

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**DISSERTAÇÃO**

**Caracterização molecular das amostras de *Trypanosoma cruzi*  
(Chagas, 1909), isoladas de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) no Estado do  
Rio de Janeiro**

**LUCIANA REBOREDO DE OLIVEIRA**

**Rio de Janeiro  
2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**Caracterização molecular das amostras de *Trypanosoma cruzi*  
(Chagas, 1909), isoladas de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) no Estado do  
Rio de Janeiro**

**LUCIANA REBOREDO DE OLIVEIRA**

*Sob a Orientação da Doutora*  
**Jacenir Reis dos Santos Mallet**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**,  
Área de Concentração em  
Biologia Animal

Seropédica, RJ  
Março de 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**LUCIANA REBOREDO DE OLIVEIRA**

Dissertação, submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de concentração em Biologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet – UFRRJ  
(Orientadora)**

---

**Dra. Helena Keiko Toma - UFRJ  
(Membro da banca examinadora)**

---

**Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves – FIOCRUZ-RJ  
(Membro da banca examinadora)**

574.190981 Oliveira, Luciana Reboredo de.  
53            Caracterização molecular das  
048            amostras de *Trypanosoma cruzi*  
T            (Chagas, 1909), isoladas de *Triatoma*  
              *vitticeps* (Stal, 1859) no Estado do  
              Rio de Janeiro / Luciana Reboredo de  
              Oliveira - 2010.  
              101 f.: il.

              Orientador: Jacenir Reis dos Santos  
              Mallet.

              Dissertação           (mestrado)       -  
              Universidade Federal Rural do Rio de  
              Janeiro, Programa de Pós-Graduação  
              em Biologia Animal.  
              Bibliografia: f. 58-88.

              1. Biologia molecular - Rio de  
              Janeiro (RJ) - Teses. 2. Infecção -  
              Teses. 3. Parasito - Rio de Janeiro  
              (RJ) - Teses. I. Mallet, Jacenir  
              Reis dos Santos. II. Universidade  
              Federal Rural do Rio de Janeiro.  
              Programa de Pós-Graduação em  
              Biologia Animal. III. Título.

*À minha família, minha maior riqueza ....Lú,  
Wittem, Lizandra, Gustavo, Lídio, Ingrid, em  
particular ao meu irmão Luiz Emílio pelo  
amor, carinho e dedicação nas horas mais  
difíceis de nossas vidas.*

*“Nenhum sucesso na vida, recompensa o  
fracasso no lar.”*

*(David O. Mackey)*

*À Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet pela  
paciência, compreensão, amizade,  
determinação e carinho com que me orientou.*

*Dedico*

## *A Tese do Coelho*

*Em um dia lindo e ensolarado, o coelho saiu de sua toca com o notebook e pôs-se a trabalhar, bem concentrado. Pouco depois, passou por ali a raposa e viu aquele suculento coelhinho, tão distraído, que chegou a salivar. No entanto, ela ficou intrigada com a atividade do coelho e aproximou-se, curiosa:*

*R - Coelhinho, o que você está fazendo aí tão concentrado?*

*C - Estou redigindo a minha tese de mestrado - disse o coelho sem tirar os olhos do trabalho.*

*R - Humm... e qual é o tema da sua tese?*

*C - Ah, é uma teoria provando que os coelhos são os verdadeiros predadores naturais de animais como as raposas.*

*A raposa fica indignada:*

*R - Ora! Isso é ridículo! Nos é que somos os predadores dos coelhos!*

*C - Absolutamente! Venha comigo à minha toca que eu mostro a minha prova experimental.*

*O coelho e a raposa entram na toca. Poucos instantes depois ouvem-se alguns ruídos indecifráveis, alguns poucos grunhidos e depois silêncio. Em seguida o coelho volta, sozinho, e mais uma vez retoma os trabalhos da sua tese, como se nada tivesse acontecido.*

*Meia hora depois passa um lobo. Ao ver o apetitoso coelhinho tão distraído, agradece mentalmente à cadeia alimentar por estar com o seu jantar garantido.*

*No entanto, o lobo também acha muito curioso um*

coelho trabalhando naquela concentração toda. O lobo então resolve saber do que se trata aquilo tudo, antes de devorar o coelhinho:

L - Olá, jovem coelhinho. O que o faz trabalhar tão arduamente?

C - Minha tese de mestrado, seu lobo. É uma teoria que venho desenvolvendo há algum tempo e que prova que nós, coelhos, somos os grandes predadores naturais de vários animais carnívoros, inclusive dos lobos.

O lobo não se contém e cai na gargalhada com a petulância do coelho.

L - Apetitoso coelhinho! Isto é um despropósito. Nós, os lobos, é que somos os genuínos predadores naturais dos coelhos. Aliás, chega de conversa...

C - Desculpe-me, mas se você quiser eu posso apresentar a minha prova. Você gostaria de me acompanhar à minha toca?

O lobo não consegue acreditar na sua boa sorte. Ambos desaparecem toca adentro. Alguns instantes depois ouvem-se uivos desesperados, ruídos de mastigação e ... silêncio. Mais uma vez o coelho retorna sozinho, impassível, e volta ao trabalho de redação da sua tese, como se nada tivesse acontecido... Dentro da toca do coelho vê-se uma enorme pilha de ossos ensanguentados e pelancas de diversas ex-raposas e, ao lado desta, outra pilha ainda maior de ossos e restos mortais daquilo que um dia foram lobos. Ao centro das duas pilhas de ossos, um enorme LEÃO, satisfeito, bem alimentado e sonolento, a palitar os dentes.

## *Moral Da História*

- Não importa quão absurdo é o tema de sua tese.
- Não importa se você não tem o mínimo fundamento científico.
- Não importa se os seus experimentos nunca cheguem a provar sua teoria.
- Não importa nem mesmo se suas idéias vão contra o mais óbvio dos conceitos lógicos...
- o que importa mesmo é QUEM É O SEU ORIENTADOR...

*(autor desconhecido)*

*Uma homenagem a minha querida orientadora ...meu exemplo de profissional e ser humano.*

*Jace,  
Mesmo que a palavra "obrigada" signifique tanto, não expressará por inteiro o quanto seu gesto atencioso e delicado, foi importante para mim.*

*"Agradeço tudo aquilo que está na minha vida até neste momento, incluindo até as dores. A nossa compreensão do universo ainda é muito pequena, para julgarmos o que quer que seja da nossa vida."*



## **AGRADECIMENTOS**

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

Á meu amado pai Luiz B. R. de Oliveira que enquanto esteve vivo fez de tudo por mim e foi o sol da minha vida.

A meu irmão Luiz Emílio por todo apoio, incentivo, amor e carinho em todos os momentos.

Á minha querida irmã Luziedina Reboredo de Oliveira que com todo seu amor e carinho se preocupa comigo e me fortalece com palavras amigas.

A meu querido irmão Leonídio pela força, amor e carinho em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos Ingrid, Lizandra e Gustavo por todo amor e dedicação e por iluminar muito mais a minha vida.

Ao meu cunhado Wittemberg pelo exemplo de garra e determinação, carinho e ensinamentos.

A minha querida prima Simone Reboredo pela amizade e incentivo em todos os momentos.

Ao super amigo Halsey Mendes pela amizade e incentivo.

A minha querida orientadora Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet por tudo. Muito obrigada pela confiança em mim depositada e pelo otimismo nos momentos de crise.

A Dra. Helena Keiko Toma pelo total apoio e dedicação, por propiciar a realização deste trabalho e pelos brilhantes ensinamentos. Muito Obrigada!

A Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves pelo apoio e incentivo e por me permitir dar continuidade ao seu belíssimo trabalho.

