

AValiação DA CAPACIDADE DE DETECÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* POR TÉCNICAS MOLECULARES EM DIFERENTES HOSPEDEIROS

Bianca Yumi Yamada Geraldo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Maria Fernanda Lopes (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ingrid Giarola Matias dos Santos, Amanda Regina Nichi de Sá (Co-orientador), Max Jean de Ornelas Toledo (Orientador). E-mail: mjotoledo@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Parasitologia / Protozoologia de parasitos

Palavras-chave: Doença de Chagas; PCR quantitativa; carga parasitária.

RESUMO

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma zoonose que desafia o diagnóstico, especialmente na fase crônica. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de detecção de *T. cruzi* por técnicas moleculares em diferentes hospedeiros. Para isso, amostras de sangue de 20 pacientes com DC na fase crônica e de 20 animais silvestres, gambá (*Didelphis albiventris*), quati (*Nasua nasua*) e cachorro-do-mato (*Cercopithecus thous*), potenciais reservatórios do parasito, do Paraná; e 20 amostras de tecido cardíaco de camundongos experimentalmente infectados, foram analisadas por meio da PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR). A positividade da cPCR foi de 80% (18/20) nos pacientes e de 40% (8/20) dos animais silvestres. Por outro lado, a qPCR detectou DNA do parasito em 100% (20/20) das amostras de humanos e camundongos, e em 95% (19/20) das de animais silvestres. Além disso, a qPCR permitiu quantificar a carga parasitária (CP) cuja média foi significativamente superior ($p = 0,04$) no tecido cardíaco dos camundongos ($0,89 \pm 1,55$ equivalentes parasitos – Eq.par/mL) em comparação aos humanos ($0,27 \pm 0,26$ Eq.par/mL) e animais silvestres ($0,21 \pm 0,35$ Eq.par/mL). Os resultados mostram a elevada capacidade de detecção da infecção pela técnica de qPCR e seu potencial para o diagnóstico e estudo da epidemiologia da DC na região, podendo contribuir para o fornecimento de dados sobre prevalência e carga parasitária em diferentes hospedeiros de *T. cruzi*.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é uma doença tropical e negligenciada, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Tem caráter endêmico na América Latina, causando em média 14.000 mortes por ano (BRASIL, 2022). O parasito circula no ambiente silvestre entre triatomíneos e animais mamíferos silvestres, e no ambiente doméstico entre triatomíneos domiciliados e animais domésticos como cães e gatos. Os seres humanos, assim como outros animais mamíferos pertencentes a sete ordens, são considerados

hospedeiros vertebrados do parasito. O gambá (*Didelphis albiventris*), o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e o quati (*Nasua nasua*) são considerados importantes reservatórios de tripanossomatídeos (ENRIQUEZ et al., 2022) e já foram encontrados naturalmente infectados por *T. cruzi* no estado do Paraná, área endêmica para a DC (FERREIRA, 2024). A DC apresenta duas fases clínicas distintas, a aguda e a crônica. Nos pacientes não tratados que sobrevivem à fase aguda, a doença evolui para a fase crônica, caracterizada por apresentar baixo número de parasitos na corrente sanguínea e nos tecidos (LAGES-SILVA et al., 2001). O diagnóstico nesta fase é desafiador, pois os testes sorológicos podem apresentar resultados inconclusivos ou discordantes. Neste contexto, a reação em cadeia da polimerase (PCR) surge como uma ferramenta complementar que carece de avaliação de protocolos sensíveis capazes de detectar o parasito em diferentes hospedeiros e materiais biológicos. A PCR convencional (cPCR) amplifica um fragmento de 330 pb do kDNA de *T. cruzi*, enquanto a PCR em tempo real (qPCR), além de apresentar grande sensibilidade na detecção do parasito, permite quantificar a carga parasitária. Com isso, a qPCR é indicada para o monitoramento da evolução da doença e na avaliação da cura após o tratamento (FIOCRUZ, 2017). Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de detecção de *T. cruzi* por técnicas moleculares em diferentes hospedeiros.

