can be found in both vertebrate and invertebrate
86 hosts, such as, bloodstream and metacyclic trypomastigotes, infective but
87 nonreplicative stages, as well as amastigotes and epimastigotes, noninfective but
88 replicative stages. In addition to these four main forms, *T. cruzi* have many
89 intermediate developmental stages. These different stages are morphologically
90 differentiated by the position of the kinetoplast in relation to the nucleus and the
91 region of emergence of the flagellum. And, besides morphological differences,
92 several changes in the expression of some stage-specific genes can also occur
93 during metacylogenesis (10,11).

94 Regarding the diagnosis of *T. cruzi* in vertebrate and invertebrate hosts,
95 molecular methodologies have been proposed as an alternative for an accurate
96 detection of *T. cruzi* infection, as well as making possible the examination of

97 degraded or small volumes samples. DNA-based PCR methods for *T. cruzi*
98 detection in different biological samples have shown greater sensitivity,
99 specificity, and reproducibility than the examination through optical microscopy,
100 considered the classic method of analysis (12,13). Therefore, PCR or qPCR
101 assays are useful for qualitative or quantitative diagnosis for Chagas disease and
102 genotyping parasite diversity to monitor the distribution of *T. cruzi* DTUs in
103 different endemic regions (14).

104 Currently, there has been interest in distinguishing DNA and RNA
105 amplification signals of several pathogens for viability assessment (Hellyer et al.,
106 1999; Schneider et al., 2005; Van Der Meide et al., 2005; Norouzi et al., 2016),
107 specially due to the established short half-life of RNA molecules after cell death
108 compared to DNA molecules (15,16). However, a recurring question regarding
109 the quantification of *T. cruzi* through its DNA detection extends to the fact that it
110 is not clearly elucidated if the presence of DNA is related to the detection of viable
111 infectious parasites. In this context, developing a highly sensitive molecular assay
112 can offer significant advantages such as rapid identification and quantification of
113 *T. cruzi* viability. Furthermore, analyzing parasite viability may contribute to better
114 investigations of the parasite infection dynamics in invertebrate hosts and vector
115 competence. It can also contribute to quality surveillance of commercialized food,
116 since testing food samples for viable *T. cruzi* can add to a better understanding
117 and control of oral transmission outbreaks.

118 In the present study, we developed and standardized a Real-Time PCR with
119 Reverse Transcription (RT-qPCR) to determine *T. cruzi* viability in *R. prolixus*
120 samples. Moreover, we aimed to assess differences between the amplification
121 signals of DNA and mRNA on a *T. cruzi* colonization kinetics in experimentally

122 infected *R. prolixus*. Thus, it was possible to analyze the potential of parasite's
123 RNA as a molecular viability marker in parasite-vector interaction.

124

125 **Methods**

126 ***Trypanosoma cruzi* culture**

127 Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* from DTUs I to VI
128 subpopulations, represented by Dm28c (TcI), Y (TcII), INPA 3663 (TcIII), INPA
129 4167 (TcIV), LL014 (TcV) and CL (TcVI), were obtained from Coleção de
130 Protozoários da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil (Fiocruz,
131 COLPROT, <http://www.colprot.fiocruz.br>). Epimastigotes forms were maintained
132 and grown in brain heart infusion (BHI) medium (Sigma-Aldrich) containing hemin
133 and supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum at 28°C for 4
134 days to reach late-log growth phase. Parasites were harvested by centrifugation
135 (3000× g for 10 min at room temperature), washed three times with 0.15 M NaCl,
136 0.01 M phosphate buffer pH 7.2 (PBS), prior to insect infection and DNA
137 extraction. The number of parasites was determined by counting in a Neubauer
138 hemocytometer using an optical microscope and expressed as parasites/mL.

139 The isolation of Dm28c (TcI) trypomastigote and amastigote forms was
140 carried out using VERO cells (17,18). Briefly, cell cultures were infected with
141 mice-derived bloodstream trypomastigotes, in a 10:1 parasite/host cell ratio.
142 Meanwhile, infected cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.
143 After 5–6 days, the supernatant was collected, centrifuged at 500 ×g for 10 min,
144 and held for 30 min at 37°C for the migration of trypomastigotes into the
145 supernatant. The amastigotes were recovered in the pellet.

146

147 **Preparation of *T. cruzi* lysates**

148 1 x 10⁶ *T. cruzi* epimastigotes/mL were harvested by centrifugation as
149 previously described, and lysates were prepared by immersing the samples in
150 boiling water for 20 minutes. After cooling, parasite lysates were maintained at
151 28°C and 300 µL aliquots were taken at different time points post-lysis (0, 1, 2
152 and 3 days after lysis) for further use in DNA extraction and RNA extraction. The
153 presence of living parasites was examined under light microscopy at a 200X
154 magnification.

155

156 ***Rhodnius prolixus* maintenance, feeding and infection**

157 *R. prolixus* were reared and maintained in an insectary at Laboratório de
158 Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de
159 Janeiro, under controlled temperature and humidity conditions. For the
160 experiments, fifth instar nymphs starved for more than 30 days were chosen and
161 then fed with defibrinated rabbit blood in an artificial apparatus (19). Only fully
162 engorged insects were selected for the assays.

163 *T. cruzi* infection was evaluated during three independent feedings using
164 rabbit blood containing the epimastigote forms of the parasite (1 x 10⁷ *T. cruzi*
165 Dm28c clone/mL). These three biological replicates were performed 30 days
166 apart between them. Parasite quantification (detailed below) was analyzed in two
167 experimental replicates through three different methods, reverse transcription
168 quantitative PCR (RT-qPCR), quantitative PCR (qPCR) and counting on
169 Neubauer chamber under an optical microscope. The entire digestive tract of *R.*

170 *prolixus* was dissected, separated in a pool (n=5) and analyzed on days 5, 9, 15
171 and 29 after feeding. Moreover, the anterior midgut (AM), posterior midgut (PM)
172 and hindgut (H) of infected *R. prolixus* were also dissected, separated in a pool
173 (n=5) and analyzed on different days after feeding

174 To validate our protocol and exclude the possibility of contamination, a
175 control experiment was performed with non-infected insect group fed on
176 uninfected blood.

177

178 **Quantitative multiplex real-time PCR (qPCR) assays**

179 Each pool, containing the corresponding of 5 digestive tracts of dissected
180 triatomines, were pretreated for 2 h at 56 °C with 100 µl lysis buffer containing 10
181 mM Tris-HCl (pH 9.2), 1 mM EDTA and 150 µg/ml proteinase K (Sigma-Aldrich,
182 St. Louis, MO, USA). DNA was purified from the lysate using QIAamp DNA mini
183 kit (Qiagen, Hilden, Germany) and resuspended from the silica column in a final
184 volume of 100 µL of elution buffer from the kit (20). DNA was stored at – 20 °C
185 until further analysis. Multiplex qPCR reactions were carried out in a final volume
186 of 20 µl, containing 2 µl DNA (8–10 ng), 2x FastStart TaqMan® Probe Master Mix
187 (Roche applied science, Mannheim, Germany), 600 nM cruzi1/cruzi2 primers and
188 250 nM Cruzi3 probe (FAM/NFQ-MGB) targeting *T. cruzi* nuclear satellite DNA
189 (SAT-DNA), 300 nM P2B primer, 500 nM P6R primer and 150 nM Triat Probe
190 (VIC/NFQ-MGB) (Applied Biosystems) targeting the 12S ribosomal subunit gene
191 of triatomines (18,20,21). Sequences of both sets of primers and probes are
192 presented in **Table 1**. The cycling conditions were as follows: 50 °C for 2 min, 95
193 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 58 °C for 1 min.
194 Amplifications were performed in the ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems).