Aos alunos estagiários do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises clínicas e Toxicológicas da UFRJ Diogo Ornellas, Marcella Lisboa, Karina Mendonça e Maria Cecília Neves pela contribuição na execução dos experimentos e pelo carinho que me receberam.

As amigas-irmãs especialistas Nathanielly Rocha e Simone Castro pela amizade, apoio, incentivo e enorme carinho em todos os momentos. Amigas para sempre!

A querida amiga Ana Paula Rufino A. Sant'Anna simplesmente por ser uma pessoa incrível e fundamental em minha vida. Obrigado por tudo Aninha!

A amiga Margareth A. R. Cardozo de Almeida por todo o ensinamento, apoio e carinho.

A amiga Simone Teves por ser tão dedicada e atenciosa com todos do laboratório, pelas palavras de apoio e carinho.

A querida amiga Kátia Firmino pela forte amizade, total apoio e carinho em todos os momentos.

Ao amigo Renato Jr. que foi fundamental para o início deste trabalho. Obrigado por todo apoio e incentivo.

Ao amigo Maycon Neves pela amizade, carinho, apoio e pelas tardes divertidas no lab.

A amiga bióloga Amanda Sampaio pela amizade, pelos momentos de desabafo, conselhos e total apoio.

Ao técnico Adalberto José da S. R. Rodrigues pelo apoio e também por ser tão atencioso com todos.

Ao amigo especialista William Marques pelo carinho e amizade demonstrado e pelo apoio.

A Dra Simone Patrícia Carneiro de Freitas, Dra. Suzete Araújo Oliveira Gomes e a Prof. Catarina Macedo pelo apoio, incentivo e palavras de carinho.

A Dra Elizabeth Rangel e ao Prof. Maurício Villela por me receber no LTL e pelo apoio.

Aos companheiros do setor de entomologia médica e forense Maria Luiza, Daniele Misael, Bento, Alice, Cecília, pela atenção, auxílio, ensinamentos e amizade em todos momentos.

A professora Simone Kikuchi pela atenção, auxílio, ensinamentos e amizade.

Aos amigos especiais do LTL Professora Adriana Zwetsch e Dr. Alfredo Carlos pelo carinho, amizade e incentivo.

Aos queridos amigos Alan, Bárbara, Carlos, Daiana e Rosângela pela amizade, carinho e apoio.

A secretaria Ester Lúcia pela atenção, ajuda e amizade.

Aos meus colegas que conquistei no curso de pós-graduação em biologia animal, em especial para os amigos que conquistei Joice Bernardo e César Carriço. Muito obrigada!

A Agra, secretaria da Pós-Graduação em Biologia animal da UFRRJ, pela atenção, carinho e ajuda sempre que requisitada.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal da UFRRJ, em especial Prof. Cassino e Prof. Janira por todos os preciosos ensinamentos.

A fonte financiadora CNPq.

A UFRJ por me permitir usar seu espaço para desenvolver este trabalho.

A Fiocruz pela excelência em pesquisa e por fornecer subsídios fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa.

A toda a equipe do Setor de Entomologia Médica e Forense pela união, apoio e ensinamentos.

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

## RESUMO

Reboredo-Oliveira, Luciana. Caracterização molecular das amostras de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), isoladas de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) no Estado do Rio de Janeiro. Páginas. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2010.

*Trypanosoma cruzi* o agente etiológico da doença de Chagas, apresenta uma considerável heterogeneidade entre as populações de isolados dentro do ciclo silvestre e doméstico. O alvo deste estudo é avaliar a diversidade genética de treze isolados de espécimes de *Triatoma vitticeps* que foram coletados da localidade de Triunfo, 2º Distrito do Município de Santa Maria Madalena (RJ) e um isolado da localidade de Vista Alegre, Município de Conceição de Macabu (RJ). Com o uso do PCR baseado nos genes de mini-exon através dos iniciadores TcI, TcII, Z3, Tr e ME, os 14 isolados apresentaram um perfil de bandas com 150 pb característica de zimodema III e bandas com uma menor intensidade com ~ 250pb característica de TcII, sugerindo a presença de possíveis populações mistas nesses isolados. A amplificação por PCR do gene do RNA ribossomal (24S $\alpha$ ) através dos iniciadores D71 e D72 resultou em fragmentos de 125pb características da linhagem TcII para todos os isolados estudados. O clone F30 foi utilizado como um marcador de caracterização de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, através dos iniciadores F30 F e F30 R utilizando um protocolo simples que envolve amplificação, digestão e análise em gel de agarose, demonstrando através da digestão com as enzimas RsaI e MspI um padrão mais característico com o perfil TcII e/ou Z3. A amostra SMM1 não amplificou fragmentos para o clone F30. Para verificar possíveis híbridos entre as cepas analisadas foi feito PCR baseado em uma análise de polimorfismos no gene MSH2, utilizando-se os iniciadores tmuts 30 e tmuts 41. Os produtos de digestão com a enzima de restrição HhaI (*Haemophilus haemolyticus*), resultaram em fragmentos de 173pb, 207pb e 294pb para cada isolado, o que indica um padrão característico para a linhagem Tc II, demonstrando então, que não há híbridos entre nossos isolados. Estes resultados evidenciam a diversidade de parasitos que infectam espécimes de *T. vitticeps*, enfatizando o hábito silvestre desta espécie e a complexidade epidemiológica da região estudada que apresenta possíveis populações mistas. Nossos resultados corroboram ainda, com outras descrições da literatura e contribuem para o conhecimento e registros de alguns perfis adicionais de isolados silvestres de *T. cruzi* em regiões ainda não afetadas por esta doença.

**Palavras chave:** Biologia molecular, infecção natural, Triatomíneo

## SUMMARY

Reboredo-Oliveira, Luciana. Molecular characterization of samples of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), isolated from *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in Rio de Janeiro. Pages. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Serpédica, RJ. 2010.

*Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, presents a considerable heterogeneity among populations of isolates within the sylvatic cycle and domestic. The aim of this study is to assess the genetic diversity of thirteen isolated from specimens of *Triatoma vitticeps* were collected from the locality of Triunfo, 2nd District of Santa Maria Madalena (RJ) and one isolated from the town of Vista Alegre, the municipality of Concepcion Macabu (RJ). Using the PCR-based mini-exon genes using primers TcI, TcII, Z3, Tr and ME, the 14 isolates showed a profile of bands with 150 bp characteristic of zymodeme III and bands with a lower intensity with ~ 250bp characteristic of TcII, suggesting the possible presence of mixed populations of these isolates. PCR amplification of ribosomal RNA gene (24S $\alpha$ ) using primers D71 and D72 resulted in fragments of 125bp TcII characteristics of strain for all isolates studied. Clone F30 was used as a marker for characterization of T. cruzi I and T. cruzi II, using primers F30 F and F30 R using a simple protocol involving amplification, digestion and agarose gel analysis, showing by enzyme digestion with RsaI and MspI pattern more characteristic to the profile TcII and or Z3. The sample SMM1 not amplified fragments for clone F30. To check possible hybrids between the strains analyzed was made based on PCR analysis of polymorphisms in the MSH2 gene, using primers tmuts 30 and tmuts 41. The products of digestion with restriction enzyme HhaI (*Haemophilus haemolyticus*), resulted in fragments of 173bp, 207bp and 294bp for each isolate, indicating a typical pattern for strain TcII, then demonstrating that there is no hybrid between our isolates. These results show the diversity of parasites that infect specimens of *T. vitticeps*, emphasizing the habit of wild species and the complex epidemiology of the studied region that gives possible mixed populations. Our results corroborate with other descriptions of the literature and contribute to the knowledge and records of some additional profiles of wild strains of *T. cruzi* in areas not yet affected by this disease.

