GENOTIPAGEM DE *TRYPANOSOMA CRUZI* DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA DO ESTADO DO PARANÁ

Bianca Yumi Yamada Geraldo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Maria Fernanda Lopes, Natália Caroline Manosso, 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: *Trypanosoma cruzi*; DTU; Genotipagem.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo genotipar as unidades discretas de tipagem (DTUs) de *Trypanosoma cruzi* provenientes de pacientes com doença de Chagas crônica do Paraná. Vinte amostras de sangue humano foram submetidas à extração de DNA e PCR com os marcadores 24Sα rDNA e RFLP-COII, sendo também cultivadas em meio LIT. A genotipagem direta do sangue demonstrou-se inconclusiva pela baixa parasitemia característica da fase crônica, resultando em ausência de amplificação para COII e presença de amplificação inespecífica de DNA humano para o marcador rDNA. Diante disso, a tipagem foi conduzida a partir do isolamento de três hemoculturas positivas. A análise conjunta dos marcadores revelou perfis genéticos sugestivos da DTU TcV para os três pacientes com hemocultura positiva. Esse panorama genético corrobora com as DTUs mais prevalentes na região sul do Brasil, em paciente na fase crônica da infecção. Conclui-se que a tipagem molecular direta no sangue foi limitada pela baixa parasitemia sob as condições testadas, ressaltando a relevância do isolamento prévio por hemocultura. Ademais, frente às restrições de resolução eletroforética para distinção entre certas DTUs, o sequenciamento genético é recomendado para a classificação das linhagens circulantes.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma enfermidade tropical negligenciada e endêmica na América Latina (WHO, 2025). O parasito apresenta elevada diversidade genética, com cepas classificadas em unidades discretas de tipagem (DTUs), de TcI a TcVI, que influenciam nas características biológicas e manifestações clínicas da infecção. A correta identificação genotípica do parasito realizada por métodos moleculares como RFLP-COII e 24Sα rDNA é essencial (SÁ et al., 2013). Contudo, a baixa parasitemia, característica da fase crônica da infecção, atua como um obstáculo metodológico para a genotipagem direta no sangue, frequentemente demandando o isolamento prévio por hemocultura para obtenção de massa parasitária adequada para análise genética (RASSI et al., 2017). Considerando que a manutenção prolongada de cepas *in vitro* pode selecionar subpopulações divergentes da população original

circulante na natureza (DEMEU et al., 2017), a utilização de isolados recém-obtidos por hemocultura é fundamental. Diante disso, o presente projeto objetiva realizar a genotipagem das DTUs de amostras de *T. cruzi* recém-isoladas de pacientes com DC crônica do estado do Paraná.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram obtidas 20 amostras de sangue de pacientes com DC na fase crônica, as quais foram inicialmente submetidas à extração de DNA utilizando o *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen™). Em seguida, realizou-se a amplificação por PCR convencional para os marcadores moleculares RFLP-COII e 24Sα rDNA, utilizando DNA de cepas de referência das DTUs (TcI a TcVI) como padrão. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida e corados com nitrato de prata, conforme metodologia descrita por Sá et al. (2013). Paralelamente, essas mesmas 20 amostras de sangue foram cultivadas em meio LIT, das quais três resultaram em hemoculturas positivas. A massa parasitária obtida a partir destas três culturas foi submetida a uma nova extração de DNA por meio de um protocolo adaptado *in house* de EDTA a 0,5 M e NaOH a 50 mM (SÁ et al., 2018). Por fim, o material obtido dessa extração, também foi submetido à genotipagem utilizando os mesmos marcadores descritos anteriormente, seguida da separação dos fragmentos em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, utilizando a concentração de 4,5% para os produtos de rDNA e 7,5% para os produtos de RFLP-COII. Nenhum animal mamífero capturado apresentou hemocultura positiva até o momento e a genotipagem direta no sangue desses animais não pôde ser realizada, devido às limitações metodológicas e operacionais durante o período de execução do estudo. Dessa forma, as análises moleculares foram conduzidas exclusivamente com as amostras provenientes de pacientes com DC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da genotipagem direta a partir das 20 amostras de sangue dos pacientes na fase crônica demonstrou-se inconclusiva, corroborando com as limitações metodológicas associadas à baixa parasitemia. Na amplificação do marcador 24Sα rDNA, cujo limite de detecção é de cerca de 5 parasitos (SOUTO et al., 1996), obteve-se um padrão de bandas completamente divergente do esperado (Figura 1A), podendo corresponder à amplificação inespecífica de DNA humano**.** Para o marcador COII, não foi observada nenhuma amplificação, visto que a técnica exige uma carga parasitária mínima de aproximadamente 25 parasitos para genotipagem, também não condizente com a fase crônica de infecção. Diante dessa impossibilidade de tipagem direta no sangue, a genotipagem foi conduzida a partir do isolamento parasitário das três culturas positivas. A avaliação do rDNA em gel de poliacrilamida a 4,5% (Figura 1B) revelou que o paciente 1 possui um perfil de bandas semelhante a TcIII/TcV, enquanto os pacientes 2 e 3 apresentaram perfil eletroforético compatível com TcV (presença de duas bandas), porém, sem descartar a possibilidade de TcIII.

