

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

**JULIANA BOAVENTURA AVELAR**

**Caracterização molecular de isolados de  
*Trypanosoma cruzi* obtidos de  
mulheres durante a fase crônica da doença  
de Chagas**

Orientadora:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria de Castro

Colaboradora:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliane Lages Silva

Dissertação de Mestrado

Goiânia-GO, 2008



**Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**     **Dissertação**     **Tese**

**12. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor(a):	Juliana Boaventura Avelar				
CPF:	779942645-49	E-mail:	jubavelar@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não					
Vínculo Empregatício do autor					
País:	Brasil	UF:GO		CNPJ:	
Título:	Caracterização molecular de isolados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtidos de mulheres durante a fase crônica da doença de Chagas				
Palavras-chave:	Doença de Chagas, caracterização molecular e mulheres				
Área de concentração:	Parasitologia				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	29/02/2008				
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública				
Orientador(a):	Ana Maria de Castro				
CPF:	33108650106	E-mail:	Amaria.ana@gmail.com		
Co-orientador(a):	Eliane Lages Silva				
CPF:		E-mail:			

**3. Informações de acesso ao documento:**

Liberação para disponibilização?¹     total     parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: \_\_\_\_\_

Outras restrições: \_\_\_\_\_

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação. Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

\_\_\_\_\_ do(a) autor(a)

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

**Juliana Boaventura Avelar**

**Caracterização molecular de isolados de  
*Trypanosoma cruzi* obtidos de  
mulheres durante a fase crônica da doença  
de Chagas**

Dissertação submetida ao PPGMT/UFG  
como requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre, área de concentração de  
Parasitologia

**Orientadora:**

**Profª Drª Ana Maria de Castro**

**Colaboradora:**

**Profª Drª Eliane Lages Silva**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(GPT/BC/UFG)

**Avelar, Juliana Boaventura.**

**A949c** **Caracterização molecular de isolados de *Trypanosoma cruzi* obtidos de mulheres durante a fase crônica da doença de Chagas / Juliana Boaventura Avelar. – 2008.**

**xvii, 69f. : figs., tabs., qds.**

**Orientadora: Profª. Drª. Ana Maria de Castro, Colaboradora:**

**Profª Drª Eliane Lages Silva.**

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás.**

**Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2008.**

Bibliografia: f.55-67.

**Inclui listas de abreviaturas, quadros e de figuras.**

**Anexos.**

1. Doenças de Chagas – Mulheres 2. Doença de Chagas -  
Caracterização molecular 3. *Trypanosoma Cruzi*. I. Castro, Ana  
Maria II. Silva, Eliane Lages III. Universidade Federal de Goiás.  
**Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública IV. Título.**

CDU: 616.937

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a quatro pessoas fundamentais na minha vida, minha mãe Belirana Boaventura Avelar, as minhas irmãs Fabiana Boaventura Avelar e Graciana Analia Boaventura Avelar. E ao meu grande companheiro Eduardo Farias Rebelo.

# AGRADECIMENTOS

A Deus por me acompanhar em todos os momentos de minha vida.

Á meu pai Walteir Ferreira de Avelar que enquanto esteve vivo fez de tudo por mim.

Á minha querida mãe Belirana Boaventura Avelar que todos os dias mesmo longe se preocupa comigo e me fortalece com palavras amigas.

As minhas irmãs Fabiana Boaventura Avelar e Graciana Boaventura Avelar por me ajudar e entender quando precisei.

Á todos os Tios e Tias que sempre me deram força.

Aos meus queridos primos e primas.

Aos meus queridos Avós José Boaventura Filho e a Julia Araújo dos Santos (vovó Belinha).

Ao meu companheiro e querido amor Eduardo Farias Rebelo. Obrigada por tudo que você faz por mim.

Ao Raimundo Rebelo Vaz e Saras Farias de Oliveira por toda amizade e carinho.

A minha orientadora Ana Maria de Castro que sempre acreditou no meu potencial e me deu toda confiança em fazer parte de seu grupo de pesquisa.

A professora Doutora Eliane Lages Silva, muito obrigada!

Ao professor Alejandro Luquetti Ostermayer.

A Daniela Stefani Márquez e Jorge Marcelo Marson por todo apoio técnico e científico prestado para a realização desse trabalho.

Aos amigos Marcos Gontijo da Silva, Josyrene Mariano, pela amizade, ajuda e estímulo.

A querida amiga Tatiane Luiza da Costa, serei sempre grata a você.

À Liliane da Rocha Siriano meu grande orgulho e exemplo de vida.

A Aline Almeida Barbaresco, Flávia Nascente, Miryan de Sylvio, Liliane Rego Guimarães por colaborarem sempre comigo.

Aos secretários da Pós-graduação José Clementino de Oliveira Neto e Kariny Vieira Soares, muito obrigada!

Aos funcionários do IPTSP-UFG (Nair, Sueli Meira, Lourdes, Marieta e Vânia) pelo carinho e apoio técnico.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Parasitologia da UFTM.

A todos os professores do IPTSP-UFG. Em especial aos professores que participaram das bancas de qualificação e defesa.

Às pacientes que concordaram em participar dessa pesquisa.

A todos aqueles que acreditam em mudanças e participaram direta ou indiretamente na execução dessa pesquisa.

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE QUADROS E FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
SUMÁRIO.....	vi
1- REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1 Morfologia e ciclo evolutivo.....	1
1.2 Aspectos gerais da doença de Chagas.....	3
1.2.1 Doença de Chagas em Imunodeprimidos.....	4
1.3 Doença de Chagas congênita.....	5
1.4 Diagnóstico.....	6
1.4.1 Diagnóstico parasitológico.....	7
1.5 Análise da diversidade intra-específica do <i>T. cruzi</i> .....	8
1.5.1 Variabilidade biológica e bioquímica do <i>T. cruzi</i> .....	8
1.6 Caracterização genética do <i>T. cruzi</i> .....	10
2- JUSTIFICATIVA.....	14
3- OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	13
4-MATERIAL E MÉTODOS.....	16

4.1 Origem dos isolados .....	16
4.2 Processamento das amostras.....	16
4.3 Diagnóstico Parasitológico e Molecular.....	17
4.3.1 Hemocultura.....	17
4.4 Caracterização genética do <i>T. cruzi</i> .....	19
4.4.1 Extração do DNA.....	19
4.4.2 Amplificação específica do <i>T. cruzi</i> .....	20
4.4.3 Genotipagem do <i>T. cruzi</i> presente nos isolados.....	21
4.4.3.1 Amplificação do domínio divergente D7 do gene 24Sα rRNA.....	22
4.4.3.2 Amplificação do domínio de tamanho variável do gene 18S rRNA.....	22
4.4.3.3 Amplificação do espaçador não transcrito do gene de mini- exon.....	23
4.5 Variabilidade genética do kDNA dos isolados do <i>T. cruzi</i> .....	23
4.5.1 LSSP-PCR ( <i>Low Stringency Single Specific Primer-PCR</i> ).....	23
4.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	25
4.6 Análise dos perfis de LSSP-PCR e construção dos fenogramas.....	26
4.6 Análise estatística.....	26
5-RESULTADOS.....	27
5.1 Origem dos pacientes.....	27
5.2 Hemocultura.....	27
5.2.1 Positividade por número de tubos.....	27

5.3 Caracterização dos grupos e subgrupos das populações do <i>T. cruzi</i> .....	28
5.4 Comparação da variabilidade genética do kDNA entre os 30 isolados.....	30
5.5 Comparação da variabilidade genética do kDNA entre os isolados da Bahia e Goiás.....	33
5.6 Comparação da variabilidade genética do kDNA dos estoques de <i>T. cruzi</i> , por faixa etária.....	36
5.7 Comparação da variabilidade genética do kDNA dos estoques de <i>T. cruzi</i> , por idade gestacional.....	37
5.8 Comparação da variabilidade genética do kDNA dos estoques de <i>T. cruzi</i> , das gestantes e não gestantes.....	38
5.9 Comparação da variabilidade genética do kDNA entre os isolados obtidos em tubos diferentes por hemocultura da mesma paciente.....	39
6- DISCUSSÃO.....	50
7-CONCLUSÕES.....	54
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
9-ANEXO I.....	68
10- ANEXO II .....	69

# LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$  - Alfa

APAE- Associação de Pais e Amigos Excepcionais

AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome

BOD – Biochemical Oxygen Demand

CEPMHA/HC – Comitê de Ética em Pesquisa Médica e Animal do Hospital das Clínicas

°C - Graus Centígrados

CV - Coeficiente de Variação

DP - Desvio Padrão

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

dATP - 2' deoxiadenosina 5' trifosfato

dCTP - 2' deoxicitosina 5' trifosfato

dGTP - 2' deoxiguanosina 5' trifosfato

dTTP - 2' deoxitimidina 5' trifosfato

dNTP – Mistura de 2' deoxinucleosídeos 5' trifosfato

ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

GP - Glicoproteína

HCl - Ácido clorídrico

HIV –Human Immunodeficiency Syndrome

IL - Interleucina

IPTSP- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

kDNA –DNA do cinetoplasto

LSSP-PCR - Low –stringency specific primer

LIT - Liver Infusion Tryptose

Mb – Mega ( $10^6$ ) Base

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio

min - Minuto

NaOH - Hidróxido de Sódio

ng - Nanograma

nL - Mililitros

N<sub>2</sub> - Nitrogênio

PCR - Polymerase Chain Reaction

pb - pares de bases

pmol - picomol

pH - Potencial de Hidrogênio

rpm - Rotação por minuto

rRNA - Ácido Ribonucléico Ribossômico

RNA - Ácido Ribonucléico

RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

SIDA-Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

*T. cruzi* - *Trypanosoma cruzi*

TCI - *Trypanosoma cruzi* I

TCII - *Trypanosoma cruzi* II

μL - Microlitros

UFG - Universidade Federal de Goiás

UFTM- Universidade Federal do Triângulo Mineiro

USA –United States of America

v - Volts

% - porcentagem

## **LISTA DE QUADROS E FIGURAS**

**Quadro 1:** Discriminação dos grupos e subgrupos do *T. cruzi* pela análise do tamanho do produto amplificado (em pares de bases) nas PCRs do mini-éxon, do 18S rDNA e do 24 $\alpha$  rDNA.....21

**Quadro 2:** Positividade por número de tubos obtidos pela técnica de hemocultura de 30 mulheres chagásicas crônicas, analisados pela LSSP-PCR.....27

**Figura 1:** Esquema da hemocultura, segundo Chiari et al. (1989) e Luz et al. (1994).....18

**Figura 2:** Gel de poliacrilamida a 7,5% corado com 0,2% de nitrato de prata, representativo da PCR com os iniciadores D71 e D72, amplificando as bandas 100/125pb do gene 24S $\alpha$  rRNA. MM- marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01-controle 110pb, 02- 575, 03-576, 04-577, 05-581, 06-587, 07-590, 08-592, 09-593, 10-596, 11-597, 12-600, 13-603, 14-605, 15-608, 16-609, 17-610, 18-611, 19-controle 110pb, 20-625, 21-626, 22-627, 23-629, 24-631, 25-632, 24-633, 25-634, 26-636, 27-637, 28-641, 29-644, 30-668 e MM-marcador molecular.....29

**Figura 3:** Gel de poliacrilamida a 7,5% corado com 0,2% de nitrato de prata, representativo da PCR com os iniciadores TC, TC1 e TC2, amplificando as bandas de 300pb do gene mini-exon. MM- marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01-controle 330pb, 02- 575, 03-576, 04-577, 05-581, 06-587, 07-590, 08-592, 09-593, 10-596, 11-597, 12-600, 13-603, 14-605, 15-controle 330pb, 16-608, 17-609, 18-610, 19-611, 20-controle330pb, 21-625, 22-626, 23-627, 24-629, 25-631, 26-632, 27-633, 28-634, 29-636, 30-637, 31-641, 32-644, 33-668, 34-controle 330pb e MM- marcador molecular.....29

**Figura 4:** Gel de poliacrilamida a 7,5% corado com 0,2% de nitrato de prata, representativo da PCR com os iniciadores V1 e V2 amplificando as bandas de 165pb do gene 18S rRNA. MM- marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01-controle 165pb, 02- 575, 03-576, 04-577, 05-581, 06-587, 07-590, 08-592, 09-593, 10-596, 11-597, 12-600, 13-603, 14-605, 15-608, 16-609, 17-610, 18-611, 19-625, 20-626, 21-627, 22-629, 23-631, 24-632, 25-633, 26-634, 27-636, 28-637, 29-641, 30-644, 31-668, 33controle 165pb e MM-marcador molecular.....29

**Figura 5:** Caracterização do kDNA dos isolados do *T. cruzi* pela LSSP-PCR: gel de poliacrilamida a 7,5% corado com 0,2% de nitrato de prata. MM-marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01-575, 02-576, 03-577, 04-581, 05-587, 06-590, 07-592, 08-593, 09-596, 10-597, 11-600, 12-603, 13-605, 14-608, 15-609, 16-610, 17-611, 18-625, 19-626, 20-627, 21-629, 22-631, 23-632, 24-633, 25-634, 26-636, 27-637, 28-641, 29-644, 30-668 e MM-marcador molecular.....31

**Figura 6:** Fenograma mostrando a distância genética entre os isolados do *T. cruzi* em todas as regiões estudadas.....32

**Figura 7:** Comparação da distribuição da naturalidade das mulheres infectadas pelo *T.cruzi* dos estados da Bahia e de Goiás.....33

**Figura 8:** Fenograma mostrando a distância entre as populações de *Trypanosoma cruzi* isolados pela técnica de hemocultura e analisada pela LSSP-PCR das pacientes do Estado da Bahia.....34

**Figura 9:** Fenograma mostrando a distância entre as populações de *Trypanosoma cruzi* isoladas pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR das pacientes do Estado de Goiás.....35

**Figura 10:** Distribuição dos isolados de mulheres infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, na fase crônica pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR de acordo com a faixa etária.....36

**Figura 11:** Distribuição dos isolados de mulheres infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, na fase crônica, pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR de acordo com a idade gestacional.....37

**Figura 12:** Distribuição dos isolados de mulheres infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, na fase crônica pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR do grupo de gestantes e de mulheres não gestantes.....38

**Figura 13:** Caracterização do kDNA dos isolados do *T. cruzi* pela LSSP-PCR: gel de poliacrilamida a 7,5%, corado com 0,2% de nitrato de prata. MM-marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01- 575a, 02-575b, 03-576, 04-577a, 05-577b, 06-581a, 07-581b, 08-581c, 09-581d, 10-581e, 11-581f, 12-581g, 13-587a, 14-590a, 15-592a, 16-592b, 17-593a, 18-593b, 19-596, 20-597, 21-600a, 22-600b, 23-603a, 24-603b.....40

**Figura 14:** Fenograma mostrando a distância entre as populações de *Trypanosoma cruzi* das amostras 575 a 603 isoladas de mulheres infectadas na fase crônica pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR.....42

**Figura 15:** Caracterização do kDNA dos isolados do *T. cruzi* pela LSSP-PCR: gel de poliacrilamida a 7,5%, corado com 0,2% de nitrato de prata. MM- marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01- 603a, 02-603b, 03-605a, 04-605b, 05-608a, 06-608b, 07-608c, 08-609a, 09-609b, 10-609c, 11-609d, 12-609e, 13-610a, 14-610b, 15-611a, 16-611b, 17-611c, 18-611d, 19-611e, 20-625a, 21-625b, 22-625c, 23-625d, 24-625e, 25-627a, 26-627b, 27-628a, 28-628b, 29-628c, 30-628d e MM- marcador molecular.....43

**Figura 16:** Fenograma mostrando a distância entre as populações de *Trypanosoma cruzi* das amostras 603 a 628 s isoladas de mulheres infectadas na fase crônica, pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR.....45

**Figura 17:** Caracterização do kDNA dos isolados do *T. cruzi* pela LSSP-PCR: gel de poliacrilamida a 7,5% corado com 0,2% de nitrato de prata. MM marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01-629a, 02-629b, 03-631a, 04-631b, 05-632a, 06-632b.....46

**Figura 18:** Fenograma mostrando a distância entre as populações de *Trypanosoma. cruzi* das amostras 629 a 63 isoladas de mulheres infectadas na fase crônica pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR.....46

**Figura 19:** Caracterização do kDNA dos isolados do *T. cruzi* pela LSSP-PCR: gel de poliacrilamida a 7,5%, corado com 0,2% de nitrato de prata. MM marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01-633a, 02-633b, 03-

633c, 04-633d, 05-633e, 06-633f, 07-634a, 08-634b, 09-636a, 10-636b, 11-636c, 12-636d, 13-636e, 14-637a, 15-637b, 16-637c, 17-637d, 18-641a, 19-641b, 20-641c, 21-644a 22-644b, 23-644c 24-668 e MM marcador molecular.....47

**Figura 20:** Fenograma mostrando a distância entre as populações de *Trypanosoma cruzi* das amostras 633 a 668 isoladas de mulheres infectadas na fase crônica pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR.....49

## RESUMO

A doença de Chagas é uma zoonose causada por um protozoário flagelado denominado *Trypanosoma cruzi*, trata-se de um problema específico da América Latina, onde estima-se que 12 a 14 milhões de pessoas estejam infectadas. As populações de *Trypanosoma cruzi* podem ser divididas em dois grandes grupos, o *Trypanosoma cruzi* I (TCI) e o *Trypanosoma cruzi* II (TCII), sendo o último mais heterogêneo e subdividido em cinco subgrupos TCIIa, TCIIb, TCIIc, TCII d e TCIIe, porém, pouco se sabe das implicações clínicas e epidemiológicas dessas classificações. A frequência da transmissão vertical da doença de Chagas pode variar de 1,6 a 18,5% de acordo com a região e a metodologia usada nos estudos. O objetivo desse estudo foi a caracterização genética de 30 isolados de *T. cruzi* por meio da hemocultura de pacientes com doença de Chagas na fase crônica, gestantes e não gestantes. A caracterização genética foi realizada com três diferentes marcadores que amplificaram regiões 24S $\alpha$  e 18S do DNA ribossômico e do gene mini-exon que permite classificar os grupos e subgrupos do parasito e para a análise da variabilidade genética entre os isolados do *T. cruzi* foi realizada a caracterização da região variável dos minicírculos do kDNA por meio da técnica de Low –stringency specific primer (LSSP-PCR), das 30 pacientes estudadas 75% (25/30) eram gestantes e 25% (5/30) não gestantes. As pacientes são de quatro regiões brasileiras distintas sendo elas dos Estados da Bahia 53,3% (16/30), Goiás 40,0% (12/30), Paraíba 3,3% (1/30) e Distrito Federal 3,3% (1/30). A análise do rDNA permitiu evidenciar o TCII em 100% das populações isoladas nas regiões estudadas, onde o subgrupo TCIIb/e foi detectado em (96,66%) e o TCII d em (3,33%) este último corresponde a uma amostra do grupo controle do Estado da Bahia. A variabilidade genética entre as 30 amostras analisadas foi de  $24,08 \pm 14,4\%$  de compartilhamento de bandas entre os pares. Houve diferença no compartilhamento de bandas entre as pacientes da Bahia e Goiás, onde o valor de significância foi menor que 5%. Não houve diferença entre as porcentagens de bandas compartilhadas nas análises realizadas por faixa etária das pacientes, idade gestacional e na análise dos grupos de gestantes e não gestantes. Ao analisar mais de um tubo proveniente da hemocultura por paciente evidenciamos perfis de assinaturas gênicas complexas e heterogêneas com 62,5% de bandas compartilhadas menor que 77% e apenas 37,5% tiveram índices maiores que 83% de compartilhamento de bandas entre as amostras. Sugerindo assim que nossos isolados apresentaram uma grande variabilidade genética.