195 Standard calibration curves for *T. cruzi* and triatomine targets were constructed
196 by serially diluting total DNA obtained from non-infected triatomine intestine
197 samples spiked with 10^6 *T. cruzi* epimastigotes (Dm28c clone, TcI). The resulting
198 DNA was serially diluted to a range of 10^6 to 0.5 *T. cruzi* equivalents and 5 to
199 0.002 triatomine intestine unit equivalents.

200

201 ***In silico* analysis of TcGAPDH primers specificity**

202 The oligonucleotides designed to the *T. cruzi* GAPDH gene (TcGAPDH,
203 Silva-Gomes et al., 2014) that code for the protein glyceraldehyde-3-phosphate
204 dehydrogenase (Table 1) were evaluated *in silico* for their specificity. A primer-
205 BLAST search using the sequences of the TcGAPDH oligonucleotides in the
206 “Refseq mRNA” set of the NCBI database was performed with no organism name
207 or group indicated. The primer specificity stringency allowed was at least 2 total
208 mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last
209 5 base pairs at the 3' end.

210

211 **Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) assays**

212 Total RNA from samples were extracted using TRIzol (Life Technologies,
213 USA) and RNeasy Mini Kit (QIAGEN, USA), a system that combines methods
214 of purification using a monophasic solution of phenol and guanidine
215 isothiocyanate (TRIzol) and silica-membrane RNeasy spin columns (RNeasy
216 Mini Kit, QIAGEN, USA). RNA quantity and purity were estimated by
217 spectrophotometry at 260/280/230 nm.

218 Prior to reverse transcription, the purified RNA was pretreated with
219 Amplification Grade Dnase I kit (Sigma-Aldrich, USA) to remove any contaminant

220 DNA. Synthesis of cDNA was carried out with a Superscript III First-strand
 221 System (Invitrogen, USA) using 5µL of RNA (not normalized by the mass)
 222 following the manufacturer's protocol for cDNA synthesis with random primer. No
 223 RT controls (-RT controls) were included in all cDNA synthesis.

224 RT-qPCR Real-time assays were performed in ABI Prism 7500 fast
 225 sequence detection system and reactions were carried out in a final volume of 20
 226 µL, containing 2 µL cDNA, Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied
 227 Biosystems, USA) 300 nM TcGAPDH Fw and 300 nM TcGAPDH Rv, targeting *T.*
 228 *cruzi* GAPDH constitutive gene (Silva-Gomes et al., 2014); 300 nM P2B and 300
 229 nM P6R (Moreira et al., 2017), which is the same primer set targeting the 12S
 230 ribosomal subunit gene of triatomines used in the present paper to detect
 231 triatomine DNA. **Table 1** presents sequences of both sets of primers and probes.
 232 The conditions for the RT-qPCR were as follows: 95°C for 10 minutes, followed
 233 by 45 cycles at 95°C for 15 seconds and 62°C for 1 minute. To monitor the
 234 specificity of the primers, a melting curves analysis was carried out after each
 235 experiment, resulting in a single peak for each target. Standard calibration curves
 236 for viable parasites were constructed by serially diluting cDNA obtained from non-
 237 infected triatomine intestine samples spiked with 10⁶ *T. cruzi* epimastigotes. The
 238 curve consists of a serially dilution ranging from 10⁶ to 0.5 viable *T. cruzi*
 239 equivalents and 5 to 0.002 triatomine intestine unit equivalents.

240

241 Table 1. Primer sets and probes sequences for qPCR and RT-qPCR assays

Targets	Primers/ Probes	Sequences	Amplicon size	References
<i>T. cruzi</i> satellite DNA (Sat- DNA)	Cruzi 1 (Forward)	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA	165 bp	(21)
	Cruzi 2 (Reverse)	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA		
	Cruzi 3 (Probe)	FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB		

Triatomine 12S rRNA	P2b (Forward) P6R (Reverse) Triat (Probe)	AAAGAATTTGGCGGTAATTTAGTCT GCTGCACCTTGACCTGACATT VIC-TCAGAGGAATCTGCCCTGTA-NFQ- MGB	163 bp	(20)
<i>T. cruzi</i> GAPDH	TcGAPDH Fw (Forward) TcGAPDH Rv (Reverse)	GTGCGGCTGCTGTCAACAT AAAGACATGCCCGTCAGCTT	100 bp	(18)

242

243 **Statistical analyses**

244 All experiments were performed at least in biological triplicates and
 245 experimental duplicates and data are reported as quantity mean \pm standard
 246 deviation. All statistical tests were conducted using the Sigmaplot Windows
 247 program version 13.0 (Systat Software, Inc., California, USA). Student's t test or
 248 Mann-Whitney Rank-Sum test was adopted to analyze the statistical significance
 249 of the apparent differences, according to the parametric or non-parametric
 250 distribution of the data. A p-value less than 0.05 was considered statistically
 251 significant ($p < 0.05$). Three correlation analysis between RT-qPCR and
 252 microscopy, qPCR and microscopy, and qPCR and RT-qPCR techniques were
 253 evaluated using Pearson Product-Moment Correlation (or Pearson Correlation
 254 Coefficient), with a range of values from ± 1.0 .

255

256 **Results**

257 Firstly, we developed and standardized a molecular methodology able to
 258 detect and quantify *T. cruzi* mRNA in triatomine samples. A good specificity and
 259 no dimer formation for both set of primers can be observed, after the amplification

260 phase, in the melting curve test (**Figure S1**). For the absolute quantification of
261 viable parasites, through RT-qPCR, *T. cruzi* GAPDH (TcGAPDH) was selected
262 as a target, since it is a housekeeping gene expressed constitutively in all parasite
263 evolutive stages and in all the six DTUs (**Figure 1**), which can be observed by
264 the similarity of Ct values among the samples. In the samples from epimastigotes
265 of the 6 DTUs, the mean Ct value was 15.06, with 0.60 of standard deviation. In
266 the samples from different evolutive forms (Dm28c amastigotes, epimastigotes
267 and trypomastigotes) the mean Ct value was 19.08, with 0.16 of standard
268 deviation. No significant statistical difference was observed in any comparison.
269 In addition, the TcGAPDH primers specificity to the *T. cruzi* GAPDH target
270 amplification was analyzed *in silico*, as described in Material and Methods
271 section. The Primer-Blast search, using the sequences of the TcGAPDH
272 oligonucleotides in the “Refseq mRNA” set of the NCBI database (with no
273 organism limitation), revealed that the TcGAPDH primers amplifies only for the
274 *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (XM_808702.1,
275 XM_807045.1, XM_029379878.1), always generating a 100 bp PCR product. No
276 unintended PCR products, of any size, were identified in this analysis.