Key words: Molecular biology, natural infection, triatomines

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - <i>Triatoma vitticeps</i> .....	<b>9</b>
<b>Figura 2:</b> Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> . (Modificado de: TDR/Wellcome Trust. Acesso em:1/02/2006 . <a href="http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm">www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm</a> .....	<b>10</b>
<b>Figura 3</b> - Dendograma filogenético gerado após a análise do RFLP ITS-rDNA (4 enzimas distintas) de isolados de Z III da região Amazônica, onde a cepa 3663 está alocada como ZIII-A e 4167 como ZIII-B.....	<b>17</b>
<b>Figura 4</b> - Diagrama que representa o modelo proposto da Evolução de cepas de <i>T.cruzi</i> (Freitas <i>et al.</i> , 2006).....	<b>19</b>
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática do cistron ribossômico.....	<b>22</b>
<b>Figura 6</b> -Representação esquemática da unidade de repetição do gene “Spliced leader” .....	<b>24</b>
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática do maxicírculo de kDNA com o gene de citocromo b (Cyb) em destaque.....	<b>26</b>
<b>Figura 8:</b> Distribuição geográfica de <i>Triatoma vitticeps</i> .....	<b>38</b>
<b>Figura 9:</b> Vista geral da localidade de Triunfo, localizada no município de Santa Maria Madalena- RJ.....	<b>39</b>
<b>Figura 10:</b> Vista geral da área A.....	<b>39</b>
<b>Figura 11:</b> Vista geral da área B.....	<b>40</b>
<b>Figura 12:</b> Caracterização molecular das cepas SMM1, SMM9, SMM10, SMM30,	

SMM34, SMM36, SMM39, SMM51, SMM57, SMM82, SMM88, SMM89, SMM98 e SMM106 através da análise do segmento do espaçador não-transcrito do gene de mini-exon por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado em brometo de etídeo. MM – Marcador molecular (500pb), 1 – amostra controle de *T. cruzi* I (Dm 28c), 2 – amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), 3 – amostra controle de ZIII, 4 - amostra controle de *T. rangeli*, 5 – SMM1, 6 - SMM9, 7 - SMM10, 8 - SMM30, 9 - SMM34, 10 - SMM36, 11 - SMM39, 12 - SMM51, 13 - SMM57, 14 - SMM82, 15 - SMM88, 16 - SMM89, 17 - SMM98, 18 - SMM106 e 19 – controle negativo..... 45

**Figura 13:** Gel de poliacrilamida a 7,5% corado pela prata, representativo de cepas silvestres de *T. cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* através do PCR do gene de DNAr24Sα. MM = Marcador molecular (500pb), 1 – SMM57, 2 - amostra controle de *T. cruzi* I (Dm 28c), 3 – amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), – 4 - SMM1, 5 - SMM9, 6 - SMM10, 7 - SMM30, 8 - SMM34, 9 - SMM36, 10 – SMM51, 11 – SMM88, 12 - SMM82, 13 – SMM39, 14 - SMM89, 15 - SMM98 e 16 - SMM106..... 46

**Figura 14:** Gel de poliacrilamida a 7,5% corado pela prata, representativo de cepas silvestres de *T. cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* através do produto de digestão pela enzima de restrição HhaI (*Haemophilus haemolyticus*) do gene MSH2. MM – Marcador molecular, 1 - SMM1, 2 - SMM9, 3 - SMM10, 4 - SMM30, 5 - SMM34, 6 - SMM36, 7 - SMM39, 8 - SMM51, 9 - SMM57, 10 - SMM82, 11 - SMM88, 12 - SMM89, 13 - SMM98 e 14 - SMM106..... 47

**Figura 15 -** Gel de agarose a 1,5% corado em brometo de etídeo da digestão dos fragmentos amplificados do PCR de F30 com a enzimas de digestão RsaI. MM – Marcador molecular, 1 – amostra controle de *T. cruzi* I (Dm 28c), 2 – amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), 3 – amostra controle de ZIII, 4 - SMM9, 5 - SMM10, 6 - SMM30, 7 - SMM34, 8 - SMM36, 9 - SMM39, 10 - SMM51, 11 - SMM57, 12 - SMM82, 13 - SMM88, 14 - SMM89, 15 - SMM98 e 16 - SMM106..... 48

**Figura 16** - Gel de agarose a 1,5% corado em brometo de etídeo da digestão dos fragmentos amplificados do PCR de F30 com a enzimas de digestão MspI. MM – Marcador molecular, 1 – amostra controle de *T. cruzi* I (Dm 28c), 2 – amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), 3 – amostra controle de ZIII, 4 - SMM9, 5 - SMM10, 6 - SMM30, 7 - SMM34, 8 - SMM36, 9 - SMM39, 10 - SMM51, 11 - SMM57, 12 - SMM82, 13 - SMM88, 14 - SMM89, 15 - SMM98 e 16 - SMM106.....

**49**

# ÍNDICE

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 – História Natural da Doença de Chagas.....	1
1.2.– Os vetores.....	4
1.3– <i>Triatoma vitticeps</i> .....	7
1.4 – O Parasito: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
1.5– Caracterização Molecular do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
1.5.1 – Genoma do <i>T. cruzi</i> .....	11
1.5.2 – Diversidade Genética em <i>T. cruzi</i> .....	12
1.5.3 – Heterogeneidade do <i>T.cruzi</i> : Zimodema III.....	16
1.5.4 – História evolutiva do <i>T. cruzi</i> .....	21
1.6 – Genes, seqüências e metodologias empregadas na análise de polimorfismo.....	23
1.6.1 – Gene ribossômico.....	23
1.6.2 - Gene de Mini-Exon.....	25
1.6.3 - Genes mitocondriais.....	26
1.6.4 - DNA do cinetoplasto – kDNA.....	28
1.6.5 - Gene MSH2.....	30
1.6.6 - Clone F#30.....	30
<b>2 – REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>32</b>
<b>3 – OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1 – Procedência dos parasitos.....	38
4.2 – Cultivo dos isolados.....	41
4.3 – Extração de DNA.....	41
4.4 – Quantificação de DNA.....	42
4.5 – Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	42
4.5.1 – Variabilidade da região intergênica do gene de Mini-Exon.....	42
4.5.2 – Variabilidade do segmento do gene do RNA ribossomal (24S $\alpha$ ).....	43
4.5.3 – MSH2.....	43
4.5.4 – F#30.....	44
<b>5 – RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
5.1 – Variabilidade da região intergênica do gene de Mini-Exon.....	45
5.2 – Variabilidade do segmento do gene do RNA ribossomal (24S $\alpha$ ).....	46
5.3 – Gene MSH2.....	47
5.4 – Gene F#30.....	48
<b>6 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>7 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>



## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1 – Doença de Chagas

*Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), é um protozoário autóctone do Continente Americano, causador de uma das mais importantes infecções parasitárias na América Latina devido ao seu impacto em termos econômicos e de saúde pública (Dias *et al.*, 2002). Sua distribuição geográfica compreende 21 países desde o sul dos Estados Unidos até a latitude 43°S no sul da Argentina e Chile (WHO, 1991, 2002).

A infecção humana por *T. cruzi* na América Latina data de 9.000 a.C., conforme demonstrado por Afderheide *et al.* (2004), a partir de estudos realizados em múmias da região dos Andes. A passagem do parasito do ciclo enzoótico para o ciclo doméstico possivelmente foi um processo progressivo, no qual algumas espécies de triatomíneos foram capazes de se adaptar às novas condições ecológicas e estabelecer um novo ciclo de transmissão. Os triatomíneos são conhecidos desde o século XVI, porém acredita-se que sua adaptação aos domicílios é mais recente (Lent e Wygodzinsky, 1979). Especula-se que o desmatamento provocado pelo homem para fins de desenvolvimento agrícola nos últimos 300 anos tenha sido um processo central para a adaptação de triatomíneos ao domicílio e peridomicílio (Aragão, 1983; Coura, 2007).