## ABSTRACT

Chagas disease is a zoonotic disease caused by a protozoan plagued called *Trypanosoma cruzi*, it is a particular problem in Latin America, where it is estimated that 12 to 14 million people are infected. The populations of *Trypanosoma cruzi* can be divided into two major groups, the *Trypanosoma cruzi* I (TCI) and *Trypanosoma cruzi* II (TCII), the last being more heterogeneous and divided into five subgroups TCIIa, TCIIb, TCIIc, TCII d and TCIIe. However, little is known of epidemiological and clinical implications of these ratings. The frequency of vertical transmission of Chagas disease can vary from 1.6 to 18.5% in accordance with the region and the methodology used in the studies. The aim of this study was to genetic characterization of 30 isolates of *T. cruzi* through the blood of patients with Chagas disease in the chronic phase, pregnant and not pregnant. The genetic characterization was performed with three different markers that amplified regions of the 18S and 24S  $\alpha$  DNA ribosomal and mini-exon of the gene that allows classify the groups and subgroups of the parasite and the analysis of genetic variability among isolates of *T. cruzi* was performed the characterization of the variable region of minicircles of kDNA through the technique of *Low-Stringency Single Specific Primer-PCR* (LSSP-PCR). The 30 patients studied 75% (25/30) were women and 25% (5 / 30) not pregnant. The patients are the four different Brazilian regions being the States of Bahia 53.3% (16/30), Goiás 40.0% (12/30), Paraíba 3.3% (1 / 30) and the Federal District 3, 3% (1 / 30). The analysis of rDNA allowed show the TCII in 100% of the isolated populations in the regions studied, where the subgroup TCIIb/e has been detected in (96.66%) and TCII d in (3.33%) the latter is a sample of the group Control of the State of Bahia. The genetic variability between the 30 samples was  $24.08 \pm 14.4\%$  share of bands among pairs. There was no difference between the share of bands patients of Bahia and Goiás, where the value of significance was less than 5%. There was no difference between the percentages of bands showed in analyses by age of the patients, gestational age and in the analysis of the groups of pregnant and not pregnant. In reviewing more than one tube of blood per patient coming evidenced profiles of signatures genomic complex and heterogeneous with 62.5% of bands shared less than 77% and only 37.5% had rates higher than 83% of bands sharing among samples. Suggesting so our isolates showed a great genetic variability.

# 1- REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Morfologia e ciclo evolutivo

*Trypanosoma cruzi* é um flagelado da ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, caracterizado pela existência de um flagelo e do cinetoplasto, uma estrutura contendo ácido desoxirribonucléico (DNA) localizada dentro da mitocôndria, única destes parasitos. A identificação do *T. cruzi* é relativamente fácil, pelo fato de o seu cinetoplasto ser volumoso, excedendo os limites da membrana parasitária, um dos detalhes morfológicos que o diferencia do outro único tripanossomo que infecta o homem em alguns países da América do Sul e Central. *Trypanosoma rangeli* não é patogênico para o homem, e pode ocasionar reações sorológicas cruzadas com *T. cruzi* (Ramirez et al. 1998).

*T. cruzi* apresenta três formas evolutivas no seu ciclo, as quais são identificadas morfológicamente pela posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo. No tripomastigota (estágio infectante do parasito) o cinetoplasto situa-se na parte posterior do flagelado, em posição terminal, e o flagelo que se origina próximo do cinetoplasto emerge da bolsa flagelar, na parte anterior do parasito; nos epimastigotas (formas de multiplicação do parasito no vetor ou em meios de cultivos axênicos) o cinetoplasto e a origem do flagelo estão em posição próxima do núcleo; por fim, os amastigotas (estágios evolutivos que se multiplicam dentro das células hospedeiras) são organismos arredondados que apresentam micro flagelo (possui organelas que normalmente são encontradas no cinetoplasto de células eucarióticas, e algumas outras estruturas que lhes são próprias). A mitocôndria é tubular e apresenta as típicas cristas e DNA (cinetoplasto), que são características dessa estrutura. Uma particularidade do *T. cruzi* é que, ao contrário do que acontece nas células eucarióticas, o DNA não está distribuído ao longo da mitocôndria e se concentra no cinetoplasto (kDNA). O cinetoplasto possui cerca de 10-20% do DNA total da célula e esta disposto em uma rede fibrosa constituída por moléculas organizadas em mini-círculos (95% do DNA total do cinetoplasto) e maxi-círculos. Embora cerca de 20.000-25.000 mini-círculos estejam presentes no cinetoplasto, o papel desenvolvido pelo kDNA não é bem conhecido, ainda que sua presença seja essencial à viabilidade dos estágios evolutivos do *T. cruzi* (Brener 1997; Sturm & Simpson 1990).

*T. cruzi* é representado por populações heterogêneas está constituída por diferentes cepas que circulam, na natureza, entre o homem, vetores animais domésticos e reservatórios silvestres. Os tripanossomos sanguíneos, por exemplo, apresentam fenômeno de polimorfismo, caracterizado pela existência de formas delgadas e largas que, respectivamente, predominam em diferentes cepas do *T. cruzi*. Essas populações possuem comportamento diverso no que se refere a curvas de parasitemia, interação com células hospedeiras e resposta imune do hospedeiro (Andrade 1974).

**O ciclo biológico requer dois hospedeiros, um hospedeiro invertebrado (triatomíneo) e um hospedeiro vertebrado, o qual inclui o homem, animais domésticos e silvestres. A infecção pelo *T. cruzi* estava inicialmente restrita ao ambiente silvestre entre os seus reservatórios e vetores. A ocupação dos espaços pelo homem e a ação antrópica com os desmatamentos e afastamento dos animais silvestres, fonte alimentar dos triatomíneos, aliados à sua domiciliação, foi gradativamente transformando o ciclo silvestre em peridoméstico e doméstico. Há indícios de que no Brasil na época da mineração, quando os desmatamentos eram restritos, a infecção humana estava limitada à transmissão acidental ou em cavernas onde o homem podia conviver com alguns triatomíneos (Coura et al. 2000).**

Os ciclos de transmissão desta infecção são definidos pela distribuição geográfica dos triatomíneos e dos hospedeiros vertebrados, um deles associado com o ciclo silvestre envolvendo reservatórios selvagens *T. cruzi* I, e o outro com o ciclo doméstico/peridoméstico associado ao *T. cruzi* II, no qual o homem e animais domésticos agem como hospedeiros do parasito (Fernandes et al. 1998, 1999; Zingales et al. 1998).

O hospedeiro vertebrado se infecta quando as formas tripomastigotas, eliminadas nas fezes e urina do inseto vetor, entram em contato com a pele lesada ou mucosas íntegras, penetram e se multiplicam em qualquer tipo celular encontrado no local, exceto hemácias. Os triatomíneos se infectam durante o repasto sanguíneo em animais infectados ao ingerir as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*, as quais no estômago do vetor se transformam em esferomastigotas. No intestino médio os epimastigotas se aderem à superfície epitelial, se multiplicam e migram para a parte mais posterior, atingindo o reto, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados nas fezes ou urina do vetor e constituem as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado. Todos os triatomíneos podem entrar em contato com *T. cruzi*, porém, apenas algumas espécies susceptíveis permitem a multiplicação do parasito no seu interior (Dias 1992; Silveira 1997).

## **1.2 Aspectos gerais da doença de Chagas**

A doença de Chagas ou Tripanossomíase americana é uma infecção generalizada, essencialmente crônica, causada pelo protozoário *T. cruzi* transmitida naturalmente ao homem e a outros animais por intermédio de hemípteros hematófagos da subfamília *Triatominae*, representados principalmente pelas espécies: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma brasiliensis*. (Who 2002). Segundo Dias (2007) essa doença afeta cerca de 12 a 14 milhões de pessoas na América Latina, onde mais de 60 milhões vivem sob risco de transmissão, em cerca de 18 países endêmicos.

Outras vias de infecção como, transfusões de sangue, transplantes de órgãos, acidente em laboratórios de pesquisas, transmissão congênita e oral, tem papel importante na epidemiologia do *T. cruzi*, principalmente nesta última década após o controle da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* (Schofield et al. 2006), em alguns países. Possibilidades raras como a transmissão pelo coito já foi comprovada em animais de laboratório, porém, a mesma nunca foi relatada em humanos. Excepcionalmente a transmissão pode ocorrer por outros vetores e pelo contato direto com fezes infectadas de triatomíneos (Dias 1992).

No Brasil e em alguns outros países latino-americanos, a transmissão do *T. cruzi* a seres humanos, por meio de triatomíneos, tornou-se menos expressiva e, inclusive, já foram certificadas de interrupções desse tipo de transmissão do parasito (Silveira et al. 2002). Como decorrência de tal situação as conhecidas formas de infecção rotuladas como alternativas passaram a merecer maiores atenções, porquanto os atingidos pela protozoose continuam podendo causar novos comprometimentos capazes então de prejudicar o pleno êxito de medidas preventivas adotadas até agora (Rassi et al. 2004).

A doença de Chagas é caracterizada por duas fases distintas: a fase aguda com intensidade e duração de 60 dias, ocorrendo uma intensa multiplicação parasitária que pode originar manifestações clínicas como febre, mal estar, astenia, presença de sinais de porta de entrada (sinal de Romaña e chagoma de inoculação), edema, esplenomegalia e hepatomegalia, porém a grande maioria dos indivíduos não apresenta nenhuma sintomatologia. Na passagem para a fase crônica podem estar envolvidos fenômenos de imunomodulação, como declínio acentuado da parasitemia e redução progressiva dos fenômenos inflamatórios. Em geral, a

fase crônica inicia-se com a forma indeterminada, também denominada latente, sub-clínica, apresentando eletrocardiograma, raio-X de torác, cólon e esôfago normais. Aproximadamente 20-25% dos indivíduos infectados evoluem para cardiopatia chagásica crônica, apresentando progressivo dano cardíaco resultante da destruição de cardiomiócitos e do sistema condutor e, 5-10% são acometidos de síndromes digestivas, destacando-se a esofagopatia e a colopatia (Cunha-Neto et al. 1995).

### **1.2.1 Doença de Chagas em Imunodeprimidos**

A reativação da doença de Chagas tem sido relacionada a situações que induzem imunodepressão, como neoplasias, drogas e a infecção pelo HIV (Almeida et al. 1991). A reativação da doença de Chagas representa muitas vezes a primeira infecção oportunística nos pacientes com infecção pelo HIV e a meningoencefalite e/ou miocardite são as principais manifestações clínicas (Gallo et al. 1992). Apesar do diagnóstico realizado e o tratamento específico instituído, a progressão é muitas vezes fatal (Sartori et al. 1998).

Estudos, tanto *in vitro* quanto no homem, têm demonstrado que a infecção aguda pelo *T. cruzi* causa severa imunodepressão no hospedeiro. Também, foi demonstrado na fase aguda que *T. cruzi* tem a capacidade de induzir diminuição na expressão das moléculas de superfície CD3+, CD4+ CD8+, bem como de receptores de IL-2 (Higuchi 1995).

Se a imunodepressão também está presente na fase crônica da doença de Chagas, é assunto controvertido. Estudos experimentais têm mostrado deficiência da função *helper* na fase crônica da doença de Chagas (Higuchi 1995).

## **1.3 Doença de Chagas congênita**

Desde a descrição da doença de Chagas congênita, por Carlos Chagas em 1911, inúmeros autores têm demonstrado a importância da forma de transmissão

congenita, não só experimentalmente, mas principalmente no homem, sendo o primeiro caso descrito na Venezuela (Dao 1949).

A frequência da transmissão maternal ou vertical da doença de Chagas pode variar, de acordo com a região e a metodologia usada no estudo, de 1% no Brasil e de 4 a 12% em Países do Cone Sul (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas 2005). A transmissão vertical é considerada um mecanismo de perpetuação dessa enfermidade parasitária que vem demonstrando importância nas últimas décadas em regiões endêmicas e urbanas, onde estão concentrados muitos migrantes acometidos pelo *T. cruzi*. Nas décadas de 60 e 70 estudos mostraram, por meio de exame anatomopatológico de fetos, natimortos e prematuros, evolução fatal intra-uterina dessa infecção (Bittencourt 1972; Amato-Neto 1968). A partir da década de 80, pesquisas prospectivas evidenciaram, por meio de diferentes métodos de diagnóstico, tais como parasitológico, sorológico e anatomopatológico, formas variadas deste mecanismo de transmissão da doença de Chagas. Estas podem apresentar de diversas maneiras, exemplificadas por óbito fetal em qualquer fase da gestação, prematuridade, hepatoesplenomegalia, febre, anemia, icterícia e meningoencefalite; em cerca de 50% dos casos o recém-nascido pode apresentar-se sem sintomas ou oligossintomático. Os fatores possibilitadores da transmissão materno-fetal do *T. cruzi* não estão bem esclarecidos: a cepa e a presença de parasitos circulantes podem estar envolvidos (Rassi et al. 2004).

O conceito pode adquirir a doença de Chagas da mãe, via transplacentária, geralmente após o 6º mês de gestação, entre 22 e 37 semanas e parece depender de fatores ligados ao parasito e ao hospedeiro (Bittencourt 1992). A fase e as formas clínicas da infecção materna não parecem afetar a transmissão, embora a fase aguda, quando a parasitemia é alta e persistente, apresente maior risco que a crônica. A infecção congênita pode ocorrer em 71% dos recém-nascidos de mães com infecção aguda durante a gravidez e em 1,6% na fase crônica de doença (Freilij 1994). *T. cruzi* atravessa o epitélio corial, parasita o estroma vilositário, prolifera sob a forma amastigota e provoca alterações. O grau de envolvimento placentário está geralmente relacionado com a intensidade das lesões fetais (Reiche et al. 1996). Formas menos frequentes de transmissão materna da doença de Chagas podem ocorrer pela contaminação oral por meio do líquido amniótico, e a transmissão hematogênica, durante o trabalho de parto. Há também a possibilidade da transmissão pelo leite materno em mulheres que cursam a fase aguda da infecção ou quando ocorre sangramento dos mamilos (Howard 1962).

O diagnóstico do recém-nascido muitas vezes pode ser confirmado pela presença do parasito ao exame direto ou pelo xenodiagnóstico. Os anticorpos da classe IgM anti-*T. cruzi* são detectáveis por imunofluorescência indireta e ELISA, cumprindo assilar que, às vezes, são de aparecimento tardio, exigindo assim seguimento do recém-nascido, com coletas de sangue seriadas, ao contrário do que acontece em casos agudos não-congênicos (Bittencourt 1984). A persistência de anticorpos específicos da classe IgG por um período maior que 6 meses indica infecção congênita (Bittencourt 2000).

## **1.4 Diagnóstico**

O diagnóstico da doença de Chagas pode ser feito por métodos parasitológicos e por testes sorológicos, as alterações clínicas podem ser detectadas por exames de imagem, como os radiológicos. Na fase aguda da doença procura-se identificar o parasito, enquanto que na fase crônica da doença utilizam-se métodos imunológicos para identificação de anticorpos específicos.

### **1.4.1 Diagnóstico parasitológico**

Na fase aguda são utilizados métodos diretos para a pesquisa de formas tripomastigotas do *T. cruzi* na corrente sanguínea e métodos de multiplicação como a hemocultura e o xenodiagnóstico, que apresentam elevada especificidade, porém baixa sensibilidade.

A pesquisa direta do parasito pode ser feita por microscopia direta onde se coloca o sangue entre lâmina e lamínula, durante as seis primeiras semanas da doença. Técnicas como a da gota espessa ou da concentração do sangue, corada pelo Giemsa aumentam a probabilidade de encontrar o parasito se este estiver com baixa parasitemia no hospedeiro.

A hemocultura é muito utilizada para diagnóstico na fase crônica da doença de Chagas visto que *T. cruzi* é um protozoário facilmente cultivado em inúmeros meios acelulares contendo componentes como, sais, proteínas e derivados de hemina. É possível realizar a hemocultura utilizando equipamentos existentes em pequenos hospitais, centros e postos de saúde em áreas rurais.

O emprego da técnica de hemocultura abriu perspectivas como um método alternativo visando melhorar a detecção dos parasitos pelos métodos parasitológicos indiretos, diante da variada sensibilidade dos mesmos. A parasitemia escassa e intermitente nos indivíduos infectados na fase crônica da doença de Chagas explicaria a dificuldade na detecção do *T. cruzi* em todas as amostras de sangue coletadas, a qual depende da presença do parasito na amostra no momento da coleta de sangue (Castro et al. 2002).

A hemocultura é muito importante para o isolamento de populações do *T. cruzi* de seres humanos, vetores, reservatórios silvestres e domésticos. Os parasitos isolados são amplificados em meio de cultivo visando à caracterização por técnicas bioquímicas e/ou de biologia molecular como, por exemplo, isoenzimas e endonucleases de restrição, impressões digitais do DNA, amplificação aleatória de polimorfismos de DNA (RAPD-PCR) e amplificação do domínio divergente do gene ribossômico 24S e LSSP-PCR (*Low stringency single specific primer-PCR*) (Chiari & Galvão 1997).

O método de reação em cadeia da polimerase (PCR) é altamente sensível para detecção de DNA do parasito. Para a doença de Chagas poderia representar importante procedimento para os casos com resultados sorológicos duvidosos. Em outras palavras, poderia ser utilizado como teste padrão ouro. Deve-se tomar muito cuidado com a contaminação no laboratório no momento de realização do exame para evitar assim os resultados falsos positivos.