277 **Figure 1. Evaluation of TcGAPDH as a housekeeping gene for RT-qPCR**
278 **assays.** As endogenous housekeeping reference gene, *T. cruzi* GAPDH gene
279 was evaluated in different *T. cruzi* strains, belonging to DTU I to VI (A) and in
280 different evolutive forms (B). PCR assays were in triplicate, and data were pooled.

281 Following our methodology, detection of *T. cruzi* cDNA was linear from 10^7
282 to 10^2 parasite equivalents (**Figure 2a**). Under these conditions, it was possible
283 to obtain a high coefficient of determination ($R^2 = 0.99$) for TcGAPDH RT-qPCR.
284 Moreover, triatomine cDNA detection was linear, ranging from 3 to 0.0032

285 intestine unit equivalents (**Figure 2b**) and the R^2 was 0.99 for triatomine 12S
 286 rRNA gene RT-qPCR (**Table 2**). The results confirmed the improved performance
 287 of the methodology for both targets, with good sensitivity and specificity, and able
 288 to detect and quantify parasite mRNA in samples containing triatomines.

289 **Figure 2. Reportable Range for detection and quantification of viable *T.***
 290 ***cruzi* in *Rhodnius prolixus* digestive tube by real-time RTqPCR.** The Table 2
 291 indicates the standard curve parameters of the assays performed with distinct set
 292 of primers. Ten-fold serial dilutions of cDNA were used to generate the standard
 293 curve for each target. (A) Linearity ranging from 106 to 10 parasite equivalentes,
 294 for the Tc-GAPDH target (B) Linearity ranging from 3 to 0.0032 triatomine
 295 equivalentes, targeting the gene correspondent to the 12S region of the ribosomal
 296 RNA of triatomines.

297

298 Table 2. Standard curve parameters with distinct set of primers

Primers	Linear Coefficients ^[1]		r^2 ^[2]	Amplification Efficiency (%)
	Slope	Intercept		
A.TcGAPDH	-3,32	39,71	0,99	100,3
B.Triatomine 12S rRNA	-3,26	13,23	0,98	102,8

299 [1] Linear coefficients from $y = ax + b$, where a is the slope and b is the intercept;

300 [2] Standard curves coefficient of determination.

301

302 In order to investigate if RNA is a potential molecular marker to assess *T.*
 303 *cruzi* viability, we compared the ability of the TcGAPDH RT-qPCR assay to detect
 304 viable *T. cruzi* cells with a TaqMan qPCR multiplex assay previously developed
 305 to quantify genomic DNA of triatomines infected with *T. cruzi*. In **figure 3**, the time
 306 during which both molecules can be detected in samples containing live parasites

307 (control group) and in samples containing heat-treated lysed *T. cruzi* (lysate
308 group) was investigated. When parasite load was evaluated using qPCR (**Figure**
309 **3a**) we observed that DNA detection remains stable for the lysate group over a
310 period of days (0 – 3 days of incubation), while the control group demonstrated a
311 statistically significant increase in DNA detection over the same period of days.
312 At the same time, parasite load assessed by RT-qPCR (**Figure 3b**) demonstrated
313 no TcGAPDH mRNA detection for the lysate group over days of incubation, as
314 the control group showed an increase in TcGAPDH mRNA during the same
315 period of days. In comparison, we used light microscopy to assess *T. cruzi* growth
316 since live and lysed parasites were placed in a culture medium over the days
317 after lysis to evaluate parasites survival and viability of these two groups (**Figure**
318 **3c**). The results of RT-qPCR agreed with microscopic examination, in which both
319 were negative, in all days of incubation, for the lysate group, while the results of
320 qPCR were positive.

321

322 **Figure 3. Comparison between DNA and RNA detection of viable and non-**
323 **viable *T. cruzi* samples.** A) Quantification of *T. cruzi* DNA by qPCR; B)
324 Quantification of *T. cruzi* RNA by RT-qPCR; C) *T. cruzi* quantification by
325 microscopical examination in a growth curve, with parasite counting using a
326 NEUBAUER Chamber. The control group (black circles) corresponds to the heat
327 untreated parasites and the lysate group (red squares) corresponds to the
328 heated-treated parasites. Data represent analysis from an experiment with n = 3.
329 Data were analyzed using student t-test. *p<0,05.

330

331 As the parameters for quantifying the parasite load were defined by DNA
332 and RNA detection, we assessed the parasite load of *R. prolixus* experimentally
333 infected with *T. cruzi* (**Figure 4**). The entire digestive tract of the insects was
334 dissected, and parasite load was analyzed, by qPCR and RT-qPCR, and
335 normalized by the amount of triatomine DNA or cDNA present in each sample. In
336 addition, quantification using these molecular methodologies were correlated with
337 parasite counting under optical microscopy. When we performed Pearson's
338 correlation coefficient analysis, it was not possible to establish a statistical
339 association between RT-qPCR and microscopy, qPCR and microscopy, and
340 qPCR and RT-qPCR methodologies ($P > 0.050$). In other words, differences in
341 the results obtained between molecular quantification and microscopic
342 examination were ascertained, and they suggested the sensitivity of both qPCR
343 and RT-qPCR concerning the parasite quantification over optical microscopy. As
344 it is possible to observe in **Figure 4a**, the parasite loads, estimated by counting
345 with Neubauer chamber, were lower when compared to the other two
346 methodologies. On the other hand, when comparing the quantification results
347 obtained by qPCR and RT-qPCR, we observed that both showed a decrease in
348 the parasite load on day 9 after feeding. However, the RNA detection (**Figure 4b**)
349 showed a more pronounced decay in the parasite amount on day 9 to day 15
350 after feeding. Meanwhile, *T. cruzi* DNA (**Figure 4c**) did not change significantly
351 from day 9 to day 15 after feeding. In addition, the quantification of mRNA on
352 days 15 and 29 are lower than the values observed, on the same days, by DNA
353 quantification.

354

355 **Figure 4. Comparison between three methods for parasite load**
356 **quantification from insect samples under increasing periods after feeding.**

357 A) Microscopical examination, with parasite counting using a Neubauer Chamber;
358 B) Quantification of *T. cruzi* RNA by RT-qPCR; C) Quantification of *T. cruzi* DNA
359 by qPCR. Analysis (n=3) from a pool of 5 digestive tubes of *R. prolixus* under
360 increasing periods after feeding. Data were analyzed using student t-test.
361 *p<0,05.