A prevalência e a distribuição da doença de Chagas e sua associação com a mortalidade variam em consequência do impacto dos programas de controle, da migração rural e das mudanças nas condições socioeconômicas das comunidades de alto risco (Moncayo e Ortiz Yanise, 2006). Atualmente, a prevalência da doença de Chagas é estimada em cerca de 13 milhões de indivíduos infectados, com três milhões de casos sintomáticos e uma incidência anual estimada de 200 mil novos casos em 15 países da América Central e Sul (WHO, 2002).

Em 1991, o pacto dos países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai) visou à eliminação da transmissão vetorial da doença de Chagas nestes países (Anonymous, 1991). O combate químico teve por objetivo o controle dos vetores domiciliados e, em especial, ao *Triatoma infestans*, com resultados altamente positivos (Silveira & Resende, 1994; Moncayo, 2003).

A interrupção da transmissão da doença de Chagas pela via transfusional, no Uruguai ocorreu em 1997, no Chile em 1999 e no Brasil em 2006 (WHO, 1998b, 1999, 2000; Schmunis, 2007)

No Brasil, onde *T. infestans*, *T. brasiliensis* e o *Panstrongylus megistus* eram os principais vetores, a prevalência da infecção por *T. cruzi* em crianças de sete a 14 anos de idade caiu 99,8% entre os anos de 1980 e 1999 (Moncayo e Ortiz Yanise, 2006).

O Inquérito Nacional da Soroprevalência iniciado em todas as regiões do país e dirigido ao grupo de faixa etária entre zero e cinco anos mostrou uma prevalência na ordem de  $10^{-5}$ . Uma clara indicação que a transmissão, se ocorre, é somente acidental (Massad, 2007). Com base em dados soropidemiológicos e entomológicos o Brasil recebeu, em nove de junho de 2006, da Organização Pan Americana da Saúde (OPAS), o Certificado Internacional da Eliminação da transmissão da doença de Chagas por *Triatoma infestans* (Massad, 2007).

Este avanço no controle vetorial de *T. infestans* causou um enorme impacto, modificando consideravelmente a epidemiologia da doença, no que diz respeito à sua incidência e forma de transmissão (Coura *et al.*, 2007). Na última década a transmissão de *T. cruzi* através da via oral tem crescido em frequência e número de casos em várias regiões brasileiras, especialmente na região norte do país, onde centenas de casos de doença de Chagas aguda têm sido relatados (Pinto *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2007). Em 2005, um surto de doença de Chagas aguda ocorreu na localidade de Navegantes, Santa Catarina, por transmissão oral, devido à ingestão de caldo de cana contaminado com *T. cruzi* (Steindel *et al.*, 2008). Em Igarapé da Fortaleza no Amapá, a secretaria de vigilância em saúde (SVS) informou a ocorrência de transmissão oral da doença de Chagas em 2005. No Ceará, na cidade de Redenção, ocorreu caso agudo de doença de Chagas devido à transmissão oral (alimento desconhecido), em março de 2006. Em Macaúbas, Bahia, em maio de 2006, caso agudo devido possivelmente à ingestão de refresco. Ainda na Bahia, na localidade de Ibipitanga, em outubro de 2006, ocorreu caso agudo da doença de Chagas devido à ingestão de caldo de cana (SVS/MS).

Por outro lado, casos autóctones, que até recentemente vinham sendo detectados de maneira esporádica na região Amazônica, têm aumentado gradativamente nos últimos anos (Coura *et al.*, 2007). Recentemente, casos fatais de miocardiopatia chagásica crônica autóctone têm sido reportados no Rio Negro, estado do Amazonas (Albajar *et al.*, 2003; Xavier *et al.*, 2006).

Em várias regiões do país, antes endêmicas para *T. infestans*, verificou-se que algumas espécies de triatomíneos silvestres, até então de importância secundária na transmissão de *T. cruzi*, têm apresentado um comportamento de ocupação de ecótopos que era usado anteriormente por *T. infestans*, o que pode significar uma expansão

geográfica da endemia em médio e longo prazo (Silveira e Resende, 1994). Espécies de triatomíneos praticamente desconhecidas podem exercer um papel importante em situações particulares, como foi o caso do *Triatoma tibiamaculata* no surto da doença de Chagas aguda em Santa Catarina ocorrido em 2005 (Steindel *et al.*, 2008).

A transfusão sanguínea constitui o segundo mecanismo de importância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas onde a alta prevalência se estabelece nas grandes cidades (Rohwedder, 1969, Schmunis, 1985). Outras formas de transmissão possíveis são a transmissão materno-infantil, por via transplacentária, pelo leite materno e pelo coito (Bittencourt, 1976; Bittencourt, 1984; Bittencourt *et al.*, 1985).

A doença de Chagas no homem apresenta um curso bastante variado (WHO, 2002). Em virtude desta grande variabilidade clínica e epidemiológica, tem sido sugerido que fatores genéticos e imunológicos dos pacientes influenciam na evolução clínica da doença. Por outro lado, acredita-se que características genéticas da população de parasitos envolvidos, também tenham um papel importante no desenvolvimento das formas clínicas (Macedo & Pena, 1998).

Na transmissão vetorial de *T. cruzi*, o ciclo de maior importância epidemiológica é o doméstico, pois perpetua a infecção em seres humanos (Garcia *et al.*, 2005). O ciclo doméstico é resultante do contato entre o homem, animais domésticos e o vetor, envolvendo a colonização de ecótopos artificiais pelos triatomíneos. Normalmente, essa colonização é resultante de modificações sociais e ecológicas no meio ambiente, provocadas pelo próprio homem. Neste ciclo, o parasitismo pode causar importantes danos aos hospedeiros vertebrados, com alto grau de morbidade e mortalidade nas pessoas infectadas (Dias, 2000).

O ciclo silvestre de *T. cruzi* envolve a interação de vetores e hospedeiros silvestres em ecótopos naturais do continente americano. No âmbito silvestre, tem-se registrado mais de 100 espécies de pequenos mamíferos infectados naturalmente com *T. cruzi*, uma relação aparentemente muito antiga, que proporciona real equilíbrio entre hospede e hospedeiro, sem dano para nenhuma espécie (Barreto, 1979). A maior importância é dada aos reservatórios capazes de aproximar-se dos seres humanos, especialmente alguns marsupiais (gambás, em geral) e ratos. Esses animais não só trazem o parasito para o peridomicílio do homem, na procura de alimento e abrigo, como também ajudam na dispersão dos triatomíneos. Os animais silvestres citados como reservatórios naturais para *T. cruzi* são: os marsupiais (gambás, marmotas e cuícas), os desdentados (tatus), os roedores (ratos e cobaias silvestres), os carnívoros (gatos, cachorros do mato, pequenas raposas etc.), os primatas (vários tipos de macacos), quirópteros (morcego) e os lagomorfos (coelhos e lebres) (Dias, 2000). Os

marsupiais são classicamente considerados como os mais importantes reservatórios silvestres de *T. cruzi*, sendo os primeiros que podem representar o grupo de ligação entre os ciclos silvestre e doméstico do parasito (Deane *et al.*, 1984; Fernandes *et al.*, 1999).

## 1.2 - Os vetores

Os hospedeiros invertebrados e vetores de *T. cruzi* são insetos pertencentes à Ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Todos os triatomíneos são obrigatoriamente hematófagos. A maioria das espécies ocorre nas Américas, com exceção do gênero *Linshcosteus* na Índia e de *T. rubrofasciata* que está distribuído em todas as regiões tropicais. Estudos filogenéticos sugerem que a subfamília Triatominae evoluiu independentemente nas Américas, após a separação dos continentes (Schofield 1988, Schofield e Dolling 1993; Schofield, 2001).