Os testes sorológicos são amplamente utilizados na doença de Chagas, para selecionar doadores em bancos de sangue, para acompanhamento da terapêutica antiparasitária, para fins sociais na seleção de trabalhadores, para confirmar ou excluir uma suspeita clínica e para inquéritos soroepidemiológicos, sendo os mais utilizados a hemaglutinação Indireta, Imunofluorescência Indireta e o ELISA, sendo testes que utilizam antígenos brutos e apresentam como vantagens principais sua disponibilidade em *kits* comerciais e de boa reprodutibilidade, sua sensibilidade e especificidade (Luquetti & Rassi 2000).

## **1.5 Análise da diversidade intra-específica do *T. cruzi***

### **1.5.1 Variabilidade biológica e bioquímica do *T. cruzi***

*T. cruzi* é constituído por populações heterogêneas contendo um grande número de clones naturais, que circulam nos ambientes domésticos e silvestres entre seres humanos, reservatórios e vetores. Tais populações são complexas e apresentam variações intra-específicas demonstradas em níveis biológicos, bioquímico, imunológico e genético (Devera et al. 2003). Essa grande variabilidade biológica e genética encontrada nessa espécie pode ser explicada pelos múltiplos contatos entre os vetores e reservatórios nas áreas endêmicas, os quais propiciariam as infecções com mais de uma população do *T. cruzi*, com distintas propriedades biológicas entre si, e coexistiriam dentro de um mesmo hospedeiro, sem recombinação entre eles, constituindo as cepas/populações monoclonais ou multiclonais (Tibayrenc & Ayala 1991).

As diversas manifestações clínicas observadas na doença de Chagas passam por períodos ou fases, algumas relacionadas ao hospedeiro como a resposta imune, e outras inerentes ao parasito que apresenta distintas características evidenciadas pela diversidade de cepas isoladas dos mais diferentes hospedeiros (Martins et al. 2003).

O estudo da diversidade biológica do *T. cruzi* realizada experimentalmente em camundongos demonstrou diferenças significativas entre parâmetros como a morfologia das formas sanguínea, virulência e patogenicidade, tropismo tecidual e biodemas do parasito que demonstraram que há cepas de alta e baixa virulência com elevado poder de patogenicidade (Andrade 1974 e Andrade et al. 1985). Em 1997 Andrade e Magalhães agruparam as cepas de *T. cruzi* em três biodemas (I, II e III) com base em critérios relacionados a picos de parasitemia, taxas de mortalidade, predomínio de formas largas ou delgadas, tropismo tecidual e comportamento histopatológico. O biodema tipo I inclui as cepas que se multiplicam rapidamente, apresentam elevada parasitemia com predomínio de formas delgadas e macrofagotropismo com a mortalidade ocorrendo entre o 7º e 12º dias após-infecção;

no tipo II estão as cepas de multiplicação lenta, picos irregulares de parasitemia entre o 12º e 22º dias após a infecção, com alta mortalidade; o tipo III inclui aquelas de multiplicação lenta, mas com picos tardios de parasitemia, entre o 20º e o 30º dias após a infecção, com predomínio de formas largas e tropismo para musculatura esquelética.

Outras pesquisas realizadas com o objetivo de diferenciar as cepas do *T. cruzi* se basearam na utilização da diferenciação dos perfis eletroforéticos de isoenzimas que agruparam as populações do *T. cruzi* em três zimodemas principais, denominados Z1, Z2 e Z3 (Miles et al. 1977) e ZA, ZB, ZC, ZD (Romanha 1982; Carneiro et al. 1990).

Os zimodemas Z2 e ZA são equivalentes sendo, portanto, encontrados no Brasil seis principais zimodemas correspondentes ao Z1, Z2 ou ZA, Z3, ZB, ZC e ZD. Destes, o Z2 estaria associado ao ciclo doméstico, enquanto o Z1 e o Z3 seriam encontrados principalmente em animais e vetores do ciclo silvestre e em pacientes infectados pelo *T. cruzi* na fase aguda (Miles et al. 1980; Barret et al. 1980) Tibayrenc et al. 1986 analisando um número maior de locus, com 15 marcadores enzimáticos e cepas do *T. cruzi* procedentes de diversos países, identificaram 43 zimodemas. Tibayrenc em 1995 sugeriu a existência de duas grandes linhagens filogenéticas, altamente heterogêneas, que diferem em várias características biológicas. Estudos demonstram que uma dessas linhagens está relacionada com as populações encontradas em seres humanos e pode ser subdividida em cinco subgrupos distintos com características geográficas e ecológicas bem definidas (Brissé et al. 2000, 2001).

## **1.6 Caracterização genética do *T. cruzi***

O DNA nuclear do *T. cruzi* tem um conteúdo que varia de 87 a 200 Mb e é composto por seqüências que codificam proteínas, outras que codificam ácidos ribonucléicos (RNAs) e seqüências repetitivas ( $\pm$  44%) do genoma nuclear (Castro et al. 1981), seu tamanho varia de poucos pares de nucleotídeos até mais de 5 mil pares de bases (Requena et al. 1996). Estas seqüências podem estar agrupadas ou dispersas no genoma, muitas delas, como os micro e mini-satélites, os genes de rRNAs e RNA de seqüência líder, estão organizadas em repetições dispostas uma

após a outra de maneira regular e periódica denominadas de repetições em *tandem* (Sloof et al. 1983).

O DNA satélite foi a primeira seqüência repetitiva e caracterizada no genoma do *T. cruzi* com cópias em *tandem* em vários cromossomos (Gonzalez et al. 1984). Os microssatélites, pequenas seqüências de DNA em *tandem*, apresentam elevado grau de polimorfismo sendo utilizados em estudos filogenéticos e taxonômicos, além de determinar se uma cepa é monoclonal ou policlonal (Macedo et al. 2001).

Com a identificação de marcadores do DNA nuclear com baixas taxas evolutivas, tais como o domínio divergente do gene de RNA ribossômico (rRNA) 24S $\alpha$  e a região intergênica dos genes de mini-exon, estruturaram o consenso sobre a existência de principais linhagens filogenéticas dentro da espécie de *T. cruzi*. Souto et al. (1996) constataram um dimorfismo no produto amplificado do domínio divergente do gene de rRNA 24S $\alpha$  do *T. cruzi*, permitindo a classificação das cepas em três grupos, sendo os dois primeiros os principais, onde no grupo 1 foi observado um produto de 125 pb e no grupo 2 um produto amplificado de 110 pb e no 3º grupo onde os produtos amplificaram as bandas de 110 e 125 pb, esse ultimo grupo foi denominado de grupo ½.

Na última década as populações de *T. cruzi* puderam ser classificadas em dois grandes grupos com características genéticas, biológicas e epidemiológicas bem distintas, denominado de TCI e o TCII onde no primeiro grupo estão cepas pouco infectantes para as células hospedeiras e induzem baixa parasitemia, pois expressam a glicoproteína (gp90) que está relacionada com a inibição da mobilização do cálcio requerido para a invasão das células. As pertencentes ao segundo grupo são altamente infectivas para o hospedeiro vertebrado e não expressam a gp90 (Ruiz et al. 1998).

Análises do DNA do *T. cruzi* mostraram que o TCI consiste de um único grupo relativamente homogêneo, ao contrário do TCII que pode ser dividido em cinco subgrupos (TCIIa, TCIIb, TCIIc, TCII d e TCIIe), apresentando o TCIIa TCIIb e TCIIc com linhagens filogenéticas distintas e duas linhagens híbridas o TCII d e TCIIe, que tem haplotipos separados dos subgrupos TCIIb e TCIIc (Brisse et al. 2001; Gaunt et al. 2003; Burgos et al. 2007).

A RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) é uma técnica que utiliza curtos iniciadores de seqüência aleatória que amplificam fragmentos de DNA de tamanho e intensidade variáveis, gerando perfis complexos de bandas que podem ser específicos

para cada cepa. Tibayrenc et al. (1993), demonstraram uma forte correlação entre os perfis genéticos obtidos do *T. cruzi* pela técnica de RAPD e zimodemas. Uma análise comparativa dos perfis de RAPD com dois isolados de *T. cruzi* obtidos de pacientes com doença de Chagas em diferentes períodos mostraram padrões variáveis, sugerindo populações de parasitas policlonais e monoclonais (D'Ávila et al. 2006).

O kDNA (organela citoplasmática que representa de 10 a 20% do DNA total do *T. cruzi*) está estruturalmente organizado em uma rede complexa de moléculas circulares formando os maxicírculos e os minicírculos. Os minicírculos representam 95% do DNA total (Simpson & Silva 1971). As seqüências de nucleotídeos da região variável dos minicírculos são muito heterogêneas, tanto ao nível intra-específico como interespecífico (Sturm & Simpson 1990). Os minicírculos do kDNA apresentam muitas cópias por célula, devido a isso eles são comumente usados como alvos na detecção do parasito.

A técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) foi prontamente utilizada para a caracterização do kDNA dos minicírculos do *T. cruzi* a partir da digestão do kDNA do parasito por enzimas de restrição estabelecendo grupos altamente heterogêneos denominados esquizodemas (Morel et al. 1980, 1984). A obtenção dos esquizodemas a partir da restrição de fragmentos contendo a região variável do minicírculo de 330 pb amplificados por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) estabeleceu perfis mais complexos exigindo uma menor quantidade de parasitos para o estudo de caracterização de cepas e clones (Ávila et al. 1990).

Outra técnica utilizada para caracterizar a região hipervariável do minicírculo do *T. cruzi* é a LSSP-PCR (*low-stringency specific primer-PCR*) que consiste em submeter um fragmento de DNA previamente amplificado a uma segunda reação de amplificação, utilizando um único iniciador geralmente específico para uma das extremidades do fragmento analisado sob condições de estringência excessivamente baixas. Pelo fato da reação de LSSP-PCR ocorrer em condições de baixa extringência e especificidade, a presença de qualquer DNA contaminante impede a reprodutibilidade da técnica (Pena et al. 1994; Barreto et al. 1996; Vago et al. 1996).

Esses fatores permitem a ligação do iniciador à região de exata complementaridade e sua interação a múltiplos sítios presentes no interior do fragmento analisado de maneira seqüência-dependente. É possível identificar assim, polimorfismos a partir da PCR de fragmentos purificados de kDNA possibilitando a diferenciação das populações do *T. cruzi* com alto grau de resolução em material biológico mesmo com pequeno número de parasitos. Quando os produtos da reação

de LSSP-PCR são separados por eletroforese, um perfil composto por múltiplas bandas é gerado, o qual reflete a seqüência de nucleotídeos do DNA utilizado como molde, e que constitui, em consequência, a sua “assinatura gênica” (Vago et al. 1996a, 1996b).

Vago et al. (1996) estudaram por meio da LSSP-PCR tecidos de animais infectados pelo *T. cruzi* tanto da fase aguda quanto de fase crônica e notaram uma concordância entre os perfis obtidos da cultura de parasitos com isolados no tecido, demonstrando a sensibilidade e especificidade da técnica. Andrade et al. (1999) também utilizando a mesma técnica avaliaram camundongos BALB/c simultaneamente inoculados com duas diferentes cepas de *T. cruzi* e verificaram que os animais infectados com as duas cepas, mesmo ao atingir a fase crônica, não apresentaram mudanças nos perfis genéticos das cepas parentais. Esse achado demonstra a importância da técnica para a análise de populações. Em 2000, Vago et al. analisaram pacientes infectados pelo *T. cruzi* na fase crônica com cardiomiopatia e esofagopatia e detectaram perfis genéticos distintos utilizando a técnica de LSSP-PCR.

Meija & Triana (2005), infectaram camundongos com duas cepas de origem colombiana de *T. cruzi* e detectaram a presença das duas linhagens de *T. cruzi* por meio da LSSP-PCR, bem como o caráter multiclonal das cepas trabalhadas.

Salazar et al. (2006), utilizaram a LSSS-PCR, a fim de determinar a relação genética entre as amostras de *T. cruzi* isoladas de diferentes origens geográficas, espécies vetoras e hospedeiro e mostraram a correlação de muitos isolados com suas respectivas origens geográficas.

Estes resultados reafirmam o valor da técnica de LSSP-PCR para estudos de epidemiologia molecular.

## 2- JUSTIFICATIVA

A diversidade genética do *T. cruzi* é muito maior do que se tem avaliado e diversas populações genéticas do parasito podem coexistir dentro de um mesmo hospedeiro, sem recombinação entre elas, gerando padrões complexos e difíceis de serem interpretados. Os trabalhos existentes na literatura que avaliam as características moleculares e bioquímicas do parasito envolvem etapas de isolamento, amplificação e manutenção, as quais podem dar lugar a processos de seleção clonal, induzindo modificações no comportamento fenotípico e genotípico deste protozoário. Deste modo, uma população estudada pode diferir significativamente daquela presente no hospedeiro vertebrado e não ser representativa das populações responsáveis pelas lesões teciduais. Atualmente têm-se uma preocupação muito grande com a padronização de técnicas moleculares para classificação das cepas nos dois grupos principais TCI e TCII.

A transmissão congênita ou vertical constitui um sério problema de saúde pública em áreas endêmicas e não-endêmicas, devido à freqüente migração das populações rurais para os centros urbanos. Lembrando que em áreas não endêmicas deve-se considerar também a possibilidade de transmissão congênita na segunda e terceira geração.

O desenvolvimento da técnica de *Low Stringency Single Specific Primer-PCR* (LSSP-PCR) abriu uma nova possibilidade de caracterização genética do parasito diretamente do sangue e tecidos, permitindo estudar a variabilidade genética do kDNA do *T. cruzi*, nas populações do parasito diretamente envolvidas nas manifestações clínicas da infecção. Essa técnica permite detectar distintas alterações de nucleotídeos em fragmentos de interesse de maneira precisa, rápida e informativa. A caracterização genética do *T. cruzi*, associada aos diferentes quadros clínicos presentes na doença de Chagas, poderá gerar novas perspectivas na epidemiologia molecular desta infecção.

## **3- OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterização molecular de 30 isolados de *T. cruzi* por meio da técnica de hemocultura de pacientes com doença de Chagas na fase crônica, gestantes e não gestantes pela técnica de LSSP-PCR.

### **3.2 Objetivos Específicos**

1- Determinar os grupos e subgrupos das populações de *T. cruzi* isoladas de mulheres infectadas na fase crônica da doença de Chagas, utilizando marcadores do DNA nuclear: genes 24S $\alpha$  e 18S (rRNA) e mini-exon.

2- Avaliar a variabilidade intra-específica do *T. cruzi* pela técnica LSSP-PCR e sua correlação com a naturalidade, idade e idade gestacional das pacientes selecionadas para o estudo.

3- Verificar a existência de subpopulações do *T. cruzi* pela LSSP-PCR, nos vários tubos de hemocultura obtidos de uma mesma paciente.

## **4-MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Origem dos isolados**

Essa pesquisa foi constituída do estudo de 30 isolados de *T. cruzi* obtidos por meio da técnica de hemocultura realizadas com pacientes infectadas pelo *T. cruzi* na fase crônica da doença de Chagas, 25 gestantes e 5 não gestantes, que foram previamente diagnosticadas pelo teste da mamãe no Instituto de Diagnóstico e Prevenção (IDP) da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Goiânia (APAE) e posteriormente encaminhadas, atendidas e acompanhadas no Ambulatório e Laboratório de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, no período de 01/2006 a 10/2007.

As pacientes envolvidas neste projeto foram esclarecidas quanto aos objetivos do mesmo, e dele participaram somente aquelas que concordaram com o consentimento livre e esclarecido para a coleta e utilização do seu sangue e produtos. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da UFG, Goiânia, GO com protocolo CEPMHA/HC nº 056/06. Os dados referentes às pacientes encontram-se no Anexo 1.

### **4.2 Processamento das amostras**

O sangue utilizado na pesquisa foi colhido no laboratório de Chagas do Hospital das Clínicas-UFG e as hemoculturas foram processadas no laboratório de Parasitologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-UFG, Goiânia-GO.

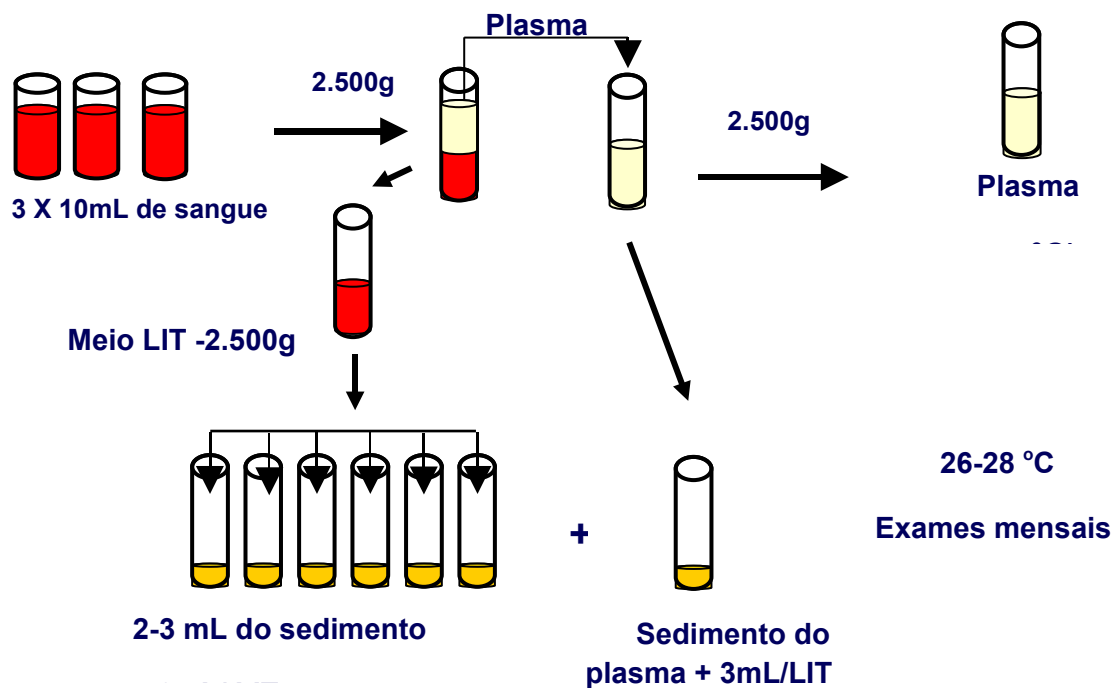
Todas as análises moleculares e estatísticas foram realizadas no setor de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG.