362

363 In order to characterize the infection dynamics, we also assess the
364 parasite load in different segments of triatomines digestive tracts. *T. cruzi*
365 quantification was assayed through mRNA detection and normalized according
366 to the amount of triatomine RNA present in each sample (**Figure 5**). The mRNA
367 quantification results revealed that *T. cruzi* endures in the PM without showing
368 statistically significant differences between the days. In AM segment, there is an
369 increase of the parasite load from day 5 to day 9, followed by a tendency to
370 diminution of the parasite load, from the day 15. Lastly, this parasite load
371 reduction only becomes statistically significant on day 29 after feeding. On the
372 other hand, in the hindgut portion, a statistically significant increase of the
373 parasite load is observed gradually from day 5 to day 29 after feeding. It is
374 noteworthy that, concomitantly to the increase in the number of parasites from
375 the hindgut over the days, *T. cruzi* population from the AM decreased significantly
376 from day 5 to day 29 after feeding.

377

378 **Figure 5. Quantification of viable parasite load by RT-qPCR in different**
379 **portions of the digestive tract from *R. prolixus* experimentally infected.**

380 Follow-up of parasite development in a pool of 5 anterior midguts (AM), 5
381 posterior midguts (PM) and 5 hindguts (H) of *R. prolixus* under increasing periods
382 after feeding. Each time point represents three independent experiments (n=3).
383 Data were analyzed using student t-test. *p<0,05 and **p<0,01.

384

385 **Discussion**

386 The classical method to evaluate *T. cruzi* natural infection in triatomines is
387 the microscopical examination of dissected intestinal contents. However, it is a
388 laborious and time-consuming procedure that may generate inconclusive and
389 discordant results (22). Thereby, molecular diagnostic tests have been developed
390 in the last years for rapid detection and quantification of *T. cruzi* DNA in different
391 biological samples (14).

392 Regarding qPCR-based triatomine infection rates may be underestimated
393 due to digestive-derived products co-purified with DNA and can inhibit further
394 qPCR reaction affecting its efficiency (23). The use of an internal amplification
395 control is important to avoid false-negative results, which can occur with highly
396 complex material (13,24,25), and to correct and normalize DNA variations
397 between samples that are subject to differences in size between species (20).
398 Previous studies have used housekeeping genes of *R. prolixus* (26) and
399 exogenous heterologous sequences (27) as internal normalization of triatomine
400 samples. To estimate the parasite load in *R. prolixus* we utilized a precise
401 multiplex TaqMan qPCR technique, targeting the 12S subunit ribosomal RNA

402 gene as an internal control (20). The triatomine 12S rRNA target was chosen for
403 the present study since it was previously demonstrated by Moreira et al. (2017)
404 that DNA from different triatomine species presented amplification signal with no
405 significant difference between the adults of all the species analyzed. And even
406 though the triatomine 12s rRNA target was tested only with *R. prolixus* for RT-
407 qPCR standardization herein, it is important to validate the RNA quantification
408 technique testing the 12S subunit ribosomal RNA gene with other triatomine
409 species and nymphs from all developmental stages in the future.

410 Although DNA amplification methods have been largely reported (28),
411 PCR by itself does not differentiate between live and dead parasites due to the
412 high stability of DNA and its persistence following parasite death (15,29–31).
413 Presently, our results showed that *T. cruzi* DNA detection remained stable over
414 3 days after cell lysis, while parasite load assessed by RT-qPCR demonstrated
415 no amplification for the lysate group. Supporting our results, it has been
416 previously observed that DNA of *Leishmania* parasites can remain detectable in
417 scars of cutaneous leishmaniasis patients' months after considering clinical cure
418 (32,33). Zhang and Tarleton (1999) reported that kDNA signal was detectable in
419 mice injected with *T. cruzi* kDNA (Brazil and Sylvio X10/4) after 2 days post-
420 injection. Besides that, De Oliveira et al. (2019) showed that açai samples
421 experimentally contaminated with DNA from non-viable parasites was detectable
422 for hours after the loss of viability and they also observed a rapid degradation of
423 *T. cruzi* mRNA after açai samples were submitted to sanitization and heat
424 treatment. Moreover, De Oliveira et al. (2021) compared DNA and RNA based
425 PCR amplifications in inoculated açai juice and fruits that were pasteurized and
426 blanched, although there was not an internal amplification control included in

427 neither the qPCR nor RT-qPCR, which is important to avoid false-negative results
428 and detect variations between highly complex samples. As demonstrated in the
429 present study, De Oliveira et al. (2021) also observed differences between both
430 molecular methodologies, in which qPCR revealed the presence of amplification
431 signals after heat treatment whereas RT-qPCR no amplification signal in samples
432 under same conditions (36).

433 Alternative molecular methods using the pathogen's RNA to discriminate
434 between live or dead parasites have been reported (15,29,37–39). However, until
435 now, few reports are comparing the application of molecular diagnostic tools that
436 effectively differentiate between viable and non-viable parasites, especially when
437 it comes to *T. cruzi* evaluation. Therefore, we developed and standardized a RT-
438 qPCR using *T. cruzi* mRNA as a suitable marker to evaluate viable parasites load
439 in triatomines. Regarding *T. cruzi* viability, this study confirmed that, while RNA
440 is shortly degraded after parasite lysis, DNA can endure a longer time circulating
441 and therefore a positive result does not necessarily indicate living parasites.

442 As reported in previously published studies (22,27), we observed that both
443 RT-qPCR and qPCR were able to detect small quantities of parasites in the
444 digestive tract, while microscopic examination could only count those insects with
445 higher parasite loads (over 10^4 parasites/mL). Besides that, due to the dark color
446 of the examined content, there were difficulties in parasites visualization and
447 counting on days 5 and 9 after feeding.

448 *T. cruzi* interactions along the digestive tract depend on several
449 parameters such as insect vector species, the nature of the gut microbiota, and
450 antimicrobial factors (10,40). Furthermore, the strain or lineage of *T. cruzi* can
451 contribute to a vector's susceptibility, since different strains of the infecting

452 parasite can maintain different levels of triatomine infection (10,41). Our data on
453 *T. cruzi* (Dm28c) kinetics in *R. prolixus* showed that, despite the significant
454 differences in the parasite load between DNA and RNA quantification
455 methodologies, both parasite load curves exhibited a similar profile over the days,
456 with a reduction of the parasite load. Henriques et al. (2012) also reported this
457 parasite load profile from the second week after *R. prolixus* infection with *T. cruzi*
458 labeled with luciferase (Dm28c-luc). Nevertheless, our data showed a statistically
459 significant reduction in mRNA amount, which occurs more rapidly than the
460 parasite load decrease observed through DNA detection.