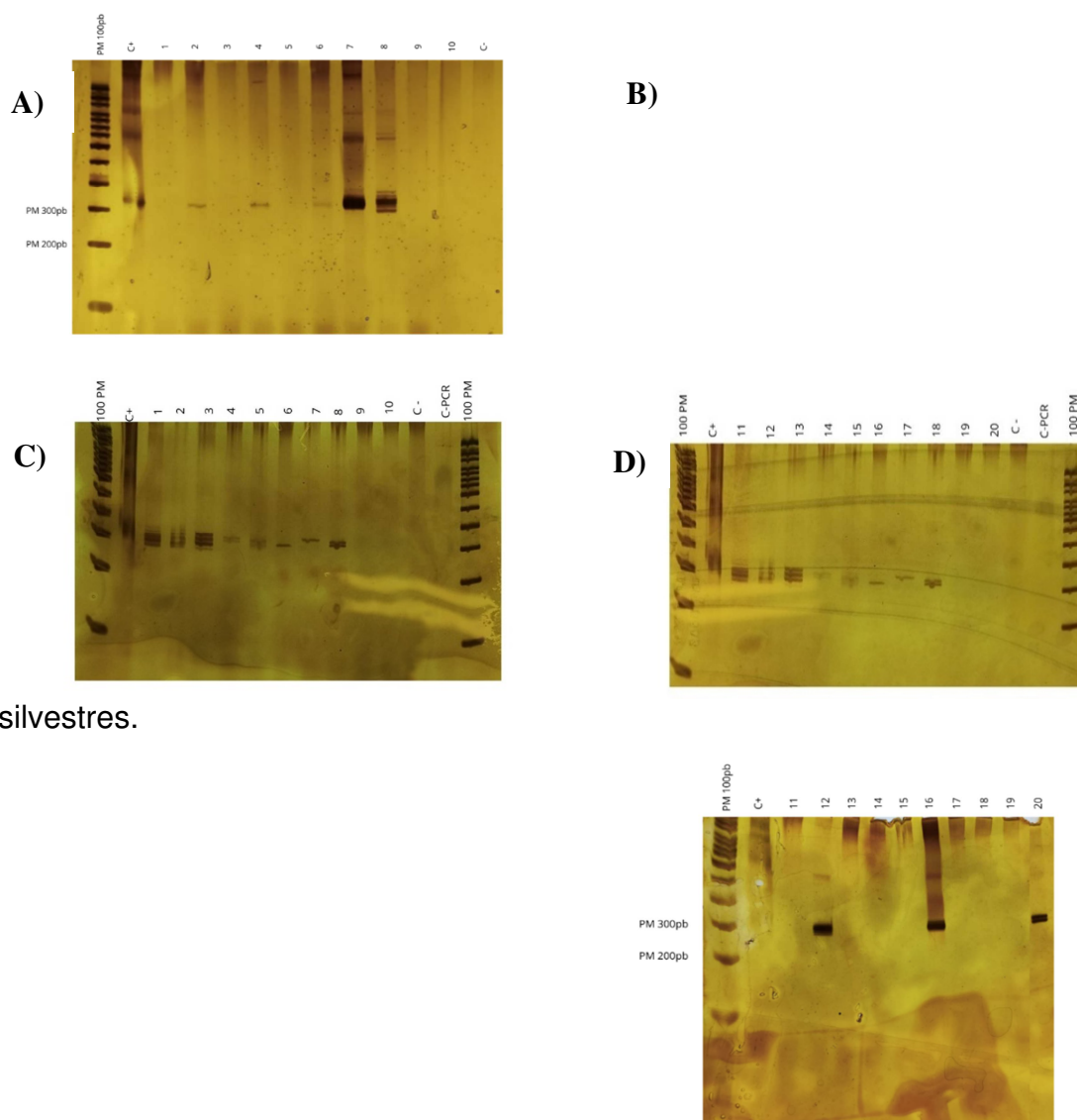
MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de sangue e tecido cardíaco de três grupos de hospedeiros, 20 amostras de cada: pacientes com DC na fase crônica (sangue), animais silvestres (*D. albiventris*, *N. nasua* e *C. thous*) potenciais reservatórios de *T. cruzi* (sangue), e camundongos experimentalmente infectados com a cepa Y (tecido cardíaco). As análises moleculares incluíram a extração de DNA, dosagem, amplificação e revelação. A cPCR foi realizada em sangue de pacientes sabidamente infectados e animais silvestres que poderiam estar ou não infectados. Todos os camundongos já haviam apresentado parasitemia no exame de sangue a fresco, por isso analisamos o tecido cardíaco desses animais. A qPCR foi utilizada para determinar a positividade e a carga parasitária (CP) nos três grupos. Foi realizada comparação da carga parasitária entre os três grupos de hospedeiros utilizando ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Tukey, com um nível de significância de 0,05. O estudo foi aprovado pelos Comitês de ética em Pesquisa sob os pareceres COPEP nº 7.567.169 e CEUA nº 3775080223.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises da positividade da cPCR para *T. cruzi* mostraram uma positividade de 80% (16/20) nos pacientes crônicos e de 40% (8/20) nos animais silvestres, sendo seis de gambá-de-orelha-branca e duas de quati. A qPCR apresentou 100% (20/20) de positividade tanto em sangue humano quanto em tecido cardíaco dos camundongos, e de 95% (19/20) em sangue de animais silvestres. Estes dados evidenciam a superioridade da qPCR em relação à cPCR, demonstrando sua maior sensibilidade na detecção de baixas cargas parasitárias como no caso de pacientes