## 4.3 Diagnóstico Parasitológico e Molecular

### 4.3.1 Hemocultura

Trinta mililitros de sangue de cada indivíduo foram colhidos para realização da hemocultura em meio LIT, idealizado por YAEGER e descrito por Fernandes & Castellani (1964) e Camargo (1964). O protocolo utilizado foi o de Chiari et al. (1989) com algumas modificações sugeridas por Luz et al. (1994). O sangue venoso foi colhido utilizando três tubos *vacutainer* contendo heparina sódica e processado no máximo em quatro horas, durante esse período foi mantido em banho de gelo. O sangue foi centrifugado a 1.000g durante 10 minutos a 4°C em centrífuga (Janetzki-K24) e o plasma removido e centrifugado a parte, ao seu sedimento foi adicionado 3 mL do meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*). Ao sedimento de hemácias foi adicionado igual volume do plasma removido de meio de cultura LIT (Camargo 1964) centrifugado a 2.500 g durante (10 min) a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de hemácias ressuspendido em meio LIT, homogeneizado e alíquotas de 2-3mL distribuídas em sete tubos plásticos de 15mL (*Falcon*, USA) contendo 3mL de meio LIT, demonstrado na figura 1.

Os tubos foram mantidos em estufa BOD (General Electric-FANEN-LTDA) a 28°C e homogeneizados duas vezes por semana para aeração. Alíquotas de 10µl da suspensão de cada tubo foram colocadas entre lâmina e lamínula e foram examinadas em microscópio com aumento de 400X aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias após o exame. A partir das hemoculturas positivas foram realizados cultivo em meio LIT e criopreservação em N<sub>2</sub> líquido a -196°C.



**Figura 1:** Esquema da hemocultura, segundo Chiari et al. (1989) e Luz et al. (1994).

## **4.4 Caracterização genética do *T. cruzi***

### **4.4.1 Extração do DNA**

A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada segundo a técnica descrita por Gomes et al. (1998). Foram colhidos 10mL de sangue de cada paciente no mesmo momento da hemocultura em tubos *vacutainer* sem anticoagulante. Este sangue foi transferido para tubos plásticos de 50 mL (*Falcon-USA*) contendo igual volume de Guanidina-HCL 6M/EDTA (*Sigma Chemical Co, USA*) pH 8,0 (Ávila et al. 1990). Estes reagentes permitem a lise e preservação do DNA à temperatura ambiente. Essas amostras foram estocadas uma semana a temperatura ambiente e fervidas a 100°C por (15 min) para promover a linearização dos minicírculos e a sua liberação da rede do kDNA (Brito et al. 1993), permitindo desse modo, uma distribuição homogênea de seqüências alvos. A seguir as amostras foram estocadas a 4°C até o momento de uso.

As amostras de hemocultura em guanidina-EDTA (Guanidin-HCL 6M e EDTA Dissódico 0,2M, pH 8,0) foram fervidas a 100°C em banho-maria durante (15 min), separadas em alíquotas de 200µL em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (*Eppendorf-USA*) aos quais foi acrescentado 100µL de água milli-Q estéril. A desproteíntização foi realizada com 400µL de uma mistura (v/v) de fenol (Tris pH 8,0) e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) com posterior agitação por (10 min) e centrifugação a 10.000g por (5 min). O sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionou-se 10% de acetato de sódio (3M pH 5,2), duas vezes o volume de etanol absoluto gelado e foi deixado em banho de gelo por (15 min) para a precipitação do DNA. A mistura foi centrifugada a 10.000g por (15 min), o sobrenadante descartado e após a volatilização do etanol, o DNA foi ressuscitado em 60µL de água milli-Q estéril e estocado a 4°C durante 36 horas para ocorrer solubilização. Para cada extração foi realizado um controle negativo (contendo apenas os reagentes utilizados durante a extração do DNA) e um controle positivo (amostra de hemocultura de indivíduo infectado pelo *T. cruzi*).

### **4.4.2 Amplificação específica do *T. cruzi***

Nas reações da PCR específica as seqüências da região constante dos minicírculos de rede de kDNA constituíram o alvo da reação, amplificando um fragmento de 330pb com os iniciadores 121 (5'-AAATAATGTACGG(T/G)-GAGATGCATGA-3') e 122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'), (Wincker et al. 1994).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 20µl contendo Tris-HCL, 10mM (pH 9,0), Triton X-100 0,1%, KCL 75mM, Cl<sub>2</sub>Mg 3,5mM, 0,2mM de cada deoxinucleotídeos (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, *Sigma Chemical Co. USA*), 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (*Promega Corporation, USA*) e 20pmoles de cada iniciador da reação e 2µl de DNA molde. À mistura da reação foram acrescentados 30µl de óleo mineral (*Sigma Chemical CA. USA*) para evitar a evaporação.

O programa de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial a 95°C (5 min), 35 ciclos de desnaturação a 95°C (1 min), anelamento a 65°C (1 min) e extensão a 72°C (1 min) seguida de extensão final de (10 min) em termociclador automático (PTC-100 *MJ Research Inc. USA*). Os produtos de amplificação por meio da PCR foram visualizados em géis de poliacrilamida não desnaturante a 6%, corados com nitrato de prata 0,2%.

As etapas de extração do DNA e mistura da reação da PCR sempre foram monitoradas com controles positivos (hemoculturas de indivíduos com doença de Chagas) e negativos (sangue indivíduos que não eram infectados pelo *T. cruzi* de áreas endêmicas e não-endêmicas). Para evitar contaminações, cada etapa da reação foi realizada em ambientes separados, utilizando reagentes e equipamentos destinados exclusivamente para cada uma das mesmas. As amostras que apresentaram resultados negativos foram testadas com DNA extraído de cultura do *T. cruzi*. A reação de PCR foi repetida em duplicata nas mesmas condições descritas anteriormente, sendo adicionadas 2µl de DNA de cultura no segundo tubo para confirmar se estava ocorrendo inibição da reação.

#### **4.4.3 Genotipagem do *T. cruzi* presente nos isolados**

De acordo com Yeo et al. (2005), por meio da associação dos perfis de bandas obtidos na análise do mini-exon, do 18S rDNA e do 24 $\alpha$  rDNA é possível discriminar os diferentes grupos e subgrupos do *T. cruzi*, com exceção dos subgrupos IIb e IIe (Quadro I).

**Quadro 1:** Discriminação dos grupos e subgrupos do *T. cruzi* pela análise do tamanho do produto amplificado (em pares de bases) nas PCRs do mini-exon, do 18S rDNA e do 24 $\alpha$  rDNA

<b>Marcadores</b>	<b>TCI</b>	<b>TCIIa</b>	<b>TCIIb</b>	<b>TCIIc</b>	<b>TCII d</b>	<b>TCIIe</b>	<b>Resolução dos subgrupos (TCII)</b>
<b>Mini-exon</b>	<b>350</b>	<b>400</b>	<b>300</b>	<b>250</b>	<b>300</b>	<b>300</b>	<b>TCIIa,c</b>
<b>18S rDNA</b>	<b>160</b>	<b>155</b>	<b>165</b>	<b>165</b>	<b>165</b>	<b>165</b>	<b>TCIIa</b>
<b>24<math>\alpha</math> rDNA</b>	<b>110</b>	<b>120</b>	<b>125</b>	<b>110</b>	<b>110/125</b>	<b>125</b>	<b>TcIIa,c,d</b>

Fonte: Yeo et al. 2005.

#### **4.4.3.1 Amplificação do domínio divergente D7 do gene 24Sα rRNA**

A amplificação por PCR do domínio divergente D7 do gene RNA ribossômico 24Sα foi realizada com os iniciadores D71 (5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3') e D72 (5'-TTTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'), como descrito por Souto e Zingales (1993). A reação foi realizada com um volume final de 22μ contendo 10mM Tris-HCL (pH=9,0), 50mM de KCL, 3,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,65 unidades de *Taq* DNA-polimerase (Promega, Madison, WI, USA), 0,1% Triton X-100, 0,2mM de cada dNTP, 10pmol de cada iniciador, 1ng/μL de DNA e 30μL de óleo mineral. Após desnaturação pelo calor (4 min) a 94°C, as amostras foram submetidas a 30 ciclos de três temperaturas 94°C (1 min) 60°C (1min) e 72°C (1min) seguidos por uma elongação final de (5 min) a 72°C. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados pelo nitrato de prata a 0,2%.

#### **4.4.3.2 Amplificação do domínio de tamanho variável do gene 18S rRNA**

Para essa PCR foram utilizados os iniciadores V1 (5'-CAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCA-3') e V2 (5'-TTGAGGGAAGGCATGACACATGT-3'). A reação foi realizada em um volume final de 22μL contendo 10mM Tris-HCL (pH=9,0), 50mM de KCL, 3,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,65 unidades de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, WI, USA), 0,1% Triton X-100, 0,2mM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador, 1ng/μL de DNA e 30μL de óleo mineral. A amplificação constituiu em 30 ciclos (1 min) a 94°C, (1 min) a 50°C, (1 min) a 72°C, seguidos por uma elongação final de (5 min) a 72°C. Os produtos amplificados (Quadro 1) foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados pelo nitrato de prata a 0,2% (Yeo et al. 2005).

#### **4.4.3.3 Amplificação do espaçador não transcrito do gene de mini-exon**

Para essa PCR foram utilizados os seguintes iniciadores: TC (5'-CCCCCTCCCAGGCCACACTG-3'), TCI (5'-GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC-3') e TC2 (5'-CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG-3'). A reação foi realizada em um volume final de 22µL contendo 10mM Tris-HCL (pH=9,0), 50mM de KCL, 3,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,65 unidades de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, WI, USA), 0,1% Triton X-100, 0,2mM de cada dNTP, 10pmol de cada iniciador, 1ng/µL de DNA e 30µL de óleo mineral. A amplificação consistiu em 27 ciclos (30s a 94°C, 30s a 55°C 30s a 72°C) seguidos por elongação final de 5 min, a 72°C. Os produtos amplificados (Quadro1) foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados pelo nitrato de prata a 0,2% (Yeo et al. 2005).

### **4.5 Variabilidade genética do kDNA dos isolados do *T. cruzi***

Para a análise da variabilidade genética entre os isolados do *T. cruzi* foi realizada a caracterização da região variável dos minicírculos do kDNA por meio da técnica de LSSP-PCR em isolados do parasito de 30 hemoculturas, sendo que em cada hemocultura o material biológico foi aliquotado em sete tubos, resultando assim á analise de 84 tubos positivos.

#### **4.5.1 LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer-PCR*)**

A obtenção das assinaturas gênicas do kDNA do *T. cruzi* foi realizada pela técnica de LSSP-PCR.

Essa reação foi realizada em duas etapas: a primeira constitui na amplificação específica (PCR) de um fragmento de 330pb, que serviu como DNA molde para a reação de LSSP-PCR em uma segunda etapa de amplificação. Essa técnica exige uma quantidade aproximada de 15ng do DNA molde para ser realizada (Vago et al. 1996a).

O produto da amplificação do kDNA do *T. cruzi* pela PCR correspondente à banda de 330pb, foi purificado com gel de agarose 1,5% TBE 1X (89mM Tris-borato, 2mM EDTA pH 8,0) preparado com água bidestilada estéril em presença de 0,5µg/ml de brometo de etídeo. As bandas com 330pb foram visualizadas com um transiluminador de luz ultravioleta de comprimento de onda longa e coletada com o auxílio de um bisturi estéril. Após o aquecimento em banho-maria as amostras foram homogeneizadas e diluídas 1:10 com água mili-Q estéril e usadas como DNA molde para as reações de LSSP-PCR (Vago et al. 1996b e 2000).

Sabendo que a reação de LSSP-PCR ocorre em condições de baixa estringência e especificidade e que a presença de qualquer DNA contaminante impede a reprodutibilidade da técnica todos os procedimentos foram realizados em condições de esterilidade química e bacteriológica como, por exemplo: a desinfecção da cuba de eletroforese com HCl 0,25N e NaOH 0,5N (30 minutos cada) e água bidestilada estéril; a exposição de todo material utilizado (inclusive a cuba de eletroforese) à radiação ultravioleta (30 min); a corrida de eletroforese com a cuba coberta com filme plástico; a aplicação do DNA no gel de agarose com intervalo de uma canaleta vazia entre cada amostra.

Nas reações de LSSP-PCR as amostras de DNA foram re-amplificadas utilizando um único iniciador específico (correspondente ao iniciador 121 com 21pb) denominado S35G (5'-AAATAATGTACGGGGGAGATG-3'). A mistura da reação teve um volume final de 10µl contendo 10mM Tris-HCl (pH8,5), 0,1% Triton X-100, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase (PROMEGA, MADISON, WI-USA) 45pmol do iniciador e 3µl de DNA (fragmento de 330pb purificado em agarose e diluído 1:10) cobertos com 30µl de óleo mineral.

A amplificação passou por 40 ciclos envolvendo desnaturação a 94°C (1 min), anelamento a 30°C (1 min) e extensão a 72°C (1 min), precedidos de desnaturação iniciada 94°C (5 min) e extensão adicional a 72°C durante (7 min) em um termociclador MJ *Research* PTC-100. Os produtos de LSSP-PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% e corados pelo nitrato de prata 0,2%.

## 4.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos de amplificação por meio da PCR foram analisados em géis de poliacrilamida não desnaturante, em diferentes concentrações: para a PCR específica do kDNA foi utilizado a 6%, e para as técnicas de amplificação do 24S $\alpha$  rDNA, 18S rDNA, mini-exon e LSSP-PCR a 7,5%.

Uma amostra de 3 a 5 $\mu$ L do produto amplificado, diluída com igual volume do tampão da amostra 2X (0,5% de xileno-cianol; 60% de glicerol) foi aplicada em cada canaleta. A corrida eletroforética, em geral, foi realizada a 80-100V durante aproximadamente 3 horas, ou seja, com a migração de 6-7cm do corante xileno-cianol. O tamanho das bandas amplificadas foi monitorado com marcadores moleculares de 100pb.

Após a eletroforese os géis foram transferidos para solução fixadora (etanol absoluto 10%, ácido acético 0,5%) durante 5 minutos. As bandas de DNA foram reveladas pela coloração com 0,2% de nitrato de prata (Ag/NO<sub>2</sub>), em solução fixadora durante 10 minutos, seguidas pela redução dos sais de prata com NaOH 3% (v/v) e 0,3% de formaldeído (37%) durante 10 minutos como descrito por Santos et al. (2002). Após o aparecimento das bandas a revelação foi interrompida com solução fixadora, e os géis fotografados.

## **4.6 Análise dos perfis de LSSP-PCR e construção dos fenogramas**

Os perfis de bandas das populações do *T. cruzi* obtidos pelas reações de LSSP-PCR como a construção dos fenogramas foram obtidos pelas análises realizadas pelo programa GEL COMPAR® II versão 5.0 produzido pela Applied Maths NV 2007.

## **4.7 Análise estatística**

A análise descritiva foi realizada a partir das porcentagens e valores absolutos apresentados em tabelas e gráficos.

A avaliação das variáveis numéricas foi realizada pelo cálculo das medidas descritivas: (1) medidas de centralidade (média e mediana); (2) de dispersão (mínimo, máximo, desvio padrão-DP, coeficiente de variação-CV, percentis 25 e 75).

Para as comparações entre grupos (Estados da Federação, idade, idade gestacional das pacientes, porcentagens de bandas compartilhadas nos perfis de LSSP-PCR, número de bandas nos perfis de LSSP-PCR) foram utilizados os testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis (quando os dados não apresentaram distribuição normal e homogênea). Para comparações entre apenas dois grupos, foi usado o teste de Mann-Whitney (quando os dados não apresentaram distribuição normal e homogênea). Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%. Os dados foram analisados com o auxílio dos softwares Statistica® v7 e MSEXcel®.

## 5-RESULTADOS

### 5.1 Origem dos pacientes

Dos 30 isolados analisados 75% (25/30) eram provenientes de gestantes e 25% (5/30) não gestantes. As pacientes são de quatro regiões brasileiras distintas sendo elas dos Estados da Bahia 53,3% (16/30), Goiás 40,0% (12/30), Paraíba 3,3% (1/30) e Distrito Federal 3,3% (1/30). Todos os dados referentes às pacientes estão no Anexo I.

### 5.2 Hemocultura

#### 5.2.1 Positividade por número de tubos

Foram processadas 30 amostras, as quais cada amostra corresponde a uma paciente. Segundo a técnica de Chiari et al. (1989) e Luz et al. (1994), 30ml de sangue foi processado e a papa de hemácias aliquoteada em 7 tubos contendo LIT, perfazendo um total de 210 tubos. Destes, apenas 84 se mostraram positivos e foram submetidos a análises da variabilidade genética pela técnica de LSSP-PCR, como demonstrado no Quadro 2.

**Quadro 2:** Positividade por número de tubos obtidos pela técnica de hemocultura de 30 mulheres chagásicas crônicas, analisados pela LSSP-PCR.

Total de tubos positivos		
Nº de tubos	Nº de pacientes	Nº total de tubos analisados

1	6	6
2	12	24
3	3	9
4	3	12
5	4	20
6	1	6
7	1	7
<b>28</b>	<b>30</b>	<b>84</b>

### **5.3 Caracterização dos grupos e subgrupos das populações de *T. cruzi***

Os isolados do *T. cruzi* foram caracterizados pela análise de diferentes alvos do rRNA (24S $\alpha$  e 18S) e mini-exon, em diferentes grupos e subgrupos (Yeo et al. 2005). Este método evidenciou o TCII em 100% das populações isoladas de *T. cruzi* circulantes nas regiões estudadas, pertencentes ao subgrupo TCIIb/e (96,66%) e TCIIId (3,33%) este último corresponde a uma amostra do grupo controle do Estado da Bahia como demonstrado na canaleta 23 (Figura 2). Com produtos amplificados de 110pb e 125pb para o gene 24S $\alpha$  (rRNA), 165pb para o gene 18S rRNA e 300pb para amplificação dos gene do mini-exon. Como demonstrados na Figuras 2, 3 e 4 respectivamente e no Quadro 1.