A família Reduviidae é bastante antiga, registros fósseis sugerem que seus ancestrais são hemípteros fitófagos do período Permiano/Triássico (~230 ma). A adaptação a hematofagia é um processo relativamente recente que ocorreu gradativamente. A hipótese mais provável é que a hematofagia obrigatória tenha derivado de hábitos predadores seguidos de hematofagia facultativa (Schofield 1988, Schofield e Dolling 1993; Schofield, 2001).

O Novo Mundo é o centro de diversidade dos triatomíneos e, provavelmente, também o centro de origem. O tempo de divergência entre Triatomini e Rhodiniini foi estimado em aproximadamente 48.9-64.4 mya, no terciário, quando a América do Sul começou a se separar da Antártica e Austrália (Tartarotti & Sommaruga 2006). A atual distribuição geográfica das espécies de triatomíneos corrobora esta hipótese, uma vez que a distribuição de espécies e complexos está relacionada à geografia moderna do continente americano após o Pleistoceno. As exceções a esta distribuição são *R. prolixus*, *T. infestans* e *T. rubrofasciata*, que sofreram intervenção humana, e *T. maculata* (Venezuela) e *T. pseudomaculata* (nordeste do Brasil) associados à aves migratórias (Schofield, 1988; Schofield e Dujardin, 1999; Schofield, 2000).

Os triatomíneos são divididos em seis tribos com 15 gêneros: Triatomini (*Triatoma*, *Meccus*, *Dipetalogaster*, *Mepraia*, *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Hermanlenticia*, *Paratriatoma*), Rhodiniini (*Rhodnius*, *Psammolestes*), Cavernicolini (*Cavernicola*, *Torrealbaia*), Bolboderini (*Bolbodera*, *Belminus*, *Parabelminus*, *Microtriatoma*) e

Alberprosenini (*Alberprosenia*). O grupo é formado por cerca de 140 espécies, 105 no Novo Mundo, sendo a maior parte distribuída nas Américas e associadas a ciclos enzoóticos. As teorias atuais sugerem uma origem polifilética para Triatominae. As tribos Rhodniini, Cavernicolini, Bolboderini, Linshcosteini e Alberproseniini são monofiléticas e Triatomini é polifilética (Tartarotti & Sommaruga 2006, Schofield & Galvão, 2009).

Triatomíneos do gênero *Triatoma* e *Panstrongylus* são encontrados predominantemente associados à habitats terrestres como rochas, abrigos de animais e ocos de árvores. Algumas espécies de *Panstrongylus* são encontradas também em habitats arbóreos (Gaunt e Miles 2000). O gênero *Panstrongylus* compreende 14 espécies amplamente distribuídas em todas as Américas com registros do México até a Argentina, algumas delas com grande importância epidemiológica como vetores da doença de Chagas.

No Brasil, a colonização de habitações por triatomíneos humanas ocorreu em áreas de Caatinga e Cerrado. Na Mata Atlântica não existem espécies adaptadas ao ambiente doméstico. No entanto, casos autóctones de doença de Chagas têm sido atribuídos à transmissão por adultos de *T. vitticeps*, que invadem casas vindos de áreas remanescentes de floresta, encontrados em ninhos de marsupiais com altas taxas de infecção por *T. cruzi* (dos Santos *et al.*, 2005).

Um aspecto muito importante da história evolutiva do *T. cruzi* é a associação de populações (linhagens) com gêneros e espécies de triatomíneos, e seus respectivos ecótopos e nichos ecológicos. A tribo Cavernicolini é a mais divergente e está fortemente associada com morcegos. As espécies do gênero *Rhodnius* estão associadas com palmeiras. O gênero *Panstrongylus* é predominantemente encontrado em tocas de animais e ocos de árvores, já o gênero *Triatoma* é terrestre e está associado com habitats rochosos e tocas de roedores. Algumas espécies de *Triatoma* podem ser encontradas exclusivamente em ocos de árvores e/ou ninhos de pássaros (*T. maculata*, *T. platensis*, *T. delpontei*), outras exibem uma clara preferência por rochas ou cavernas. Algumas espécies podem exibir uma relação estreita com um ecótopo (*R. brethesi* com a palmeira *Leopoldina piassaba*) enquanto outras apresentam uma gama de ecótopos (*P. megistus* e *T. dimidiata*). São raras as espécies de triatomíneos encontradas em árvores, apenas *T. infestans* e *T. sórdida*, cujas populações vivem em regiões de altitude onde habitam rochas, quando estão na região de várzea vivem em árvores (Dujardin *et al.*, 2000; Gaunt e Miles 2000; Noireau *et al.*, 2000).

### 1.3 - *Triatoma vitticeps*

Stal (1859), quando descreveu a espécie *Conorhinus vitticeps*, hoje *T. vitticeps* (Figura 1), determinou como localidade tipo Rio de Janeiro, ficando, esta informação incompleta por não definir se tratava-se da cidade ou do Estado. Após este achado, Neiva (1914) registrou a ocorrência de *T. vitticeps* em Conceição de Macabu, naquela época, distrito do Município de Macaé, hoje Município de Conceição de Macabu. Devido à precisão das informações, Lent (1942) sugeriu que esta fosse considerada como localidade tipo de *T. vitticeps*. Posteriormente, Pinto (1931 *apud* Lent 1942) assinalou a presença da espécie em Magé e Lent (1942) em Nova Friburgo, na localidade de Secretario, do município de Petrópolis e no Distrito Federal, àquela época a cidade do Rio de Janeiro. No Estado de Minas Gerais, foi encontrada pela primeira vez por Martins *et al.* (1940) e no Estado do Espírito Santo segundo citado por Lent (1942).

Atualmente, a distribuição geográfica de *T. vitticeps* abrange os Estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Gonçalves, 2000).

Quanto a presença de infecção natural por *T. cruzi*, o primeiro registro foi feito por Neiva (1914), em um espécime de *T. vitticeps* procedentes de Conceição de Macabu. Entretanto, experimentalmente, o mesmo autor não conseguiu comprovar a competência vetorial da espécie em relação a *T. cruzi*.

Zeledón (1974) e Barreto (1976) classificaram *T. vitticeps* como uma espécie totalmente silvestre, embora o segundo autor relate a sua penetração no ecótopo artificial, originando pequenas colônias.

Taxas de infecção por formas semelhantes a *T. cruzi* foram avaliados em espécimes capturados no domicílio: 4%, por Santos *et al.* (1969) em Alfredo Chaves (ES); 25.2%, Silveira *et al.* (1983) em Cachoeiro do Itaperimim Guarapari (ES); 35.2%, Ferreira *et al.* (1986) em 12 municípios do Estado do Rio de Janeiro; 64.70%, Sessa e Carias (1986) em 19 municípios do Estado do Espírito Santo e 70.2% e 51.8%, respectivamente para fêmeas e machos, por Dias *et al.* (1989) (ES). Apesar da elevada taxa de infecção deste inseto e da sua frequente invasão ao domicílio humano em determinadas localidades, as chances de haver transmissão aos humanos são remotas, em virtude da lentidão apresentada por *T. vitticeps* para defecar (Dias, 1955; Diotaiuti *et al.*, 1987; Gonçalves *et al.*, 1988).

Estudos concernentes à biologia de *T. vitticeps* em condições de laboratório (Dias, 1955; Heitzmann-Fontenelle, 1980; Silva, 1985; Gonçalves *et al.*, 1989) e à susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* visando o emprego deste triatomíneo no xenodiagnóstico (Neves *et al.*, 1972; Perlowagora-Szumlewicz *et al.*, 1990), contribuíram para o melhor conhecimento da espécie. Os resultados dessas observações sugeriram que *T. vitticeps* seria uma espécie que não representaria grandes preocupações sob o ponto de vista epidemiológico. Entretanto, é importante a manutenção da vigilância epidemiológica, uma vez que espécimes vêm invadindo com frequência o domicílio e com elevada taxa de infecção por *T. cruzi*.