461 Results concerning mRNA quantification in different portions of *R. prolixus*
462 digestive tract agreed with previous studies that assessed the parasite load
463 through bioluminescence imaging or DNA-based assays (26,27,42). These
464 results, about kinetics of *T. cruzi* (Dm28c) colonization in *R. prolixus* digestive
465 tract, demonstrate that a significant portion of these parasites is lysed during early
466 stages of infection. This lysis takes place in the anterior midgut portion of the
467 digestive tract, the first interaction point between the ingested *T. cruzi* with
468 bacteria of the microbiota present on the surface of the vector's digestive tract
469 (43,44). After that, the remaining parasites migrate to the posterior midgut where
470 they can attach to it and epimastigotes forms will proliferate (45,46). Once *T. cruzi*
471 reach the hindgut, these replicate forms differentiate into infective metacyclic
472 trypomastigotes which will be eventually released in the excreta (43,47). Taken
473 together, our results showed a constant parasite load in the PM of *R. prolixus*
474 and, while the population of viable parasites from the AM decreased significantly,
475 the number of viable parasites in the Hindgut concomitantly increased over the
476 days after feeding. According to Henriques et al. (2012), trypomastigote forms

477 were detected in the final portion of *R. prolixus* digestive tract from the third week
478 after feeding. The RT-qPCR developed herein is not able to differentiate between
479 trypomastigote and epimastigote forms with TcGAPDH target since its
480 expression is constitutive in all *T. cruzi* evolutive stages. However, based on
481 previous reports, and because *T. cruzi* metacyclogenesis process takes place in
482 the final portion of the triatomines digestive tract, we can estimate that the viable
483 parasite load observed in the hindgut corresponds mostly to metacyclic
484 trypomastigotes. Nevertheless, the development of a molecular method capable
485 of differentiating *T. cruzi* trypomastigotes and epimastigotes, through the
486 quantification of trypomastigote forms using stage-specific genes as targets, is
487 important to improve the diagnosis of infected triatomines, especially in studies
488 about vector competence.

489 This novel RT-qPCR methodology has potential application in viability
490 assessment and raises the possibility for further monitoring of the parasite load
491 in infected insects or studies related to vectorial capacity. Furthermore, the
492 analysis of parasite viability, by RT-qPCR could be an especially effective tool for
493 Chagas disease diagnostic purposes. It can contribute to better investigations of
494 parasite infection dynamics, vector competence and evaluation of trypanocidal
495 drugs. It can also contribute to food security, through the development of new
496 molecular assays for testing food samples for pathogens, helping in oral
497 infections studies or in outbreaks investigations.

498

499 **Acknowledgments**

500 Authors would like to thank to Instituto Oswaldo Cruz (IOC), the Network
501 of Technological Platforms from Fiocruz for supplying facilities and the
502 COLPROT/Fiocruz for supplying the *T. cruzi* reference strains used.

503

504 **References**

- 505 1. Organization WH. Chagas disease (also known as American
506 trypanosomiasis) [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 21]. Available from:
507 [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
508 [\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- 509 2. Coura JR, Viñas PA, Junqueira ACV. Ecoepidemiology, Short history and
510 control of chagas disease in the endemic countries and the new challenge
511 for non-endemic countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(7):856–62.
- 512 3. Dias JCP. Elimination of chagas disease transmission: Perspectives.
513 Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(SUPPL. 1):41–5.
- 514 4. Macedo AM, Pena SDJ. Genetic variability of Trypanosoma cruzi:
515 Implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitol Today.
516 1998;14(3):119–24.
- 517 5. Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR. The multiple and complex and
518 changeable scenarios of the Trypanosoma cruzi transmission cycle in the
519 sylvatic environment. Acta Trop [Internet]. 2015;151(1):1–15. Available
520 from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.018>
- 521 6. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira

- 522 MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature:
523 Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect*
524 *Genet Evol* [Internet]. 2012;12(2):240–53. Available from:
525 <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
- 526 7. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for
527 something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis
528 and drug sensitivity. *Acta Trop* [Internet]. 2018;184:38–52. Available from:
529 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
- 530 8. Jurberg J, Galvão C. Biology , ecology , and systematics of Triatominae (
531 Heteroptera , Reduviidae), vectors of Chagas disease , and implications
532 for human health 1. *Denisia*. 2006;50(19):1096–116.
- 533 9. Xavier SC das C, Roque ALR, Bilac D, de Araújo VAL, Neto SF da C,
534 Lorosa ES, et al. Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New
535 Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. *PLoS Negl*
536 *Trop Dis*. 2014;8(5).
- 537 10. Garcia ES, Genta FA, De Azambuja P, Schaub GA. Interactions between
538 intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends*
539 *Parasitol*. 2010;26(10):499–505.
- 540 11. Bayer-Santos E, Cunha-E-Silva NL, Yoshida N, Franco Da Silveira J.
541 Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins
542 during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasites and Vectors*.
543 2013;6(1):1–10.
- 544 12. Moser DR, Kirchhoff L V., Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi*

- 545 by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin*
546 *Microbiol.* 1989;27(7):1477–82.
- 547 13. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for
548 infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):550–76.
- 549 14. Schijman AG. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*
550 [Internet]. 2018;184:59–66. Available from:
551 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.019>
- 552 15. Romero I, Téllez J, Suárez Y, Cardona M, Figueroa R, Zelazny A, et al.
553 Viability and burden of *Leishmania* in extralesional sites during human
554 dermal leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(9).
- 555 16. Zeng D, Chen Z, Jiang Y, Xue F, Li B. Advances and challenges in
556 viability detection of foodborne pathogens. *Front Microbiol.*
557 2016;7(NOV):1–12.
- 558 17. Santos RF, Pôssa MAS, Bastos MS, Guedes PMM, Almeida MR,
559 DeMarco R, et al. Influence of ecto-nucleoside triphosphate
560 diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and
561 virulence. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(3).
- 562 18. Silva-Gomes NL, Ennes-Vidal V, Carolo JCF, Batista MM, Soeiro MN,
563 Menna-Barreto R, et al. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1
564 (TcNTPDase-1) gene expression is increased due to heat shock and in
565 infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasites and Vectors.*
566 2014;7(1):1–6.

- 567 19. Azambuja P, Garcia ES. Care and maintenance of triatomine colonies. In:
568 Crampton JM, Beard C Ben, Louis C, editors. *Molecular Biology of Insect*
569 *Disease Vectors: a methods manual*. 1st ed. Springer, Dordrecht; 1997.
570 p. 55–64.
- 571 20. Moreira OC, Verly T, Finamore-Araujo P, Gomes SAO, Lopes CM, De
572 Sousa DM, et al. Development of conventional and real-time multiplex
573 PCR-based assays for estimation of natural infection rates and
574 *Trypanosoma cruzi* load in triatomine vectors. *Parasites and Vectors*.
575 2017;10(1):1–14.
- 576 21. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et
577 al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi*
578 detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007;103(3):195–200.
- 579 22. Pizarro JC, Lucero DE, Stevens L. PCR reveals significantly higher rates
580 of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector,
581 *Triatoma infestans*: High rates found in Chuquisaca, Bolivia. *BMC Infect*
582 *Dis*. 2007;7:1–8.
- 583 23. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors -
584 occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012;113(5):1014–
585 26.
- 586 24. Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MFAD, Lima-Ferreira C,
587 Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR
588 to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic
589 Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial.