**Figura 2:** Gel de poliacrilamida a 7,5% corado com 0,2% de nitrato de prata, representativo da PCR com os iniciadores D71 e D72, amplificando as bandas 100/125pb do gene 24S $\alpha$  rRNA. MM- marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01-controle 110pb, 02- 575, 03-576, 04-577, 05-581, 06-587, 07-590, 08-592, 09-593, 10-596, 11-597, 12-600, 13-603, 14-605, 15-608, 16-609, 17-610, 18-611, 19-controle 110pb, 20-625, 21-626, 22-627, 23-629, 24-631, 25-632, 24-633, 25-634, 26-636, 27-637, 28-641, 29-644, 30-668 e MM- marcador molecular.



**Figura 3:** Gel de poliacrilamida a 7,5% corado com 0,2% de nitrato de prata, representativo da PCR com os iniciadores TC, TC1 e TC2, amplificando as bandas de 300pb do gene mini-exon. MM- marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01-controle 330pb, 02- 575, 03-576, 04-577, 05-581, 06-587, 07-590, 08-592, 09-593, 10-596, 11-597, 12-600, 13-603, 14-605, 15-controle 330pb, 16-608, 17-609, 18-610, 19-611, 20-controle330pb, 21-625, 22-626, 23-627, 24-629, 25-631, 26-632, 27-633, 28-634, 29-636, 30-637, 31-641, 32-644, 33-668, 34-controle 330pb e MM- marcador molecular.



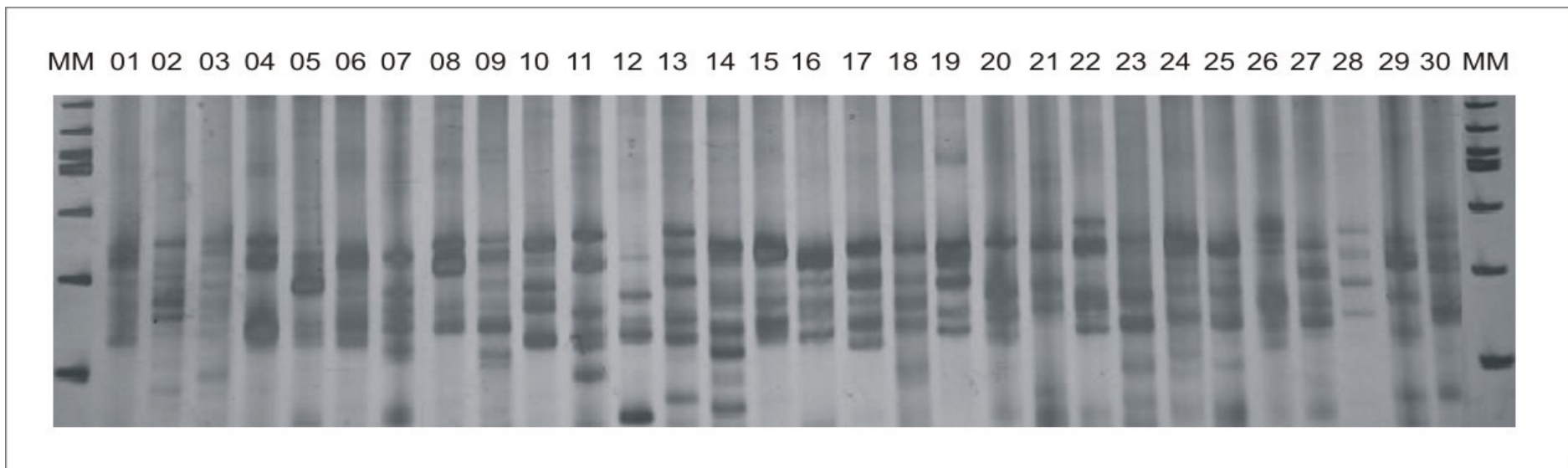
**Figura 4:** Gel de poliacrilamida a 7,5% corado com 0,2% de nitrato de prata, representativo da PCR com os iniciadores V1 e V2 amplificando as bandas de 165pb do gene 18S rRNA. MM- marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01-controle 165pb, 02- 575, 03-576, 04-577, 05-581, 06-587, 07-590, 08-592, 09-593, 10-596, 11-597, 12-600, 13-603, 14-605, 15-608, 16-609, 17-610, 18-611, 19-625, 20-626, 21-627, 22-629, 23-631, 24-632, 25-633, 26-634, 27-636, 28-637, 29-641, 30-644, 31-668, 33controle 165pb e MM- marcador molecular.

## **5.4 Comparação da variabilidade genética do kDNA entre os 30 isolados**

A LSSP-PCR demonstrou a variabilidade genética entre as 30 amostras analisadas, como pode ser observado no gel representado pela Figura 5 com a média de  $24,08 \pm 14,4\%$  de compartilhamento de bandas entre os pares, apresentando o máximo de 66,7% de similaridade entre os isolados 5 e 6, 23 e 25 e 1 e 30, demonstrado na Figura 6.

As pacientes 1 e 30 são de regiões geográficas bem distintas a primeira é de Catolé do Rocha-PB e a segunda de Baianópolis-BA apresentando 66,7% de compartilhamento de bandas. A paciente 5 é de Santa Maria da Vitória-BA e a 6 é de Morrinhos-GO ambas apresentaram 66,7% de compartilhamento de bandas. A paciente 23 é de Pilar-GO e a paciente 25 de Itauçu-GO ambas apresentaram 66,7%. As pacientes 22 e 27 são da mesma cidade (Formosa-GO) onde se observa 62,5% de bandas compartilhadas. A paciente 9 é de Sítio d' Abadia-GO e a 13, de Correntina-BA apesar de geograficamente distintas essas cidades são próximas. Essas similaridades podem ser avaliadas em destaque no fenograma representado pela Figura 6.





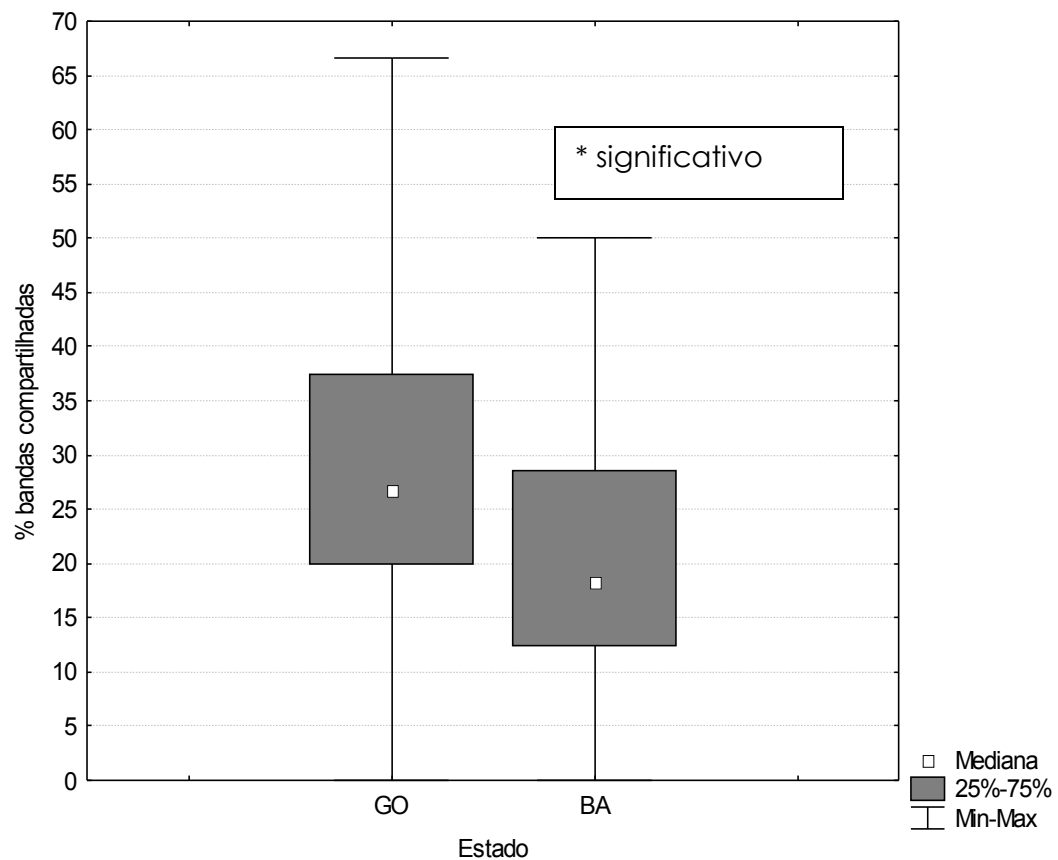
**Figura 5:** Caracterização do kDNA dos isolados do *T. cruzi* pela LSSP-PCR: gel de poliacrilamida a 7,5% corado com 0,2% de nitrato de prata. MM-marcador molecular, caneleta-amostra correspondente: 01-575, 02-576, 03-577, 04-581, 05-587, 06-590, 07-592, 08-593, 09-596, 10-597, 11-600, 12-603,

13-605, 14-608, 15-609, 16-610, 17-611, 18-625, 19-626, 20-627, 21-629, 22-631, 23-632, 24-633, 25-634, 26-636, 27-637, 28-641, 29-644, 30-668 e MM-marcador molecular.



## 5.5 Comparação da variabilidade genética do kDNA entre os isolados da Bahia e Goiás

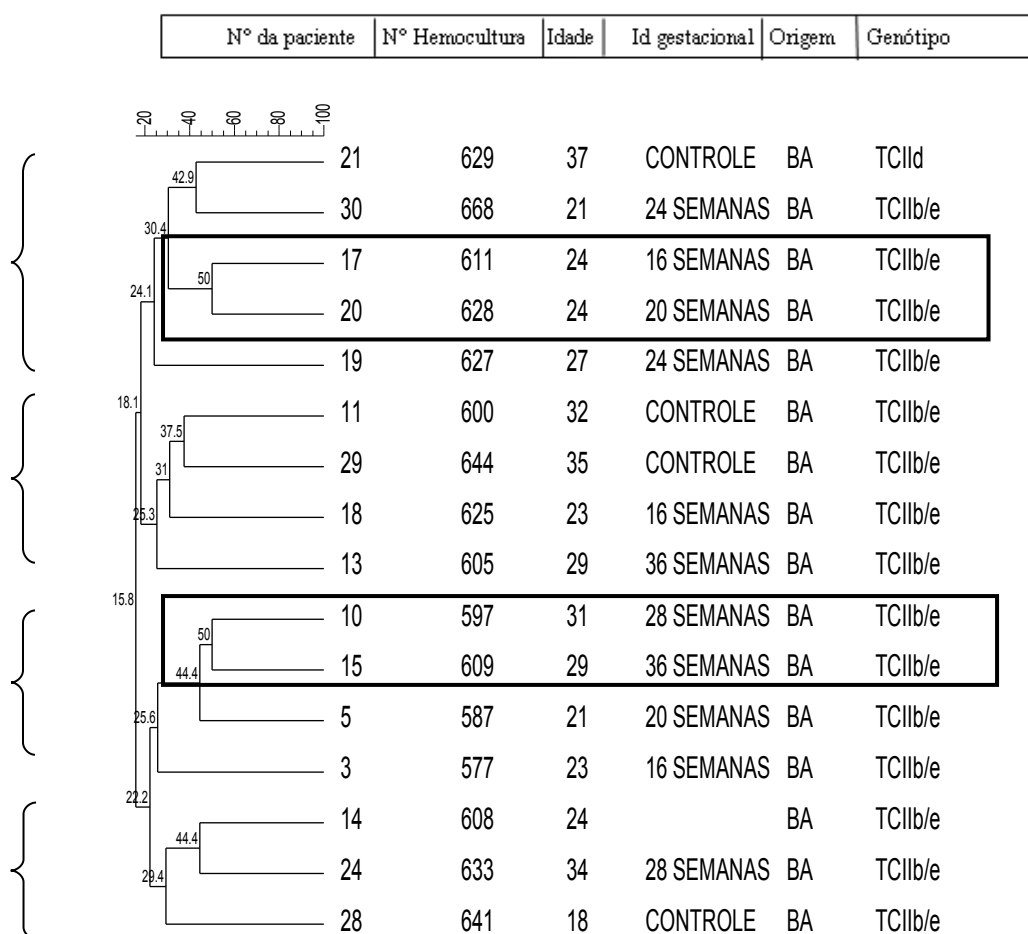
Houve diferença estatisticamente significativa entre os isolados obtidos das pacientes provenientes da BA e GO em relação ao compartilhamento de bandas (Mann-Whitney;  $p = 0,00029$ ). Como demonstrado na Tabela 1 (Anexo II) e na Figura 7.



**Figura 7:** Comparação da distribuição da naturalidade das mulheres infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* dos estados da Bahia e de Goiás.

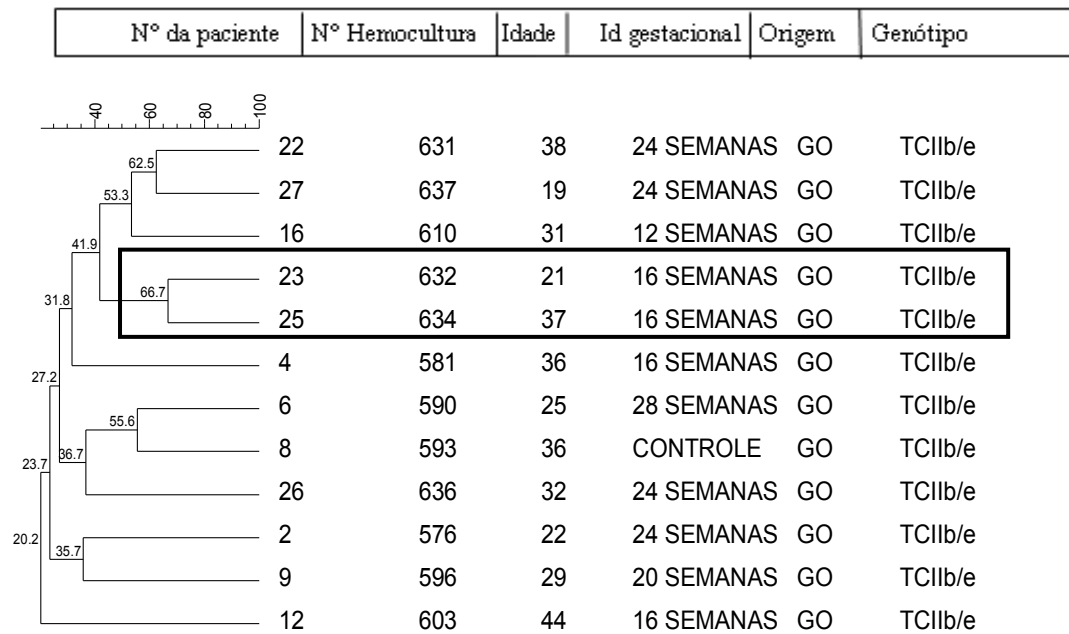
A média de compartilhamento de bandas entre pacientes da Bahia foi de 20,99 ± 12,96% com o compartilhamento máximo de 50,00% entre os pares 10 e 15 e 17 e 20, como demonstrado em destaque na Figura 8.

No fenograma representado pela Figura 8 observa-se claramente a formação de quatro braços distintos entre os isolados do Estado da Bahia.



**Figura 8:** Fenograma mostrando a distância entre as populações de *Trypanosoma cruzi* isolados pela técnica de hemocultura e analisada pela LSSP-PCR das pacientes do Estado da Bahia.

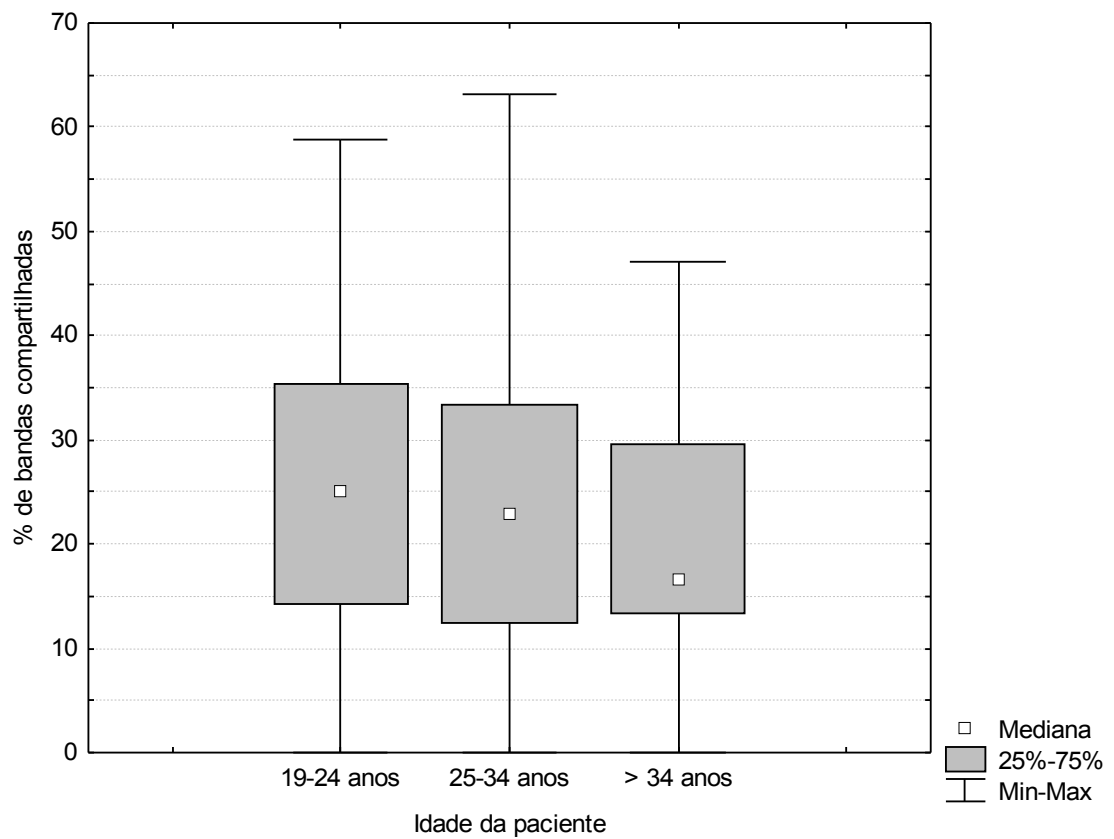
A média de compartilhamento de bandas entre pacientes de Goiás foi de 27,94 ± 13,31% com o compartilhamento máximo de 66,7% entre os pares 23 e 25 como demonstrado em destaque na Figura 9.



**Figura 9:** Fenograma mostrando a distância entre as populações de *Trypanosoma cruzi* isoladas pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR das pacientes do Estado de Goiás.

