

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE PCR MULTIPLEX PARA A CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI* EM SUAS PRINCIPAIS LINHAGENS FILOGENÉTICAS

Thalissa P. de Souza^{1,*}, Cláudia de Souza², Débora de O. Lopes²,
Luciana L. Santos², Nayara D. A. Bortoleto¹, Andréa M. Macedo³, Helder
M.S.Valadares¹

*1Laboratório de Genética Molecular, Universidade Federal de São João Del-Rei,
Divinópolis/MG*

*2Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de São João Del-Rei,
Divinópolis/MG*

*3Laboratório de Genética Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG
e-mail: thalissa.prado@hotmail.com

Resumo

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, apresenta uma grande heterogeneidade genética atribuída ao seu modo de reprodução predominantemente clonal. Após décadas de pesquisa, vários marcadores moleculares foram descritos para o *T. cruzi* e com base em seus perfis eletroforéticos, um grupo de pesquisadores estabeleceu um consenso para a nomenclatura do *T. cruzi*: as cepas do *T. cruzi* são referidas como Discretas Unidades Taxonômicas (DTUs) chamadas de *T. cruzi* I a *T. cruzi* VI. Entretanto, ainda não existe um consenso sobre quantos e quais marcadores devem ser utilizados para uma classificação adequada das cepas do *T. cruzi*. Então, visando aperfeiçoar o procedimento de caracterização molecular do *T. cruzi* em suas principais linhagens filogenéticas, este trabalho tem como objetivo padronizar um sistema de PCR multiplex contendo três marcadores polimórficos: os genes Citocromo Oxidase II, Mini-éxon e rDNA 24Sα. Uma vez que estes marcadores apresentavam diferentes sistemas de amplificação por PCR, foi necessário estabelecer novas condições que permitissem a amplificação simultânea dos três marcadores e testar a especificidade do sistema de PCR multiplex empregando DNA de várias cepas do *T. cruzi*. Os resultados revelaram que todos os pares de iniciadores foram eficientemente amplificados e exibiram os padrões de

amplificação esperados (exceto para o gene COII). Ao avaliar a sensibilidade do sistema multiplex, foram observadas amplificações positivas somente até o nível de 10pg de DNA sugerindo que novos ensaios devem ser realizados para conseguir uma amplificação positiva até o nível 100 fentogramas. Com a padronização deste sistema de PCR multiplex novas possibilidades nos processos de caracterização molecular do *T. cruzi* serão alcançadas permitindo determinar com segurança a DTU para as cepas do *T. cruzi* empregando uma única amostra de DNA.

Palavras-chave: Trypanosoma cruzi, PCR multiplex, marcadores moleculares.

Apoio financeiro: CNPq, FAPEMIG