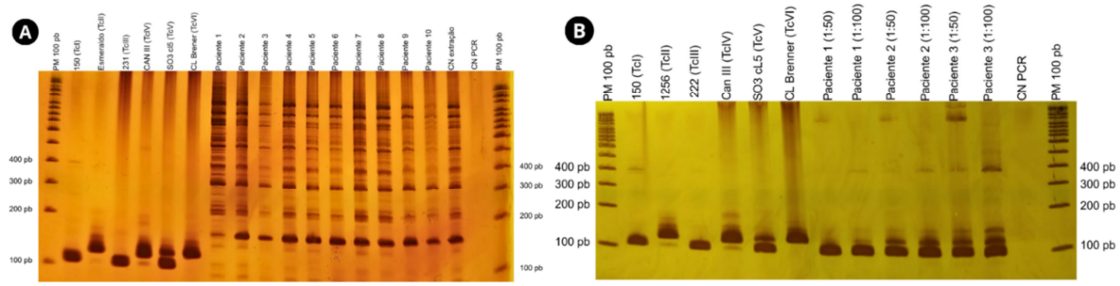


Figura 1 A e B. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 4,5% corado com nitrato de prata mostrando os produtos de amplificação do gene 24Sα rDNA. (A) Padrões das seis unidades discretas de tipagem (DTUs) de *Trypanosoma cruzi* (TcI a TcVI) seguidos das amostras 1 a 10 de sangue dos pacientes, finalizando com controle negativo (CN) da extração e da PCR. (B) Amplificação a partir de isolados de hemoculturas positivas apresentando os padrões das seis DTUs de *Trypanosoma cruzi* (TcI a TcVI) seguidos das amostras dos pacientes 1, 2 e 3 (testadas nas diluições 1:50 e 1:100), finalizando com controle negativo (CN) da PCR. PM 100 pb = peso molecular.

Na genotipagem por RFLP-COII, o perfil eletroforético dos pacientes 1, 2 e 3 mostrou semelhança com TcV e TcVI (Figura 2). A análise combinada dos marcadores rDNA 24Sα e RFLP-COII sugere compatibilidade com a DTU TcV para os isolados dos três pacientes. Esses achados alinham-se à epidemiologia descrita no Sul do Brasil (onde circulam TcII, TcV e TcVI), indicando um achado relevante que reforça a circulação provável de TcV no Paraná.

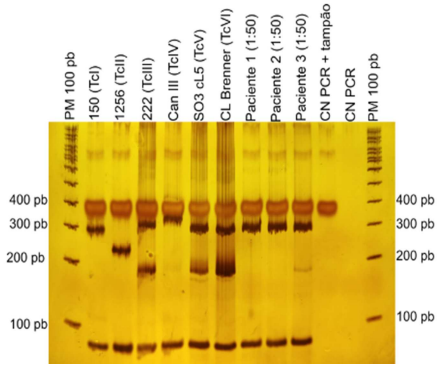


Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% corado com nitrato de prata mostrando os produtos de genotipagem por RFLP-COII a partir de isolados de hemoculturas positivas. Padrões das seis unidades discretas de tipagem (DTUs) de *Trypanosoma cruzi* (TcI a TcVI) seguidos das amostras dos pacientes 1, 2 e 3 (testadas na diluição 1:50), finalizando com dois controles negativos da PCR (CN PCR). PM 100 pb = peso molecular.

As dificuldades na diferenciação exata dos perfis eletroforéticos com esses dois marcadores moleculares, indicam a necessidade de confirmação molecular da DTU de *T. cruzi* por sequenciamento.

CONCLUSÃO

A genotipagem direta a partir de amostras de sangue não permitiu a identificação das linhagens, evidenciando as dificuldades impostas pela baixa parasitemia e pela

amplificação inespecífica, o que enfatiza o papel da hemocultura como etapa de enriquecimento. A análise molecular das culturas revelou perfis genéticos sugestivos de TcV, em concordância com a ocorrência desta DTU, além de TcII e TcVI, entre pacientes crônicos da região Sul do Brasil. Diante das limitações de resolução da eletroforese, o sequenciamento genético é recomendado para a classificação dos isolados em DTUs.

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

DEMEU, L. M. K. *et al*. Seleção de DTU-II em mistura populacional de *Trypanosoma cruzi.* **Rev. Uningá**, Maringá, v. 53, n. 2, p. 44-49, 2017. Disponível em: https://revista.uninga.br/uninga/article/view/1439. Acesso em: 18 ago. 2026.

RASSI, A. *et al.* Clinical phases and forms of Chagas disease. *In*: TIBAYRENC, M.; TELLERIA, J. (org.). **American trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research**. 2. ed. London: Elsevier, 2017. p. 709-741. Disponível em: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00016-2. Acesso em: 18 ago. 2026.

SÁ, A. R. N. *et al*. Cytochrome oxidase subunit 2 gene allow simultaneous detection and typing of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. **Parasit. Vectors**, London, v. 6, n. 363, p. 1-8, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-363. Acesso em: 18 ago. 2026.

SÁ, A. R. N. *et al*. Limit of detection of PCR/RFLP analysis of cytochrome oxidase II for the identification of genetic groups of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in biological material from vertebrate hosts. **Parasitol. Res.**, Berlin, v. 117, n. 8, p. 2403-2410, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00436-018-5928-1. Acesso em: 18 ago. 2026.

SOUTO, R. P. *et al*. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 141-152, 1996. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02755-7. Acesso em: 18 ago. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis).** Geneva: WHO, 2025. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis. Acesso em: 18 ago. 2026.