## 5.6 Comparação da variabilidade genética do kDNA dos estoques de *T. cruzi* por faixa etária

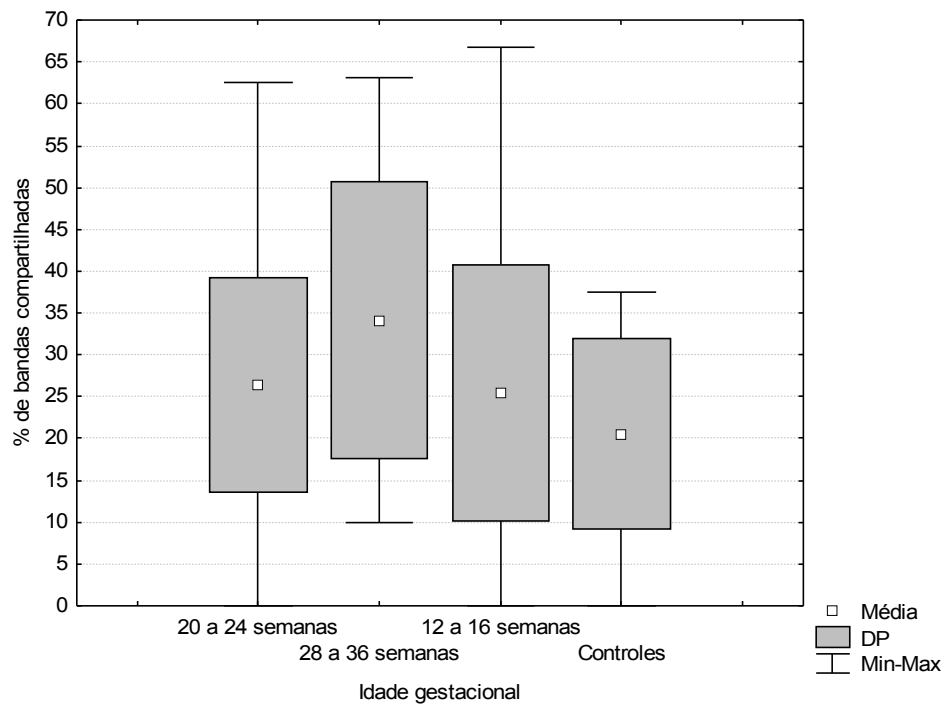
Não houve diferença significativa entre porcentagens de bandas compartilhadas em relação a faixa etária (Kruskal-Wallis;  $p = 0,3227$ ). Como demonstrado no Quadro 3 (Anexo II) e na Figura 10.



**Figura 10:** Distribuição dos isolados de mulheres infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, na fase crônica pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR de acordo com a faixa etária.

## 5.7 Comparação da variabilidade genética do kDNA dos estoques de *T. cruzi* por idade gestacional

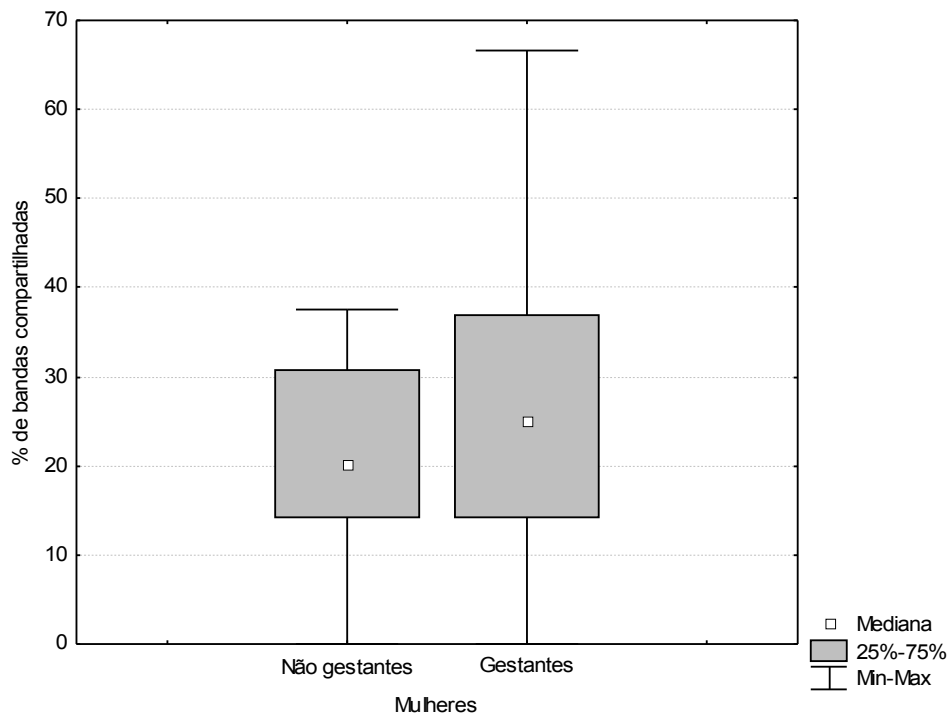
Não houve diferença significativa entre porcentagens de bandas compartilhadas com relação às idades gestacionais (ANOVA;  $p = 0,191$ ). Como demonstrado na Quadro 4 (AnexoII) e na Figura 11.



**Figura 11:** Distribuição dos isolados de mulheres infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, na fase crônica, pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR de acordo com a idade gestacional.

## 5.8 Comparação da variabilidade genética do kDNA dos estoques de *T. cruzi* das gestantes e não gestantes

Não houve diferença significativa entre porcentagens de bandas compartilhadas nos isolados das gestantes quando comparadas com o grupo de mulheres não gestantes (Mann-Whitney,  $p = 0,257$ ). Como demonstrado na Quadro 5 (Anexo II) e na Figura 12.

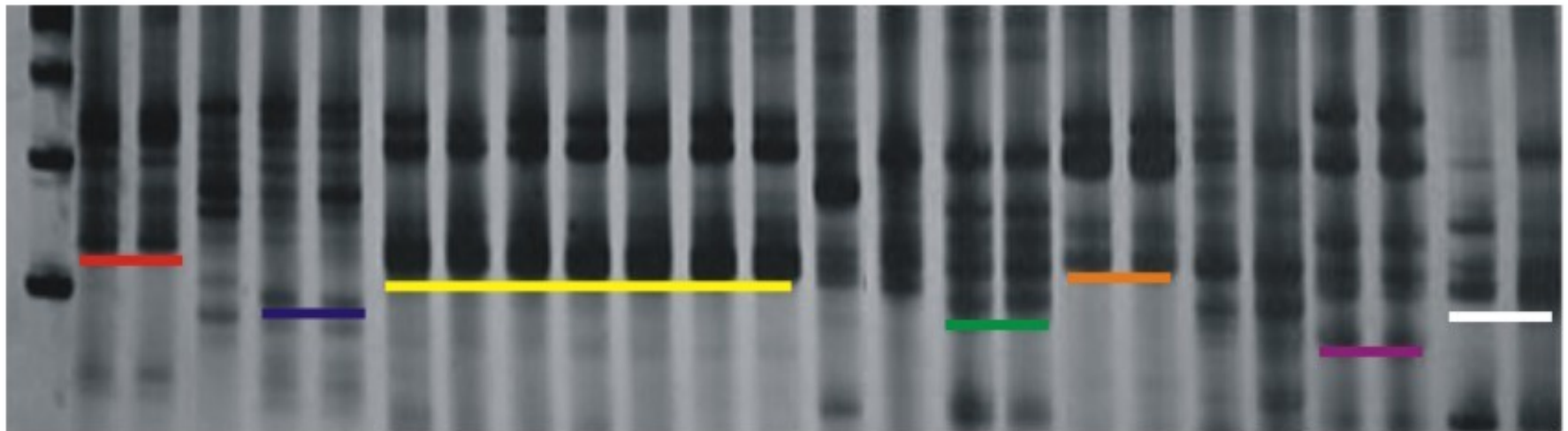


**Figura 12:** Distribuição dos isolados de mulheres infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, na fase crônica pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR do grupo de gestantes e de mulheres não gestantes.

## **5.9 Comparação da variabilidade genética do kDNA entre os isolados obtidos em tubos diferentes por hemocultura da mesma paciente**

Nas Figuras 13, 15, 17 e 19 estão representados os géis com os perfis genéticos obtidos de diferentes tubos por hemocultura da mesma paciente, para a verificação de bandas compartilhadas entre elas, enquanto que nas Figuras 14, 16, 18 e 20 estão os fenogramas correspondentes às mesmas amostras.

MM 01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



**Figura 13:** Caracterização do kDNA dos isolados do *T. cruzi* pela LSSP-PCR: gel de poliacrilamida a 7,5%, corado com 0,2% de nitrato de prata. MM-marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01- 575a, 02-575b, 03-576, 04-577a, 05-577b, 06-581a, 07-581b, 08-581c, 09-581d, 10-581e, 11-581f, 12-581g, 13-587a, 14-590a, 15-592a, 16-592b, 17-593a, 18-593b, 19-596, 20-597, 21-600a, 22-600b, 23-603a, 24-603b.

Canaleta 3, 13 e 14, 19 e 20, são amostras de pacientes que tiveram somente um tubo positivo na hemocultura.

Nas canaletas 01 e 02 correspondente a amostra 575 (a e b) houve 90,91% de bandas compartilhadas.

As 04 e 05 são correspondentes as amostras 577 (a e b) houve 50,00% de compartilhamento de bandas e pode se observar pela análise no fenograma que elas se localizam em braços opostos.

Das canaletas 06 a 12 correspondem a amostra 581 apresentando uma média  $46,81 \pm 23,19\%$  de bandas compartilhadas com mínimo de 0% entre as amostras 581e e 581b e máximo de 85,72% com as amostras 581f e 581g. Como observado na Figura 14 as amostras 581a e 581b estão localizadas em braços diferentes da árvore em relação com as amostras 581a, 581d, 581e, 581f e 581g.

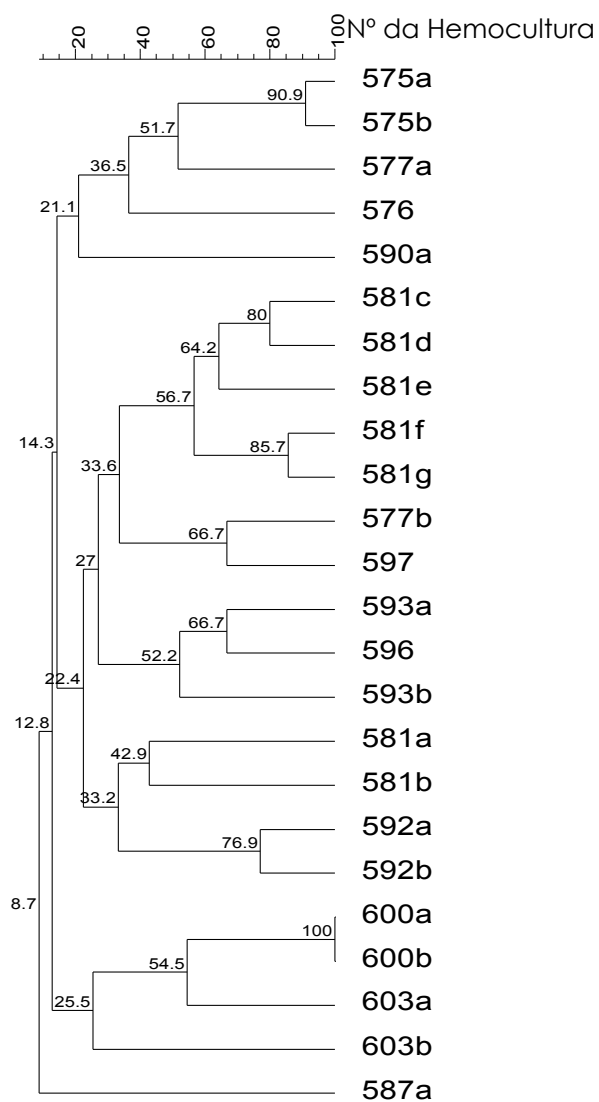
As canaletas 15 e 16 correspondentes as 592 (a e b) apresentaram 76.93% de bandas compartilhadas.

As canaletas 17 e 18 correspondentes as 593 (a e b) apresentaram 60,00% de bandas compartilhadas.

As canaletas 21 e 22 correspondentes as 600 (a e b) apresentaram 100.00% de bandas compartilhadas.

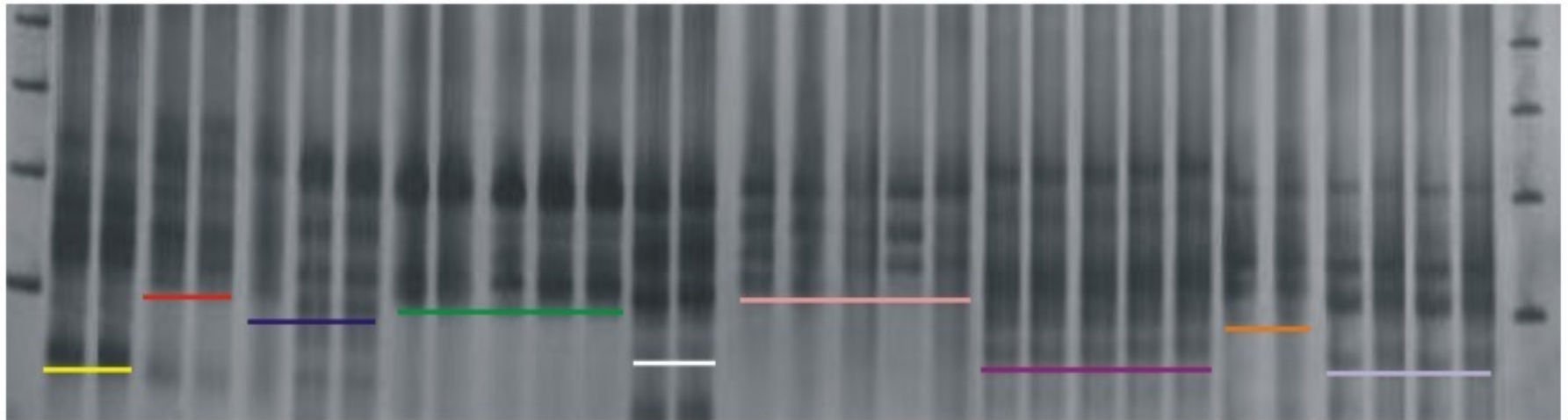
As canaletas 23 e 24 correspondentes as 603 (a e b) apresentaram 40.00% de bandas compartilhadas.

As amostras descritas anteriormente estão apresentadas na Figura 14.



**Figura 14:** Fenograma mostrando a distância entre as populações de *Trypanosoma cruzi* das amostras 575 a 603 isoladas de mulheres infectadas na fase crônica pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR.

MM 01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 MM



**Figura 15:** Caracterização do kDNA dos isolados do *T. cruzi* pela LSSP-PCR: gel de poliacrilamida a 7,5%, corado com 0,2% de nitrato de prata. MM- marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01- 603a, 02-603b, 03-605a, 04-605b, 05-608a, 06-608b, 07-608c, 08-609a, 09-609b, 10-609c, 11-609d, 12-609e, 13-610a, 14-610b, 15-611a, 16-611b, 17-611c, 18-611d, 19-611e, 20-625a, 21-625b, 22-625c, 23-625d, 24-625e, 25-627a, 26-627b, 27-628a, 28-628b, 29-628c, 30-628d e MM- marcador molecular.

Nas canaletas 01 e 02 correspondente a amostra 603 (a e b) houve 54,55 % de bandas compartilhadas.

Nas canaletas 03 e 04 correspondente a amostra 605 (a e b) houve 66,67% de bandas compartilhadas.

Das canaletas 05 a 07 correspondente a amostra 608 (a, b e c) houve uma de média  $45,42 \pm 16,49\%$  de bandas compartilhadas com máxima de 61,54% entre as amostras 608d e 608c e mínima de 28,57% entre as amostras 608a e 608b.

Das canaletas 08 a 12 correspondente a amostra 609 (a, b, c, d, e) houve uma média  $54,75 \pm 16,40\%$  de bandas compartilhadas com máxima de 80,01% entre as amostras 609d e 609e e mínima de 22,23% entre as amostras 625b e 625c.

Nas canaletas 13 e 14 correspondente a amostra 610 (a e b) houve 40% de bandas compartilhadas.

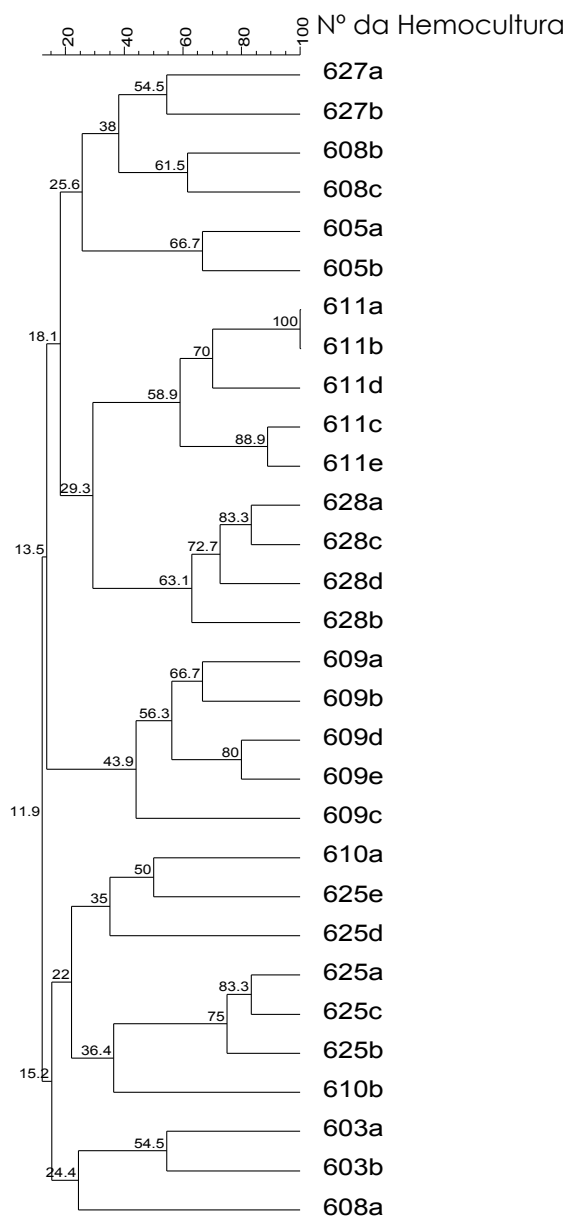
Das canaletas 15 a 19 correspondente a amostra 611 (a, b, c, d, e) houve uma média  $68,23 \pm 20,23\%$  de bandas compartilhadas com máxima de 100,00% entre as amostras 611a e 611b e mínima de 44,45% entre as amostras 611a e 611e.