- 590 Acta Trop. 2013;125(1):23–31.
- 591 25. Ramírez JC, Cura CI, Da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N,
592 Velázquez E, et al. Analytical validation of quantitative real-time PCR
593 methods for quantification of trypanosoma cruzi DNA in blood samples
594 from chagas disease patients. J Mol Diagnostics [Internet].
595 2015;17(5):605–15. Available from:
596 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.010>
- 597 26. Nogueira NP, Saraiva FMS, Sultano PE, Cunha PRBB, Laranja GAT,
598 Justo GA, et al. Proliferation and differentiation of Trypanosoma cruzi
599 inside its vector have a new trigger: Redox status. PLoS One.
600 2015;10(2):1–16.
- 601 27. Dias F de A, Guerra B, Vieira LR, Perdomo HD, Gandara ACP, Amaral
602 RJV do, et al. Monitoring of the Parasite Load in the Digestive Tract of
603 Rhodnius prolixus by Combined qPCR Analysis and Imaging Techniques
604 Provides New Insights into the Trypanosome Life Cycle. PLoS Negl Trop
605 Dis [Internet]. 2015;9(10):1–23. Available from:
606 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004186>
- 607 28. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM,
608 et al. International study to evaluate PCR methods for detection of
609 Trypanosoma cruzi DNA in blood samples from Chagas disease patients.
610 PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(1).
- 611 29. Norouzi R, Dalimi A, Moghadam MF. Comparison of a Nucleic Acid
612 Sequence-based Amplification (NASBA) and real-time reverse

- 613 transcriptase PCR methods for detection of *Toxoplasma gondii* in rat
614 blood samples. *J Zoonotic Dis.* 2016;1(1):15–23.
- 615 30. Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of
616 *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol*
617 *Biochem Parasitol.* 1993;62(1):45–52.
- 618 31. Cancino-Faure B, Fisa R, Alcover MM, Jimenez-Marco T, Riera C.
619 Detection and quantification of viable and nonviable *trypanosoma cruzi*
620 parasites by a propidium monoazide real-time polymerase chain reaction
621 assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(6):1282–9.
- 622 32. Schubach A, Haddad F, Neto MPO, Degrave W, Pirmez C, Grimaldi G, et
623 al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of
624 treated human patients. *J Infect Dis.* 1998;178(3):911–4.
- 625 33. Mendonça MG, De Brito AEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML,
626 Abath FGC. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical
627 cure of american cutaneous leishmaniasis: Is there a sterile cure? *J Infect*
628 *Dis.* 2004;189(6):1018–23.
- 629 34. Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease
630 severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis.*
631 1999;180(2):480–6.
- 632 35. de Oliveira AC, Soccol VT, Rogez H. Prevention methods of foodborne
633 Chagas disease: Disinfection, heat treatment and quality control by RT-
634 PCR. *Int J Food Microbiol.* 2019;301(April):34–40.

- 635 36. de Oliveira AC, Thomaz-Soccol V, Tadra-Sfeir MZ, de Souza EM,
636 Crespo-Lopez ME, Rogez H. Preventing Chagas disease: A new RT-
637 qPCR method for rapid and specific quantification of viable *Trypanosoma*
638 *cruzi* for food safety. *Food Res Int.* 2021;144(March).
- 639 37. Van Der Meide WF, Schoone GJ, Faber WR, Zeegelaar JE, De Vries
640 HJC, Özbel Y, et al. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a
641 new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania*
642 parasites in skin biopsy samples. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5560–6.
- 643 38. Van Der Meide W, Guerra J, Schoone G, Farenhorst M, Coelho L, Faber
644 W, et al. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based
645 amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for
646 quantification of *Leishmania* parasites. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):73–8.
- 647 39. Payne RE, Wang F, Su N, Krell J, Zebrowski A, Yagüe E, et al. Viable
648 circulating tumour cell detection using multiplex RNA in situ hybridisation
649 predicts progression-free survival in metastatic breast cancer patients. *Br*
650 *J Cancer.* 2012;106(11):1790–7.
- 651 40. Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Gut microbiota and parasite
652 transmission by insect vectors. *Trends Parasitol.* 2005;21(12):568–72.
- 653 41. Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Differential in vitro and in
654 vivo behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and
655 hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol.* 1996;82(2):112–21.
- 656 42. Henriques C, Castro DP, Gomes LHF, Garcia ES, De Souza W.
657 Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection in *Rhodnius*

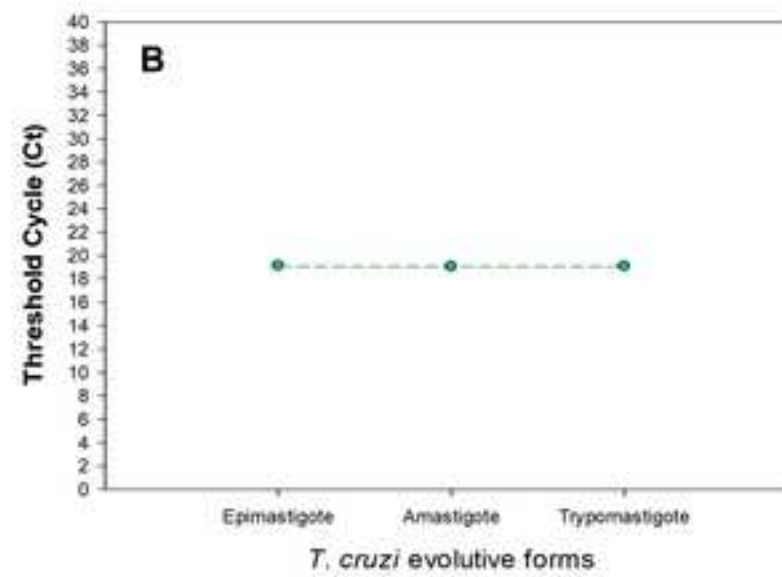
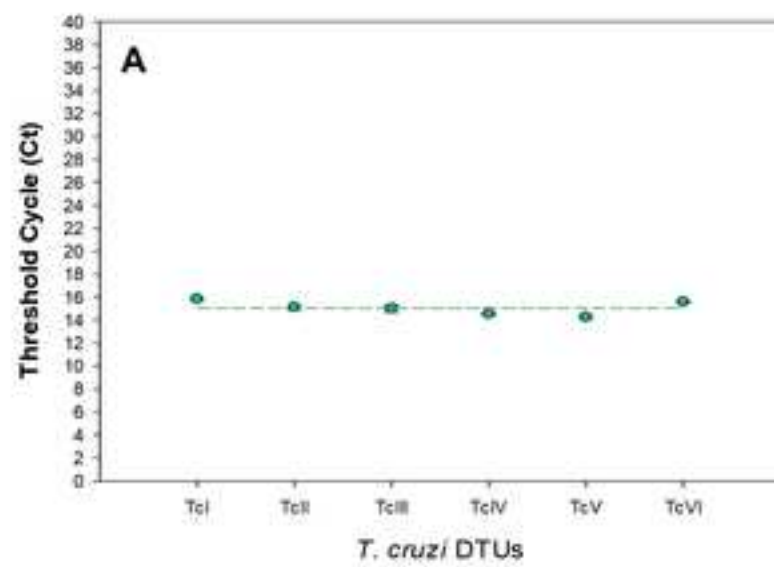
- 658 prolixus. *Parasites and Vectors*. 2012;5(1):1–15.
- 659 43. Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in
660 triatominae. *Parasitol Today*. 2000;16(9):381–7.
- 661 44. Ferreira RC, Kessler RL, Lorenzo MG, Paim RMM, Ferreira LDL, Probst
662 CM, et al. Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi*
663 involves an extensive parasite killing. *Parasitology*. 2016;143(4):434–43.
- 664 45. Alves CR, Albuquerque-Cunha JM, Mello CB, Garcia ES, Nogueira NF,
665 Bourguignon SC, et al. *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar
666 membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol*.
667 2007;116(1):44–52.
- 668 46. Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P.
669 Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma*
670 *cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol*. 2007;53(1):11–21.
- 671 47. Schaub GA. Interactions of Trypanosomatids and Triatomines. Vol. 37,
672 Advances in Insect Physiology. 2009. 177–242 p.