crônicos. A maior suscetibilidade dos camundongos à infecção por *T. cruzi*, confirmada pela positividade do exame de sangue a fresco, tornou a realização da cPCR desnecessária no sangue destes animais. Géis ilustrativos com os resultados da cPCR são mostrados na Figura 1A e B para os animais silvestres e na Figura 1C e D para os pacientes. A qPCR, além de detecção do DNA, também permitiu a quantificação da CP, revelando diferenças significativas entre os hospedeiros. A CP média dos camundongos ($0,89 \pm 1,55$ equivalentes parasitos – Eq.par/mL) foi significativamente superior ($p = 0,04$) à CP média dos humanos ($0,27 \pm 0,26$ Eq.par/mL) e dos animais silvestres ($0,21 \pm 0,35$ Eq.par/mL), corroborando a maior parasitemia da infecção experimental (Figura 2). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de CP de humanos e animais



silvestres.

Figura 1 - Géis de poliácridamida a 4,5%, com os produtos da cPCR apresentando a banda de 330 pb do minicírculo do kDNA de *T. cruzi* no sangue dos animais silvestres. Amostras positivas: canaletas de 2, 4, 6 – 8, 12, 16 e 20 (**A e B**). No sangue dos pacientes, amostras positivas: canaletas de 1 a 8 e de 11 a 18 (**C e D**).

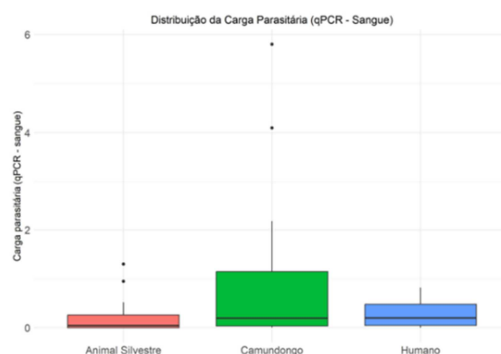


Figura 2 - Distribuição das cargas parasitárias de *T. cruzi* obtidas por qPCR entre os animais silvestres (sangue), camundongos experimentalmente infectados (tecido cardíaco) e pacientes com doença de Chagas (sangue) do Paraná.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a utilidade das técnicas moleculares (cPCR e qPCR) para a detecção de DNA de *T. cruzi* e quantificação da CP (qPCR) em sangue de pacientes e animais silvestres e no tecido cardíaco de camundongos experimentalmente infectados. Nas amostras de sangue, a positividade da cPCR foi inferior a positividade da qPCR tanto nos pacientes com DC crônica (80% X 100%) quanto nos animais silvestres (40% X 95%). A CP média foi significativamente mais elevada no coração de camundongos experimentalmente infectados do que no sangue de pacientes e animais silvestres, comprovando a maior suscetibilidade à infecção dos camundongos. Os resultados validam o uso das técnicas moleculares, principalmente da qPCR, tanto em estudos experimentais quanto no diagnóstico da infecção em pacientes na fase crônica da DC e animais mamíferos silvestres do Paraná, potenciais reservatórios de *T. cruzi*, podendo ser empregada no estudo da epidemiologia da doença.

AGRADECIMENTOS

À UEM, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao meu orientador, Prof. Max Jean de Ornelas Toledo, pelo financiamento, oportunidade de desenvolver este projeto, orientação, confiança e paciência. E à equipe do Laboratório de Doença de Chagas, pelo apoio e colaboração fundamental em todas as etapas da pesquisa.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica, p. 1-53, abr. 2022. Acesso em: 10 de junho de 2025.

ENRIQUEZ, G. et al. Over-dispersed *Trypanosoma cruzi* parasite load in sylvatic and domestic mammals and humans from northeastern Argentina. **Parasites & Vectors**, v.15, n.1, p. 1-14, 24 jan. 2022. Acesso em: 10 de junho de 2025.

FERREIRA, T.P. Investigação sobre a ocorrência de enteroparasitos e hemoparasitos em mamíferos silvestres do estado do Paraná, Brasil. Dissertação. Universidade Estadual de Maringá. 2024. Acesso em: 10 de junho de 2025.

FIOCRUZ. Portal da doença de Chagas- Diagnóstico. 2017. Disponível em: <https://chagas.fiocruz.br/doenca/diagnostico/#diagnostico>. Acesso em: 20 de maio de 2024.

LAGES-SILVA, E. et al. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 435-441, 2001.