Das canaletas 20 a 24 correspondente a amostra 625 (a, b, c, d, e) houve uma média  $41,76 \pm 27,48\%$  de bandas compartilhadas com máxima de 83,33% entre as amostras 625b e 625c e mínima de 15,39% entre as amostras 625a e 625e.

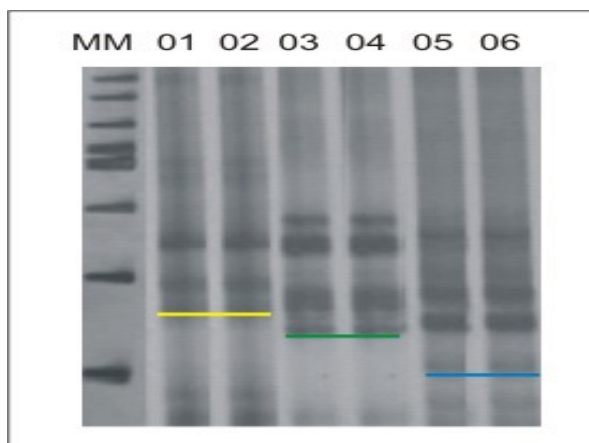
Nas canaletas 25 e 26 correspondente a amostra 627 (a e b) houve 54,55% de bandas compartilhadas.

Das canaletas 27 a 30 correspondente a amostra 628 (a, b, c, d) houve uma média  $69,7 \pm 11,05\%$  de bandas compartilhadas com máxima de 83,33% entre as amostras 628a e 628c e mínima de 50,00% entre as amostras 628c e 628b.

As amostras descritas anteriormente estão apresentadas na Figura 16.



**Figura 16:** Fenograma mostrando a distância entre as populações de *Trypanosoma cruzi* das amostras 603 a 628 isoladas de mulheres infectadas na fase crônica, pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR.



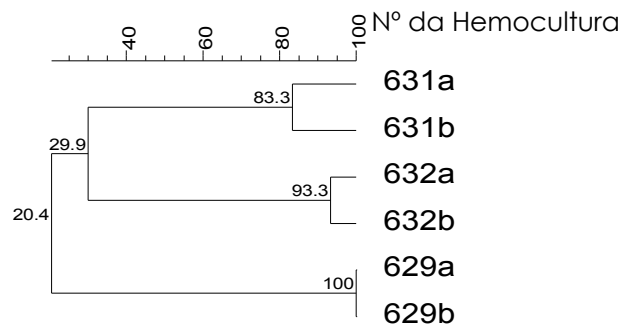
**Figura 17:** Caracterização do kDNA dos isolados do *T. cruzi* pela LSSP-PCR: gel de poliacrilamida a 7,5% corado com 0,2% nitrato de prata. MM marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01-629a, 02-629b, 03-631a, 04-631b, 05-632a, 06-632b.

Nas canaletas 01 e 02 correspondente a amostra 629 (a e b) houve 100,00% de bandas compartilhadas.

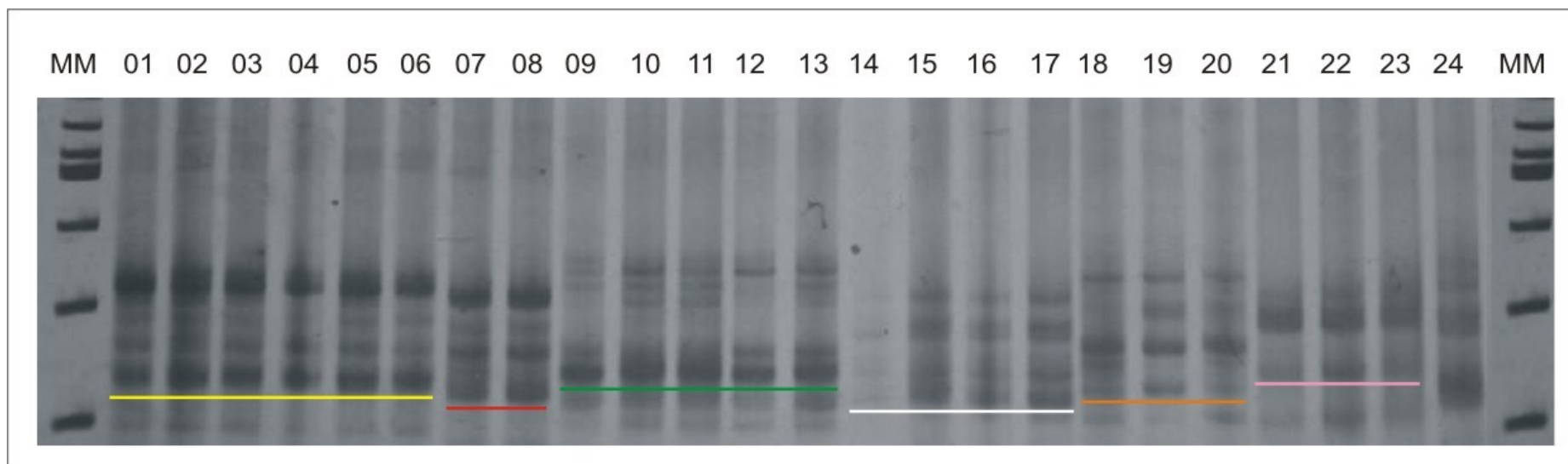
Nas canaletas 03 e 04 correspondente a amostra 631 (a e b) houve 83,33% de bandas compartilhadas.

Nas canaletas 05 e 06 correspondente a amostra 632 (a e b) houve 93,33% de bandas compartilhadas.

As amostras descritas anteriormente estão apresentadas na Figura 18.



**Figura 18:** Fenograma mostrando a distância entre as populações de *Trypanosoma. cruzi* das amostras 629 a 63 isoladas de mulheres infectadas na fase crônica pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR.



**Figura 19:** Caracterização do kDNA dos isolados do *T. cruzi* pela LSSP-PCR: gel de poliacrilamida a 7,5%, corado com 0,2% de nitrato de prata. MM marcador molecular, canaleta-amostra correspondente: 01-633a, 02-633b, 03-633c, 04-633d, 05-633e, 06-633f, 07-634a, 08-634b, 09-636a, 10-636b, 11-636c, 12-636d, 13-636e, 14-637a, 15-637b, 16-637c, 17-637d, 18-641a, 19-641b, 20-641c, 21-644a 22-644b, 23-644c 24-668 e MM marcador molecular.

Das canaletas 01 a 06 correspondente a amostra 633 (a, b, c, d, e) houve a média  $70,06 \pm 20,31\%$  de bandas compartilhadas com máxima de 100,00% entre as amostras 633c e 633d; 633a e 633b; 633e e 633f e mínima de 36,37% entre as amostras 633a e 633e.

Nas canaletas 07 e 08 correspondente a amostra 634 (a e b) houve 100,00% de bandas compartilhadas.

Das canaletas 09 a 13 correspondente a amostra 636 (a, b, c, d, e) houve a média  $92,04 \pm 4,53\%$  de bandas compartilhadas com máxima de 100,00% entre as amostras 636c e 636d e mínima de 85,72% entre as amostras 636a e 636e.

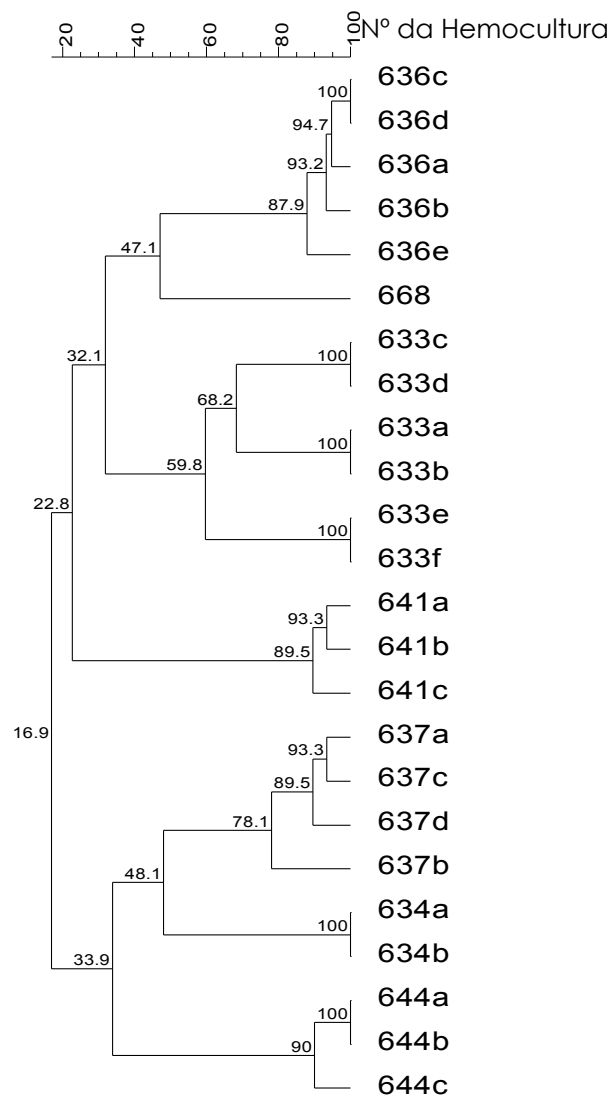
Das canaletas 14 a 17 correspondente a amostra 637 (a, b, c, d) houve a média  $84,42 \pm 10,04\%$  de bandas compartilhadas com máxima de 93,33% entre as amostras 637a e 637c; 637c e 637d e mínima de 66,67% entre as amostras 637d e 637b.

Das canaletas 18 a 20 correspondente a amostra 641 (a, b e c) houve a média  $90,79 \pm 4,39\%$  de bandas compartilhadas com máxima de 93,33% entre as amostras 641a e 641b e 641b e 641c e mínima de 85,72% entre as amostras 641a e 641c.

Das canaletas 21 a 23 correspondente a amostra 644 (a, b e c) houve a média  $93,33 \pm 11,54\%$  de bandas compartilhadas com máxima de 100,00% entre as amostras 644a e 644b e 644b e 644c e mínima de 80,01% entre as amostras 644a e 644c.

As amostras descritas anteriormente estão apresentadas na Figura 20.

Na estratificação das amostras com mais de um tubo analisado chegamos a um total de 24 pacientes enquanto que as outras 06 amostras eram tubos individuais, demonstrando que 25% das amostras tiveram entre 40 e 50% de compartilhamento de bandas, 37,5% tiveram entre 54 a 77% de compartilhamento de bandas e 37,5% tiveram entre 83 a 100% de compartilhamento de bandas.



**Figura 20:** Fenograma mostrando a distância entre as populações de *Trypanosoma cruzi* das amostras 633 a 668 isoladas de mulheres infectadas na fase crônica pela técnica de hemocultura, analisada pela LSSP-PCR.

## 6- DISCUSSÃO

*T. cruzi* possui uma estrutura heterogênea representada por populações que circulam entre os homens, vetores, reservatórios silvestres e animais domésticos (Brenner 1977). Tais diferenças são detectadas por suas diferenças biológicas e genéticas. A caracterização genética tem fornecido importantes dados sobre a epidemiologia e patogenia deste protozoário.

Linhagens de *Trypanosoma cruzi* têm sido identificadas a partir de isolados utilizando análises bioquímicas e moleculares (Souto et al. 1996; Fernandes et al. 1998; Brisse et al. 2000; Brisse et al. 2001 e Diosque et al. 2003).

Esse trabalho compara pela primeira vez o perfil genético de dois grupos, gestantes e não gestantes informações não encontradas na literatura.

Em nosso estudo, TCII correspondente ao ciclo doméstico foi encontrado em todos isolados onde em sua maioria encontramos TCIIb/e (96,66%) e em apenas um isolado foi identificado TCII d (3,33%). O predomínio dos subgrupos TCIIb/e e TCII d está de acordo com a literatura, visto que estes são predominantes em humanos e vetores domésticos (*T. infestans*) nos países do cone sul da América do Sul (De Luca D'oro et al. 1993; Barnabé et al. 2001; Di Noia et al. 2002; Freitas et al. 2005; Virreira et al. 2006). Os dados encontrados relacionados ao TCII (100%) estão de acordo com a literatura que mostram o predomínio do TCII (Freitas et al. 2005; Lages-Silva et al. 2006) e do subgrupo TCIIb/e (Higo et al. 2004). Lages-Silva et al. 2006 observou que o *T. cruzi* II foi detectado em todos os pacientes incluindo aqueles sem alterações clínicas e também foram encontradas associações com diferentes sintomas e vários processos patológicos em todas as formas clínicas da doença, embora o *T. cruzi* I esteja presente no ciclo de transmissão silvestre na região do Triângulo Mineiro.

Vieira et al. 2006 mostraram em seus resultados que os subgrupos do *T. cruzi* TCIIb TCII d e TCII e assim como as diferentes variantes do subgrupo TCII d podem induzir infecção congênita. As frequências das linhagens TCII d são similares em neonatos e adultos que vivem na mesma localidade geográfica. Os recém-nascidos infectados pelo TCII d mostraram-se assintomáticos, ou formas clínicas fatais e severas da doença de Chagas congênita tanto com baixa ou alta parasitemia. Seus resultados mostraram que independentemente da sua frequência de distribuição três

subgrupos diferentes de *T. cruzi* TCIIb TCIIc e TCIIe podem ser transmitidos de mães envolvidas na infecção congênita.

A presença de apenas um isolado caracterizado como TCIIc, de uma paciente do grupo controle da Bahia, correspondente a amostra 629 o qual também circula em elevada frequência entre a população humana no ciclo doméstico de transmissão da doença de Chagas em regiões da Argentina e da Bolívia (Virreira et al. 2006; Burgos et al. 2007).

Não foi detectado TCIIa e o TCIIc em nenhum dos isolados estudados neste trabalho, o que já era esperado, pois este genótipo é típico da região norte. Dados referentes à distribuição desses genótipos entre pacientes com doença de Chagas são raros, o TCIIa é predominante em áreas endêmicas ao norte da Bacia Amazônica e nos EUA, e o TCIIc, na Bacia Amazônica e nos países do cone Sul, principalmente no meio silvestre (dados não publicados, apud Yeo et al. 2005), havendo relatos de sua presença na Guatemala e Peru (Higo et al. 2004).

A LSSP-PCR tem mostrado que a variabilidade genética do kDNA do *T. cruzi* é um dos fatores mais determinantes na patogênese da doença de Chagas (Andrade et al. 1999; Vago et al. 2000). A técnica de LSSP-PCR é capaz de detectar simples ou múltiplas variações nos fragmentos do DNA alvo e tem sido utilizada nos estudos das doenças genéticas (Pena et al. 1994), e caracterização genética de diversos microorganismos (Villa et al. 1995; Gomes et al. 1997; Oliveira et al. 2003).

A variabilidade genética do kDNA dos isolados demonstrada pela LSSP-PCR permitiu observar  $24,08 \pm 14,4\%$  de compartilhamento de bandas entre os pares de isolados das pacientes gestantes e não gestantes de quatro regiões distintas do Brasil onde cada paciente apresentava um perfil único e exclusivo de assinatura gênica, corroborando os dados aqui encontrados com os de Pena et al. 1994; Barreto et al. 1996; onde em seus trabalhos descreveram que a variabilidade genética apresentada nos perfis de LSSP-PCR apresentou assinaturas gênicas altamente variáveis para indivíduos analisados, onde apresenta perfis distintos entre pacientes sem algum parentesco.

A caracterização da região variável do kDNA das populações do *T. cruzi* isoladas de pacientes de diferentes regiões da Bahia e Goiás pela LSSP-PCR,

realizada no presente trabalho, demonstrou uma ampla heterogeneidade do parasito evidenciada pela baixa proporção de compartilhamento de bandas, (Bahia  $21,00 \pm 12,96\%$  e Goiás de  $27,94 \pm 13,31\%$ ) diferente dos dados encontrados na literatura. Vago et al. 2000 observou similaridades entre diferentes pacientes na mesma região geográfica analisando o perfil do kDNA do *T. cruzi* pela técnica LSSP-PCR. Este comportamento também foi observado por Lages-Silva et al. 2006 no Triângulo Mineiro que examinou pacientes com sintomas clínicos típicos da doença de Chagas (88,6%) com alta frequência de formas mistas (44,3%) e poucos casos na forma intermediária, isso ocorreu provavelmente porque esses pacientes foram selecionados em uma unidade hospitalar. Isso sugere que as cepas de *T. cruzi* dentro de uma mesma região geográfica podem ser relacionadas geneticamente, os quais têm uma importante função no desenvolvimento nas formas clínicas da doença. Segundo Salazar et al. 2006 os padrões eletroforéticos obtidos de LSSP-PCR mostraram heterogeneidade nos padrões de cepas de *T. cruzi* analisadas.

Estudos experimentais têm mostrado que infecções mistas por *T. cruzi* podem ter um grande impacto sobre as propriedades biológicas do parasito no hospedeiro, enfatizando a importância de considerar a possível ocorrência de infecções mistas naturais em humanos e suas consequências sobre os aspectos biológicos da doença de Chagas (Martins et al. 2006).

O intenso polimorfismo do kDNA pode resultar de: diferentes seqüências de minicirculos em cada parasito caracterizado, os altos índices de mutações em suas regiões hipervariáveis (Tarleton 2001), mudanças reversíveis na seqüência do kDNA do minicirculo (Alves 1994) ou uma baixa seqüência identificada entre eles. Entretanto Lages-Silva et al. 2006 não puderam excluir a possibilidade da hipervariabilidade da assinatura gênica do kDNA ser resultante de anos de interação da relação parasito-hospedeiro e do sistema imune. Esses fatores podem explicar a dificuldade em estabelecer perfis genéticos associados com manifestações clínicas específicas da doença de Chagas.