Créditos: Genilton Vieira

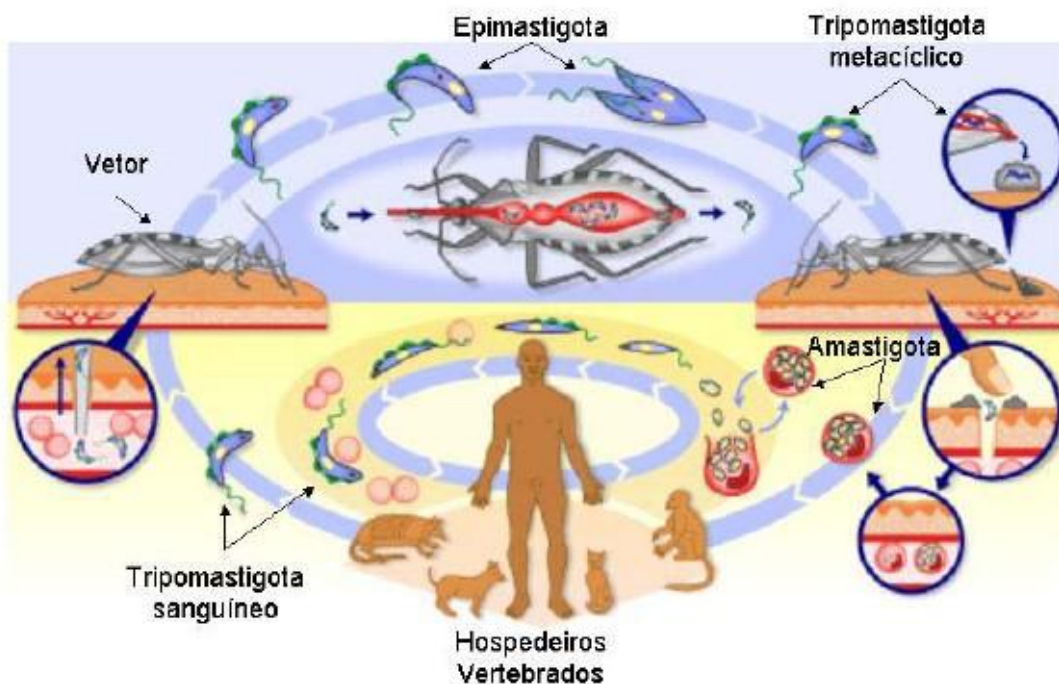
**Figura 1:** *Triatoma vitticeps*.

#### 1.4 – O Parasito: *Trypanosoma cruzi*

É um parasito hemoflagelado pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, possuindo uma estrutura denominada cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de DNA localizado dentro da mitocôndria única. Por pertencer à seção Stercoraria dentro do gênero *Trypanosoma*, apresenta um desenvolvimento no intestino do inseto vetor que culmina com a liberação de formas infectivas pelas fezes (Hoare, 1972). O *T. cruzi* apresenta um ciclo evolutivo complexo incluindo formas evolutivas distintas (amastigota, tripomastigota e epimastigota).

Em condições naturais, formas infectantes do parasito são transmitidas pelos vetores através do contato com as fezes e/ou urina contaminada, com a pele e mucosa do hospedeiro vertebrado. Quando um triatomíneo deposita estas excretas na pele lesada ou mucosa sã do hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas penetram ativamente em células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SMF). Estas formas se transformam em amastigotas, se multiplicam intensamente por divisão binária, rompem a célula e caem na corrente sanguínea sob a forma tripomastigota a qual penetra em células vizinhas ou em outras distantes, como células musculares e nervosas. Dentro destas novas células, se transformam novamente em amastigota e continuam o ciclo. Durante o hábito alimentar do inseto no hospedeiro humano, as formas tripomastigotas que estão circulando no sangue, são ingeridas e no intestino do hospedeiro invertebrado se transformam em epimastigotas. Ao migrarem para a porção posterior do intestino do inseto, as formas epimastigotas sofrem metaciclogênese e originam novamente os tripomastigotas metacíclicos (Figura 2) (Buscaglia & Di Noia, 2003).





**Figura 2:** Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. (Modificado de: TDR/Wellcome Trust. Acesso em: 1/02/2006 .[www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm)).

## 1.5 - Caracterização Molecular do *Trypanosoma cruzi*

### 1.5.1 - Genoma do *T. cruzi*

Como ocorre nos eucariontes, *T. cruzi* possui dois genomas distintos, situados em dois compartimentos celulares bem definidos: o núcleo e a mitocôndria. Nos tripanossomatídeos, a mitocôndria apresenta características peculiares, albergando uma rede complexa de moléculas circulares de DNA denominada de cinetoplasto ou kDNA (Borst *et al.*, 1982).

Uma característica interessante do *T. cruzi* é o fato do tamanho do genoma variar extensivamente entre cepas e clones da mesma cepa (Henriksson *et al.*, 1996).

A análise da cinética de renaturação de DNA de *T. cruzi* mostrou que aproximadamente 9–14% do DNA total do parasito é composto por seqüências altamente repetitivas (Requena *et al.*, 1996).

O kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares que diferem em tamanho e função denominadas de minicírculo e maxicírculo (Shapiro & Englund, 1995). Os minicírculos possuem cerca de 1.400 pb e estão presentes em 10.000 a 20.000 cópias por células. Apresentam 4 regiões de 120 a 160 pb de seqüência bastante conservada entre si e as regiões variáveis têm cerca de 280 a 320 pb (Degraeve *et al.*, 1988; Sturm *et al.*, 1989), estas

seqüências presentes nos minicírculos não codificam peptídeos. As seqüências variáveis são transcritas gerando pequenos RNAs denominados RNAs guia (gRNAs), moléculas que estão envolvidas no processo de editoração dos RNAm das enzimas mitocondriais. Neste processo, a maioria dos transcritos dos genes provenientes dos maxicírculos só podem ser traduzidos em proteínas após a adição ou deleção de resíduos de uridina (Stuart *et al.*, 1997; Hajduk *et al.*, 1997).

O sequenciamento completo do genoma de *T.cruzi*, juntamente com o de outros tripanossomatídeos foi concluído em 2005, porém ainda não foi possível realizar a montagem completa devido ao grande número de seqüências repetitivas (Berriman *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005a e 2005b). O clone escolhido para o sequenciamento foi CL Brener, em função de sua caracterização experimental estar bem estabelecida, ter sido isolado de *Triatoma infestans*, um vetor domiciliado; por ser infectivo para camundongos; por ter um miotropismo evidente, verificando lesões inflamatórias no miocárdio e no músculo esquelético e liso das paredes internas com o acometimento dos plexos mionéricos e lesões neuronais; por mostrar uma fase aguda claramente definida em humanos infectados e finalmente, por ser susceptível à drogas usadas no tratamento clínico da doença de Chagas. Este clone parece ser geneticamente estável, no que diz respeito ao comportamento de uma série de caracteres fenotípicos e genotípicos (isoenzimas, esquizodema, RAPD e impressão digital de DNA) (Zingales *et al.*, 1997).

De acordo com os dados do sequenciamento, *T.cruzi* é um organismo diplóide cujo genoma compreende cerca de 60 Mb com aproximadamente 12.000 genes (El-Sayed *et al.*, 2005a). Também foi demonstrado que pelo menos 50% do genoma do parasito é constituído de seqüências repetitivas consistindo principalmente de famílias gênicas de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas. A maior das famílias gênicas codifica proteínas de superfície como membros da superfamília da trans-sialidases, mucinas, proteínas associadas à mucina (MASP) e a glicoproteína de superfície gp 63. Todas estas proteínas são *T. cruzi*-específicas e representam 18% do total de genes codificantes de proteína no genoma do parasito. Inúmeras classes de moléculas sinalizadoras estão ausentes em tripanossomatídeos, incluindo receptores de serpentina, proteínas heterotriméricas G, domínios de interação SH2 e SH3 e fatores de regulação transcricional. Ainda dentro deste contexto, foram identificadas 167 proteína cinases distintas (El-Sayed *et al.*, 2005).