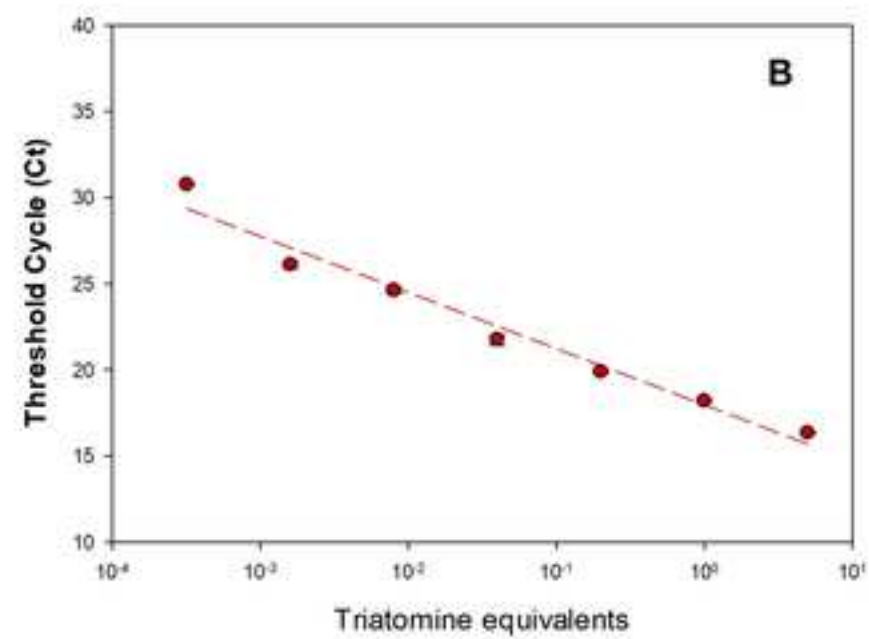
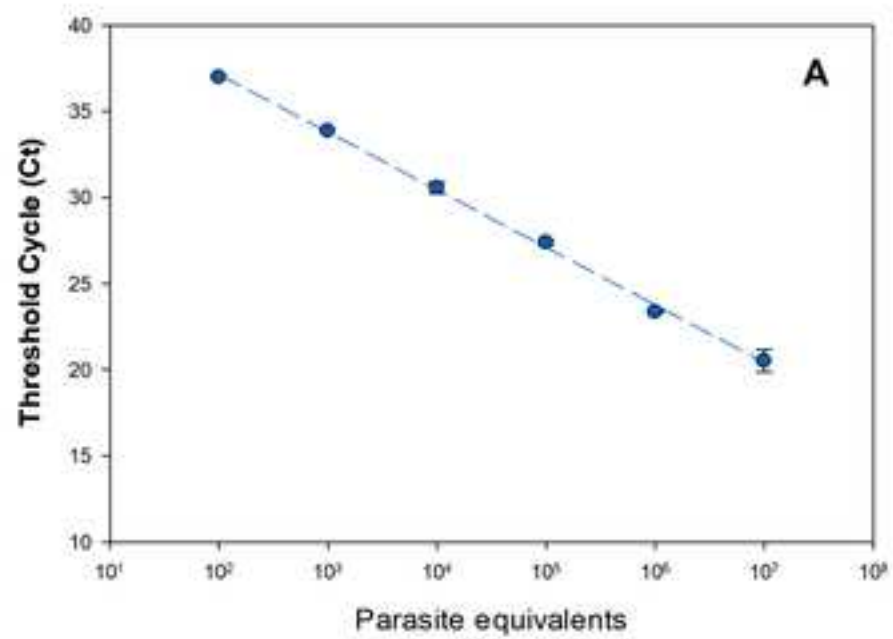
673