## 7- CONCLUSÕES

- 1- Todas as amostras pertencem ao grupo TCII, sendo (96,66%) correspondendo ao TCIIb/e e (3,33%) ao TCII d.
- 2- Houve diferenças estatísticas entre as pacientes dos estados da Bahia e de Goiás.
- 3- Não houve diferença entre as porcentagens de bandas compartilhadas entre as faixas etárias das pacientes.
- 4- Não houve diferença entre as porcentagens de bandas compartilhadas entre as idades gestacionais.
- 5- Não houve diferença entre as porcentagens de bandas compartilhadas nos isolados das gestantes e das não gestantes.
- 6- Não houve seleção de populações entre os isolados do mesmo paciente.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Todas as referências citadas estão de acordo com as normas adotadas pelo periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. [www.fiocruz.br](http://www.fiocruz.br)

Almeida EA, Engelman DES, Metze K, Teixeira MAB, Tostes Jr S, Lopes ER. 1991. Encefalopatia chagásica em imunodeprimido por tratamento quimioterápico em portador de leucose crônica: apresentação de caso com necrópsia. Rev Soc Bras Med Trop 24 (Supl.I): 33.

Amato-Neto V, Martins JEC, Oliveira L, Tsuzuki E 1968. Incidência da doença de Chagas entre mães de prematuros, no Hospital das Clínicas de São Paulo. Rev Inst de Medicina Tropical de São Paulo 10: 192-195.

Andrade SG 1974. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano: contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio. Rev Pat Trop 3: 65-121.

Andrade V, Andrade SG, Barral-Neto M, Pontes A, Castro R 1985. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. Rev Soc Bras Med Trop 18:143-154.

Andrade SG, Magalhães JB 1997. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* atrain: correlations whit clinical data and experimental pathology. Rev Soc Bras Med Trop 30: 27-53.

Andrade OL, Machado CRS, Chiari E, Pena SDJ 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. Molecular and Biochemical Parasitology 100:63-172.

Ávila HA, Gonçalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L 1990. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by Analysis of PCR amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol* 42:175-188.

Barnabé C, Yaeger R, Pung O, Tibayrenc M 2001. *Trypanosoma cruzi*: a considerable phylogenetic divergence indicates that the agent of Chagas disease is indigenous to the native fauna of the United States. *Exp Parasitol* 99:73-79.

Barret TB, Hoff RH, Mott KE, Miles MA, Godfrey DG, Tiexeira R, Almeida de Souza JA, Scherlock IA 1980. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 84-90.

Barreto G, Vago AR, Ginther C, Simpson AJ, Pena SDJ 1996. Mitochondrial D-loop "signatures" produced by low-stringency single specific primer PCR constitute a simple comparative human identity test. *Am J Hum Genet* 58:609-616.

Bittencourt AL, Barbosa HS, Rocha T, Sodré A 1972. Incidência da transmissão congênita da doença de Chagas em partos prematuros na maternidade Tsylla Albino (Salvador Bahia). *Rev Inst Med Trop São Paulo*; 14:131-134.

Bittencourt AL 1992. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev Ins Med Trop São Paulo* 34:403-408.

Bittencourt AL 1984. Doença de Chagas congênita na Bahia. *Rev Baiana de Saúde Pública* 11: 165-208.

Bittencourt AL 2000. Transmissão vertical da doença de Chagas. Rev Pat Trop 29 (supl1): 101-113.

Brener Z 1977. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi* two types of parasites populations presenting distinct features. PAOH, SC, 347:11-21.

Brener Z 1997. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In Clínica e terapêutica da doença de Chagas uma abordagem para o clínico geral. Editora Fiocruz 1ª Ed p.25-33.

Brissé S, Barnabé C, Tibayrenc M 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol 30: 35-44.

Brissé S, Verhoef J, Tibayrenc M 2001. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. Int J Parasitol 31:1218-1226.

Brito C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM 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.

Burgos JM, Altcheh J, Margarita B, Duffy T, Valadares, HMS, Seidenstein ME, Piccinali R, Freitas JM, Levin MJ, Macchi L, Macedo AM, Freilij H, Schijman AG 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. Int J Parasitol 37(12):1319-27.

Camargo EP 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev Inst Med Trop São Paulo, 6:93-100.

Carneiro M, Chiari E, Gonçalves AM, Da Silva AA, Pereira AM, Morel CM, Romanha AJ, 1990. Changes in the isoenzymes and Kinetoplastida DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* antigens en different clinical groups of patients. Medicina Buenos Aires nº 2, 57:161-168.

Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LMC 2002. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection whit *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res 88:894-900.

Castro C, Craig SP, Castaneda M 1981. Genome organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 4:273-282.

Chagas CRJ 1911. Moléstia de Carlos Chagas. II Conferência realizada na Academia Nacional de Medicina (1911). In: Carlos Chagas. Coletânea de Trabalhos Científicos (A. R. Prata, org.), 167-192, Brasília: Editora Universidade de Brasília.

Chiari E, Dias JPC, Lana M, Chiari CA 1989. Hemocultures for the parasitological diagnostico f human chronic Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop 22:19-23.

Chiari E, Galvão LMC, 1997. Diagnóstico parasitológico da doença de Chagas. In: Clínica e Terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clinico geral. Ed JCP Dias & JR Coura. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 85-97.

Consenso Brasileiro em Doença de Chagas 2005. Revista da Soceidade Brasileira de Medicina Tropical.

Coura JR, Vinhaes MC, Dias JCP 2000. Situação Epidemiológica Atual da Doença de Chagas no Brasil. Rev Pat Trop 29.

Cunha-Neto E, Gruber A, Zingales B, Kalil J 1995. Estudos da doença de Chagas: abordagem molecular. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 5:217-229.

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

Dao L 1949. Otros casos de enfermedad de Chagas en el Estado Guárico (Venezuela). Formas agudas y crónicas. Observación sobre enfermedad de Chagas congénita. *Rev Policlín (Caracas)* 7:17-32.

De Luca D'oro GM, Gardenal CN, Perret B, Crisci JV, Montamat EE 1993. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations from Argentina estimated from enzyme polymorphism. *Parasitology* 27:405-410.

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

Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frash AC 2002 A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med* 195:401-413.

Dias JPC 1992. Epidemiology of Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. *ISBT Brasil* 92- São Paulo.

Dias JCP, 2007. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cad Saúde Pública* 23 (supl1):S13-S22.

Diosque P, Barnabe C, Padilla AM, Marco JD, Cardozo RM, Cimino RO, Nasser JR, Tibayrenc M, Basombrio MA, 2003. Enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. *Int J Parasitol*, 33: 997–1003.

Fernandes JF, Castellani 1964. Perspectiva de vacinação contra a moléstia de Chagas. XVI Reunião Anual SBPC, Ribeirão Preto, São Paulo.

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

Fernades O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira AC, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA, Zingales B, Coura JR 1999. Population heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v 99 (supl. 1), p 195-197.

Freilij H, Altchek J, Storino R 1994. Chagas congênito. In Storino R. Freilij H. *Enfermedad de Chagas*, Doyma, Argentina. p.67-278.

Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SDJ, Macedo AM, 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissue. *Int J Parasitol* 7:411-417.

Gallo P, Fabião-Neto OM, Suarez JMM, Borba RP 1992. Acute central nervous system infection by *Trypanosoma cruzi* and AIDS. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 50:375-377.

Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Milles GA, Acosta N, de Airas AR, Milles MA 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Natura* 421:936-939.

Gomes ML, Macedo AM, Pena SDJ, Chiari E 1998. Genetic relationship between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brasil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. *Acta Trop* p.99-109.

Gomes MA, Silva EF, Macedo AM, Vago AR, Melo MN, 1997. LSSP-PCR for characterization of stocks of *Entamoeba histolytica* in Brazil. *Parasitol Today* 114:517-520.

Gonzales A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira N, Lizardi PM 1984. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:3356-3360.

Higo H, Miura S, Horio M, Mimori T, Hamano S, Agatsuma T, Yanagi T, Cruz-Reyes A, Uyema N, Araias AR, Matta V, Akahane H, Hirayama K, Takeuchi T, Tada I, Himeno K 2004. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitology International* 53:337-344.

Higuchi ML 1995. O parasita e a patogenia da forma crônica da doença de Chagas. *Arq Bras Cardiol* 64:251-254.

Howard JE 1962. Enfermedad de Chagas congenita. *Mamografía Biológica* n° 16. Universidade de Chile, Santiago, p. 37.

Lages-Silva E, Ramirez LE, Pedrosa AL, Crema E, Galvão LMC, Pena SDJ, Macedo AM, Chiari E 2006. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma*

*cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. J. Clin. Microbiol n°6 44:2167-2171.

Luquetti AO, Rassi A 2000. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. (eds), *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 2° ed., Guanabara Koogan RJ p. 345-378.

Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AU 1994. Hemoculture: sensitive technique in the detection of *Trypanosoma cruzi* in chagasic patients in the chronic phase of Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop 27:143-148.

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

Martins LPA, Castanho REP, Rosa JA, Silva LC, Godoy CAP, Rosa RM 2003. Caracterização biológica, histopatológica e análise de ácido nucléico de uma cepa *Trypanosoma cruzi* da região de Marília, SP. Soc Bras de Med Trop 36(1):35-39.

Martins HR, Toledo MJ, Veloso VM 2006. *Trypanosoma cruzi*: impacto f dual-clone infections on parasite biological properties em BALB/c mice. Exp Parasitol 112:237-246.

Mejia AM, Triana O 2005. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* in blood and organs of infected mice determined by LSSP-PCR. Biomédica n° 1, 25: 76-86.

Miles MA, Toye PJ, Oswaldo SC, Godfrey DC 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 71:217-225.

Miles MA, Lanham SM, de Souza AA, Povoá DG 1980. Further enzyme characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74:221-242.

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

[Morel](#) CM 1984. Schizodeme characterization of natural and artificial populations of *Trypanosoma cruzi* as a tool in the study of Chagas' disease. In: Newton B, Minchal F, (Eds.), *New Approaches to the Identification of Parasites and Their Vectors*. Schwabe Basel p. 253–275.

Oliveira MA, Souza W 2003. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. *Parasitology International* 52: 299-307.

Pena SDJ, Barreto G, Vago AR, Fuzikawa A, Simpson AJG 1994. LSSP-PCR: a novel approach to the recognition of DNA sequences and detection of point mutations. In *Proceedings of the 1994 Miami Bio/technology winter Symposium, USA*, p. 27.

Ramírez LE, Machado MI, Maywald PG, Matos A, Chiari E, Lages-Silva E 1998. First evidence of *Trypanosoma rangeli* in the southeast of Brasil, an endemic region to Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 31:99-102.

Rassi A, Neto VA, Rassi GG, Amato VS, Júnior AR, Luquetti AO, Rassi SG 2004. Busca retrospectiva da transmissão maternal da infecção chagásica em pacientes na fase crônica. *Rev Soc Bras Med Trop* 37(6):485-489.

Reiche EMV, Inouye MM, Bonametti AM, Jankevicius JV 1996. Doença de Chagas congênita: epidemiologia, diagnóstico laboratorial, prognóstico e tratamento. Jor Ped n°03 72:125-132.

Requena JM, Lopez MC, Alonso C 1996. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today 12: 279-282.

Romanha AJ 1982. Heterogeneidade Isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*, Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 110.

Ruiz RC, Favoreto Jr S, Dorta ML, Oshiro MEm, Ferreira AT, Manque P, Yoshida N 1998. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains in associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>+2</sup> signaling activity. Biochem J 330: 505-511.

Salazar A, Schijman AG, Triana-Chaves O 2006. High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. Acta Tropica 100:110-118.

Santos SS, Cupolillo E, Junqueira A, Coura JR, Jansen A, Sturm NR, Campebell DA, Fernades, O 2002. The genetic diversity of Brasília *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. Ann Trop Med Parasitol 96:755-764.

Sartori AMC, Shikanai-Yasuda MA, Neto VA, Lopes MH 1998. Follow-up of 18 patients with human immunodeficiency virus infection and chronic Chagas' disease, with reactivation of Chagas' disease causing cardiac disease in three patients. Clinical Infectious Diseases 26:177-179.

Schofield, C.J., Jannin, J., Salvatella, R., 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* n° 12, 22:583-8.

Silveira A C, 1997. Profilaxia da doença de Chagas. In *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas* (Z. Brener & Z. Andrade, Eds.), 2ª Ed., p. 75-87, Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan.

Silveira AC, Arias AR, Segura E, Guillén G, Russomando G, Schenone H, Dias JCP, Padilla JV, Lorca M, Salvatella R 2002. El control de la enfermedad de Chagas en los países del cono sur de América. História de una iniciativa internacional. 1991/2001. Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. Uberaba, MG.

Simpson L, Silva A, 1971. Isolation and characterization of kinetoplast DNA from *Leishmania tarentolae*. *J Mol Biol* 56:443-473.

Sloof P, Bos JL, Konings AFJM, Menke H, Borst P, Gutteridge WE, Leon W 1983. Characterization of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *J Mol Biol* 167:1-21.

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

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

Sturm NR, Simpson L, 1990. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell* 61:879-84.

Tarleton RL, Schulz CL, Grogg M, Kuhn RE 1984. Diagnosis of Chagas' disease in humans using a biotin-h-avidin radioimmunoassay. *American Journal of Medicine and Hygiene* n°1 33:34-40.

Tibayrenc M, Ayala FJ 1991. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today* 7:228-232.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, The agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 115-119.

Tibayrenc M, 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol* 36: 47:-115.

Tibayrenc M, Ayala F 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa; parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 90:1335-1339.

Vago AR, Macedo AM, Oliveria RP, Andrade LO, Chiare E, Galvão LM, Reis D, Pereira ME, Simpson AJ, Tostes S, Pena SDJ 1996a. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol* 149:2153-2159.

Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DA 1996b. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic Chagas disease. *Lancet* 348:891-892.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, Reis DA, Macedo AM, Adad JS, Jr ST, Moreira MCV, Filho GB, Pena, SDJ 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. Am J Pathol 156:1805-1809.

Villa LL, Caballero OL, Levi JE, Pena SDJ, Simpson, AJG 1995. Na approach to human papillomavirus identification using low stringency single specific primer PCR. Mol Cell Probes 9:45-48.

Virreira M, Alonso-Veja C, Solano M, Jijena J, Brutus L, Bustamante Z, Truyens C, Schneider D, Torrico F, Carlier Y, Svoboda M 2006. Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg 75:871-879.

Wincker P, Brito C, Borges-Pereira J, Cardoso MA, Oelemann W, Morel C 1994. 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 Hyg 51:771-777.

World Health Organization 2002. Technical Report Series, 905. Control of Chagas disease. Geneva: ed WHO Publications, p. 85.

Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sanchez H, Adamson S, Miles GAJ, Lopez E, Gonzales N, Patterson JS, Gaunt MW, Arias AR, Miles MA 2005. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. Int J Parasitol 35:225-233.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O 1998. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. Int J Parasitol, 28, 105-112.



<b>Nº</b>	<b>Número Hemocultura</b>	<b>Nome da paciente</b>	<b>Idade</b>	<b>Idade gestacional ou g.controle</b>	<b>Região</b>	<b>Naturalidade</b>
<b>1</b>	575	JRS	29	4º mês	PB	Catolé do Rocha
<b>2</b>	576	LGS	22	6º mês	GO	Nova Roma
<b>3</b>	577	LFO	23	4º mês	BA	Carinhanha
<b>4</b>	581	DDA	36	4º mês	GO	Coribe
<b>5</b>	587	EAP	21	5º mês	BA	Santa Mª da Vitória
<b>6</b>	590	LZFA	25	7º mês	GO	Morrinhos
<b>7</b>	592	VSBC	32		DF	Brasília
<b>8</b>	593	AGC	36	G. controle	GO	Passos
<b>9</b>	596	MMSS	29	5º mês	GO	Sítio d' Abadia
<b>10</b>	597	MCS	31	7º mês	BA	Cotegipe
<b>11</b>	600	AAO	32	G.controle	BA	
<b>12</b>	603	SNR	44	4º mês	GO	Nova América
<b>13</b>	605	EAS	29	9º mês	BA	Correntina
<b>14</b>	608	IOA	24		BA	Cotegipe
<b>15</b>	609	GRS	29	9ºmês	BA	Coribe
<b>16</b>	610	ASM	31	3ºmês	GO	Buritinópolis
<b>17</b>	611	CPL	24	4ºmês	BA	Angical
<b>18</b>	625	AMM	23	4º mês	BA	Wanderley
<b>19</b>	627	MROS	27	6º mês	BA	Santa Rita de Cássia
<b>20</b>	628	SOS	24	5º mês	BA	Ribeirão das Neves
<b>21</b>	629	END	37	G. controle	BA	Correntina
<b>22</b>	631	DFG	38	6º mês	GO	Formosa
<b>23</b>	632	NARM	21	4º mês	GO	Pilar
<b>24</b>	633	EORS	34	7º mês	BA	Ribeirão das Neves
<b>25</b>	634	MFBBR	37	4º mês	GO	Itauçu
<b>26</b>	636	UMR	32	6º mês	GO	Anápolis
<b>27</b>	637	JTB	19	6º mês	GO	Formosa
<b>28</b>	641	ICM	28	G controle	BA	Santa Mª da

## **9-Anexo I- Informações sobre as pacientes**

## 10-Anexos II- Tabela e gráficos

**Tabela 1:** Distribuição das pacientes estudadas nos estados da Bahia e de Goiás.

Estado	Nº de pares	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil
GO	77	28.64%	13.94	26.67	0.00	66.67	20.00	37.50
BA	106	20.99	12.96	18.34	0.00	50.00	12.50	28.57

**Quadro 3:** Distribuição das pacientes estudadas de acordo com a faixa etária.

Idade	Nº de pares	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil
19-24 anos	45	26.31	14.01	25.00	0.00	58.83	14.29	35.30
25-34 anos	66	24.08	14.61	22.88	0.00	63.16	12.50	33.33
> 34 anos	28	20.50	12.56	16.67	0.00	47.06	13.33	29.67

**Quadro 4:** Distribuição das pacientes estudadas de acordo com a idade gestacional.

Idade Gestacional	Nº de pares	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil
12 a 16 semanas	36	25.40	15.33	26.67	0.00	66.67	13.81	34.06
20 a 24 semanas	36	26.41	12.75	25.00	0.00	62.50	20.72	33.33
28 a 36 semanas	10	34.10	16.57	30.15	10.00	63.16	23.53	50.00
Controles	10	20.56	11.29	20.10	0.00	37.50	14.29	30.77

**Quadro 5:** Distribuição das pacientes estudadas de acordo com a análise do grupo de gestantes e de mulheres não gestantes.

	<b>Nº de pares</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>1º Quartil</b>	<b>3º Quartil</b>
Não gestantes	10	20.56	11.29	20.10	0.00	37.50	14.29	30.77
Gestantes	300	26.48	14.47	25.00	0.00	66.67	14.29	36.94