Os membros da superfamília das trans-sialidases, mucinas, proteínas associadas à mucina (MASP) e a glicoproteína de superfície gp 63 estão envolvidos nos processos de

adesão e invasão das células do hospedeiro mamífero, virulência e evasão do sistema imune do hospedeiro (Frasch,1994).

### 1.5.2 - Diversidade Genética em *T. cruzi*

*T. cruzi* é um parasito heterogêneo, cujas cepas são constituídas por diferentes sub-populações ou clones que circulam na natureza entre triatomíneos vetores, mamíferos silvestres e domésticos, incluindo o homem. A necessidade de adaptação e sobrevivência em diferentes hospedeiros parece ser responsável pela grande diversidade genética do parasito (Silveira, 2000). A heterogeneidade de cepas de *T. cruzi* tem sido demonstrada utilizando-se diferentes marcadores: morfológico, biológico, suscetibilidade aos quimioterápicos, imunológico, bioquímico e molecular (Brenner, 1977; Krettli *et al.*, 1979; Miles *et al.*, 1980; Schlemper Jr *et al.*, 1983 e 1986; Filardi e Brenner, 1987; Steindel *et al.*, 1993 e 1995; Zingales *et al.*, 1998).

Avanços consideráveis têm sido realizados para entender a composição genética do *T. cruzi* e o processo que envolve o controle da expressão gênica do parasito. Marcadores genéticos moleculares do *T. cruzi* têm sido usados para correlacionar diferentes cepas com suas distintas propriedades biológicas, manifestações clínicas e características epidemiológicas (Moncayo e Ortiz Yanise, 2006).

A aplicação de modernas metodologias no estudo e na caracterização de cepas de *T. cruzi* permitiu avanços significativos no conhecimento da biologia e epidemiologia deste parasito. A eletroforese de enzimas foi uma das primeiras técnicas moleculares utilizadas na tipagem de cepas de *T. cruzi* (Toyé, 1974; Miles *et al.*, 1977). Inicialmente, o estudo de isoenzimas revelou uma grande heterogeneidade genética do parasito e permitiu o agrupamento de cepas em diferentes zimodemas (Miles *et al.*, 1977, 1978 e 1980). A caracterização de amostras brasileiras mostrou a existência de três diferentes grupos de cepas, denominados zimodemas 1 (Z1), 2 (Z2) e 3 (Z3). Os zimodemas 1 e 3 foram observados em marsupiais e triatimíneos silvestres e em casos humanos agudos, caracterizando o ciclo silvestre de transmissão. O Zimodema 2 observado em mamíferos domésticos e humanos caracterizou o ciclo doméstico (Miles *et al.*, 1977, 1978, 1980 e 1981; Devera *et al.*, 2003). Embora altamente informativos do ponto de vista epidemiológico, os grupos isoenzimáticos não mostraram correlação com as características clínicas da doença no homem (Miles *et al.*, 1977, 1978 e 1980; Romanha, 1982). A comparação dos zimodemas descritos por Romanha (1979) e

Romanha *et al.* (1982), com aqueles descritos por Miles *et al.* (1977 e 1978), mostrou grande similaridade entre os zimodemas ZA e Z2. Os demais zimodemas foram distintos entre si. Desta forma, admite-se que, no Brasil, o *T. cruzi* esteja distribuído em pelo menos seis grupos isoenzimáticos principais: Z1, Z2 ou ZA, Z3, ZB, ZC e ZD.

Estudos posteriores de 15 *loci* gênicos de 121 cepas isoladas de diferentes hospedeiros e regiões geográficas da América do Sul através de isoenzimas revelaram uma elevada heterogeneidade do táxon *T. cruzi* (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc 1995). Com esses dados os pesquisadores concluíram que a estrutura da população do *T. cruzi* é clonal e que a variabilidade genética encontrada é o resultado da evolução independente de linhagens clonais (Tibayrenc *et al.*, 1986, 1995). Além disso, a presença do fenótipo heterozigoto em vários *loci* estudados reforçou a hipótese de diploidia em *T. cruzi*. Embora a possibilidade de reprodução sexual em *T. cruzi* tenha sido discutida por diferentes autores Morel *et al.* (1986), Thompson e Lymbery (1990), Tibayrenc (1995, 2003), Gaunt *et al.*, (2003), estudos de isolados do parasito obtidos de diferentes regiões geográficas suportam uma estrutura de reprodução clonal.

Adicionalmente, a variabilidade genética em *T. cruzi* tem sido demonstrada por diferentes técnicas moleculares, como a análise dos perfis de DNA de cinetoplasto (kDNA), clivado com diferentes endonucleases de restrição (esquizodemas) (Morel *et al.*, 1980; Ávila *et al.*, 1988), DNA “fingerprinting” (Macedo *et al.*, 1992); a amplificação de fragmentos de DNA através da PCR utilizando-se iniciadores com sequências nucleotídicas aleatórias (RAPD) (Steindel *et al.*, 1993; Tibayrenc *et al.*, 1993), gene do Mini-Exon, DNAr (Fernandes *et al.*, 1998; Souto *et al.*, 1996) e microssatélites (Oliveira *et al.*, 1998), entre outras, têm sido utilizadas.

Baseado na seqüência de genes de RNA ribossomal 24S $\alpha$  e o Mini-Exon, o *T. cruzi* pode ser dividido em dois grupos bem definidos que coincidem com a dicotomia revelada por isoenzimas (Miles *et al.*, 1977, 1980; Souto e Zingales, 1993; Souto *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1998; Devera *et ali.*, 2003).

Para padronizar a nomenclatura, duas principais linhagens foram adotadas em 1999 em uma reunião realizada durante o Simpósio Internacional Comemorativo dos 90 anos da descoberta da doença de Chagas, no Rio de Janeiro: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Cepas híbridas e pertencentes ao zimodema Z3 não puderam ser classificadas como *T. cruzi* I e II. Ficou estabelecido que estas cepas seriam identificadas como *T. cruzi*, sem qualquer denominação (Anonymous, 1999).



2001). Para melhor acomodar as cepas híbridas dentro do *T. cruzi* II, Brisse *et al.* (2000b, 2001) propôs a subdivisão desta linhagem em cinco subgrupos (IIa, IIb, IIc, IId e Iie). Entretanto, esta estratégia não levou em conta o fato de que, dependendo da característica analisada, as cepas híbridas são mais relacionadas com *T. cruzi* I ou até diferentes de ambas as linhagens (Souto *et al.*, 1996; Briones *et al.*, 1999; Machado e Ayala, 2001, 2002; Augusto-Pinto *et al.*, 2003). Uma alternativa, seria denominar estas cepas híbridas de linhagem *T. cruzi* III (Machado e Ayala, 2001, 2002; Augusto-Pinto *et al.*, 2003).

Os mecanismos envolvidos na elevada variabilidade do táxon são objeto de discussão. Estudos recentes utilizando clones de *T. cruzi* transfectados contendo o gene de resistência à higromicina e à neomicina mostraram que a troca de material genético com formação de híbridos ocorreu durante o ciclo de reprodução intracelular em células Vero (Gaunt *et al.*, 2003). É possível que a troca de material genético possa também ocorrer durante a passagem do parasito no hospedeiro invertebrado. Segundo Gaunt *et al.* (2003), além da recombinação genética clássica, outros mecanismos como aneuploidia e perda de alelos podem contribuir para a variabilidade genética observada entre populações naturais de *T. cruzi*.