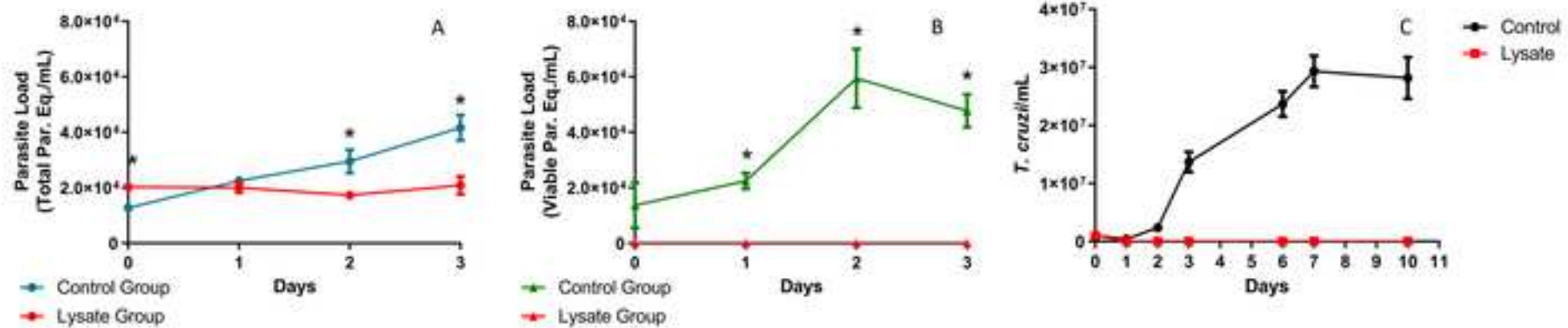
674 **Supporting information**

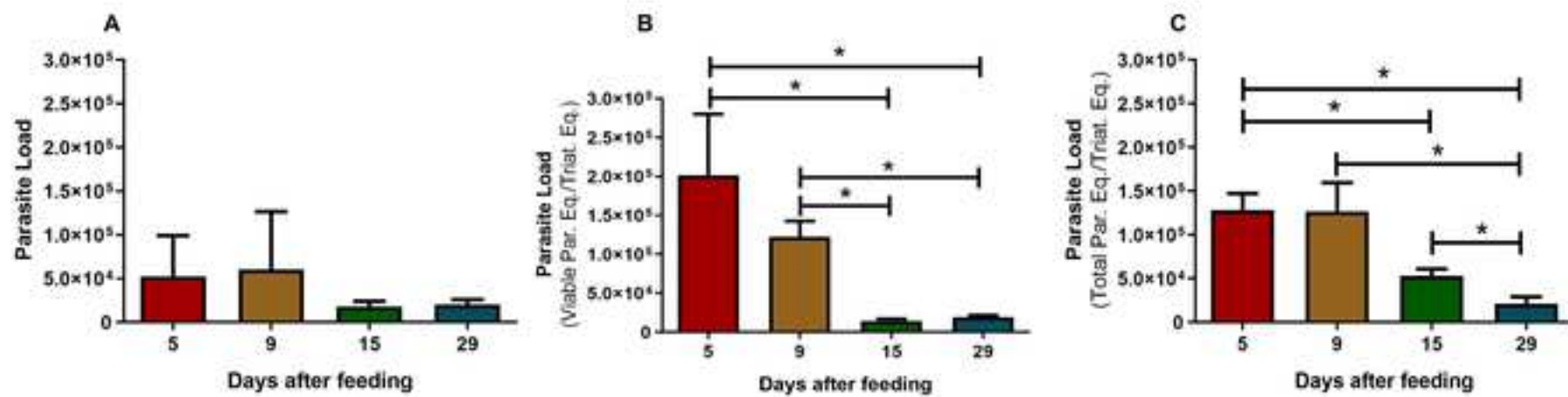
675 **Figure S1. Representative amplification plots and melting curves for RT-**
676 **qPCR assays.** Assays were performed using cDNA of a pool of 3 *R. prolixus*
677 digestive tubes spiked with 10^5 *T. cruzi*, of a pool of 3 non-infected *R. prolixus*
678 digestive tubes and of a positive control containing 10^5 *T. cruzi* (Dm28c
679 epimastigotes) solely. (A-B) Amplification plot and melt curve for TcGAPDH

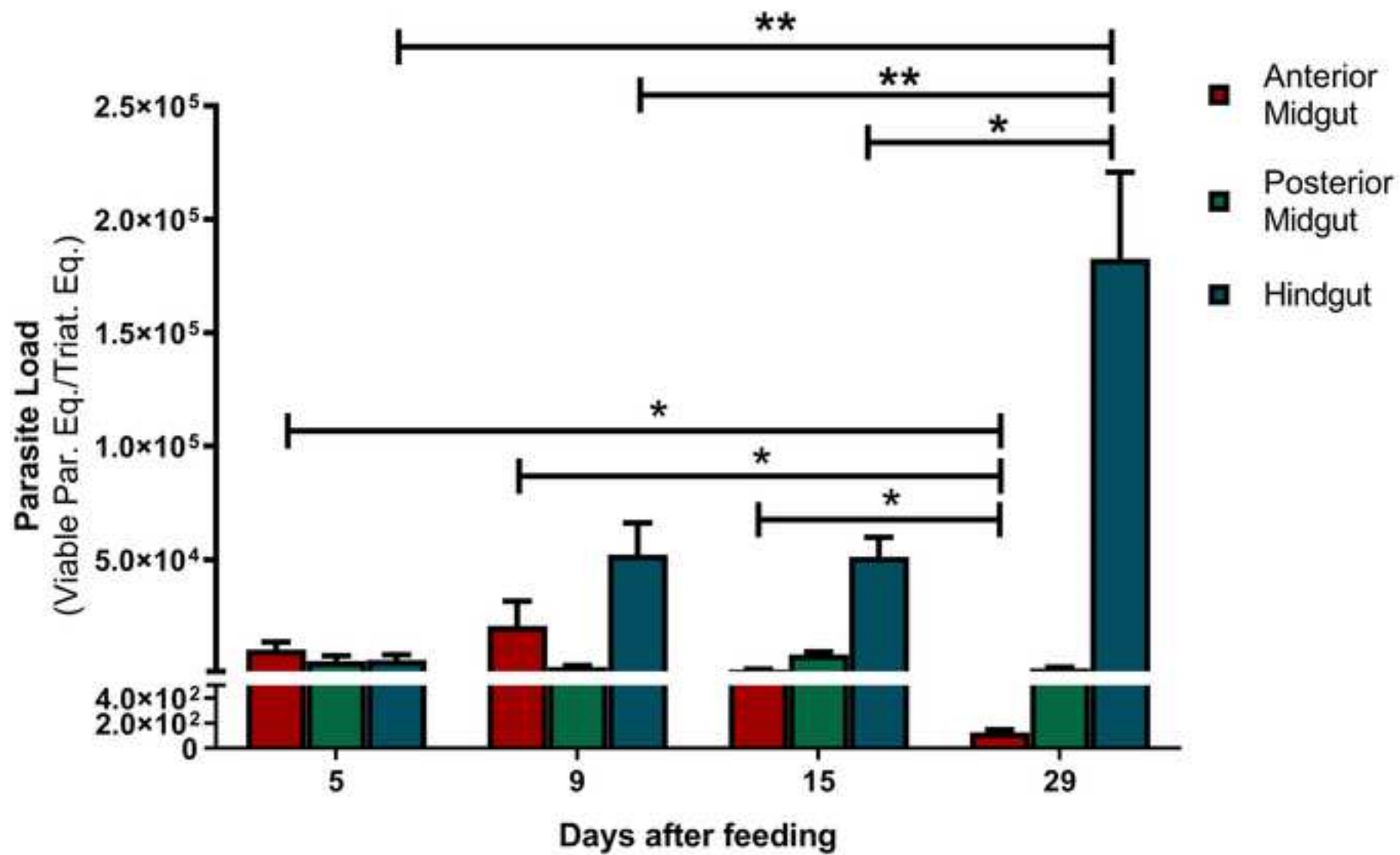
680 target. The arrows indicate the Negative Template Control (NTC) and the
681 specificity of the primers since there was no amplification for non-infected *R.*
682 *prolixus* sample. (C-D) Amplification plot and melt curve for the gene
683 correspondent to the 12S region of the ribosomal RNA of triatomine. The arrows
684 indicate the NTC and the specificity of the primers since there was no
685 amplification a positive control sample corresponding 10^5 *T. cruzi* equivalents/mL.
686 No RT controls (-RT controls) were included in all assays. All primers sets
687 generated a single product peak, proving their specificities. (E-F) Amplification
688 plots in linear scale to the TcGAPDH and 12S region of the ribosomal RNA,
689 respectively, evidencing the ΔR_n values (Y-axes) for each curve.

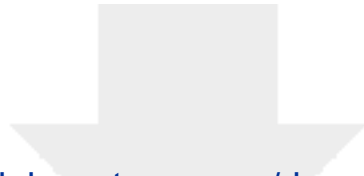












Click here to access/download
Supporting Information
Figure S1 PACE Corrected.tif