O método RDA (Representational Difference Analysis) foi utilizado por Toma *et al.* (2007) para encontrar novos marcadores moleculares para discriminar os grupos filogenéticos de *T. cruzi* I e II. Os clones (F#30 e Y#22) obtidos com esta técnica reconheceram especificamente isolados da Amazônia (*T. cruzi* I) e do Piauí (*T. cruzi* II). Estes segmentos genéticos correspondem a uma proteína hipotética (F#30) e a uma trans-sialidase (Y#22). A análise da sequência F#30 em amostras de *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e zimodemas 3 mostrou que diferenças específicas muito pequenas distinguem cada grupo. Além disso, o gene F#30 mostrou grande potencial como marcador para detecção de cepas híbridas.

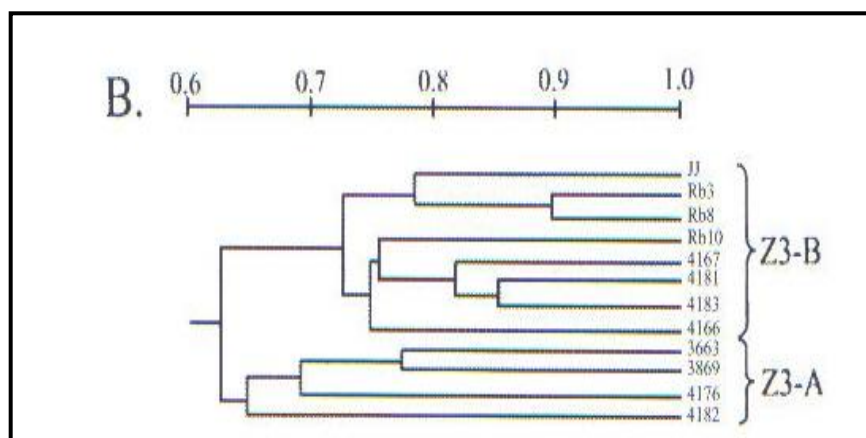
### **1.5.3 - Heterogeneidade do *T. cruzi*: Zimodema III**

Em 1977, Miles e colaboradores, utilizando a mobilidade eletroforética de 6 enzimas, caracterizaram grupos de *T. cruzi* de ciclos silvestres e domésticos transmitidos por diferentes vetores provenientes da cidade de São Felipe, Bahia. Um grupo de cepas, nomeado de Z1, foi principalmente encontrado em gambá e em espécies de triatomíneos silvestres. Um segundo grupo de isolados, provenientes de casos agudos e crônicos da doença de Chagas,

Amazônia brasileira e triatomíneos domiciliados, foi identificado como Z2. Posteriormente, Miles e colaboradores (1978), compararam os zimodemas encontrados em São Felipe com os seis primeiros casos da fase aguda da doença de Chagas encontrados na Amazônia brasileira, Brasil. Os dados mostraram que dois dos seis casos do Amazonas associaram-se com o Z1 encontrado em São Felipe. Vale ressaltar, que não havia sido reportada a presença de isolados humanos neste zimodema. Os outros quatro casos (todos encontrados na mesma casa) mostraram um novo padrão de isoenzimas, caracterizados como ZIII. Posteriores caracterizações, de mais 60 isolados de *T. cruzi* de mamíferos e vetores silvestres, demonstraram seus agrupamentos no ZI. Por sua vez, o ZIII seria ocasionalmente encontrado em ciclos enzoóticos que se limitam a região Amazônica. Assim, os autores concluíram que os três grupos de *T. cruzi* encontrados podem infectar o homem no Brasil, todos os três zimodemas podem causar a forma aguda da doença de Chagas e apenas o ZII causaria a síndrome crônica da doença de Chagas no estado da Bahia (Miles *et al.*, 1978). Em uma caracterização mais extensiva de isolados de *T. cruzi* do Brasil, com um número superior a 18 enzimas, mostrou-se uma maior complexidade e heterogeneidade nos três zimodemas propostos (Miles *et al.*, 1980). Estudos baseado no perfil de 24 isoenzimas sugerem que ZIII esteja mais perto de *T. cruzi* I do que *T. cruzi* II (Ready & Miles, 1980).

Miles e colaboradores, (1981) analisando isolados de *T. cruzi* de mamíferos e triatomíneos silvestres de indivíduos com doença de Chagas, observaram um predomínio absoluto do *T. cruzi* I e ZIII silvestres na Amazônia brasileira, com registros também na Bahia (Barrett *et al.*, 1980), Venezuela (Miles *et al.*, 1981), Colômbia (Saraiva *et al.* 1987) e USA (Brisse *et al.*, 2000). O Zimodema III demonstra ser raro, com uma distribuição larga, mas esporádica ( Miles & Cibulskis 1986), tendo sido isolado em poucas espécies de triatomíneos: *P. geniculatus*, *Rhodnius robustus* e *R. brethesi*. A descrição dos isolados de ZIII em humanos é esporádica e os estoques obtidos são de pacientes na fase aguda da doença de Chagas (Miles & Cibulskis, 1986).

Através de estudos filogenéticos baseados no perfil de RFLP-ITS-rDNA (*Restriction Fragment Length Polymorphis*) com isolados de ZIII da Amazônia brasileira, demonstrou-se uma clara dicotomia entre isolados deste grupo que permitiu dividi-lo em dois subgrupos denominados ZIII A e ZIII B, em que a distância genética mostrou um baixo nível de heterogeneidade (Figura 3, Mendonça *et al.*, 2002). As cepas foram tipadas amplificando a região intergênica do gene de mini-exon por PCR multiplex que distinguiu o ZIII do *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e *T. rangeli* (Fernandes *et al.*, 2001).



**Figura 3:** Dendrograma filogenético gerado após a análise do RFLP ITS-rDNA (4 enzimas distintas) de isolados de Z III da região Amazônica, onde a cepa 3663 está alocada como ZIII-A e 4167 como ZIII-B.

Brisse e colaboradores (2000a), analisando 50 isolados de *T. cruzi* por MLEE (*Multi Locus Enzyme Electrophoresis*) (22 diferentes *loci* gênicos) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (20 iniciadores aleatórios), mostraram que isolados podiam ser agrupados em 2 grupos bem definidos, o primeiro grupo pertencente ao *T. cruzi* I e o segundo subdividido em 5 subgrupos 2a - 2e. No subgrupo 2a estava incluído o isolado CANIII (ZIII); no subgrupo 2b o isolado Esmeraldo (ZII); no subgrupo 2c os isolados M6421 e M5631 (ZIII com *locus* ASAT com perfil de ZI); no subgrupo 2d o ZII boliviano e no subgrupo 2e, a cepa CL Brener. Para uniformizar a nomenclatura proposta pelo comitê, os autores propuseram a designação de linhagens I e IIa-IIe. *T. cruzi* I corresponderia a ZI; *T. cruzi* IIb-e a ZII e *T. cruzi* IIa a ZIII, sugerindo que ZIII estaria mais próximo de *T. cruzi* II. Os mesmos autores (Brisse *et al.*, 2000b) desenvolveram um método de identificação baseado na PCR utilizando iniciadores específicos a partir dos fragmentos obtidos do perfil de RAPD, que discriminam os seis grupos de *T. cruzi*.

Com o objetivo de achar uma correspondência entre as linhagens encontradas por Souto e colaboradores (1996) usando os marcadores RNA ribossomal 24S $\alpha$ , gene de mini-exon e RAPD que definiram *T. cruzi* I e II e o perfil de MLEE e RAPD (Brisse *et al.*, 2000a,b), Brisse e colaboradores (2001) utilizaram todos os marcadores em conjunto associados ao *riboprinting* proposto por Stothard e colaboradores (1998) para caracterizar 50 isolados, confirmando assim os seis grupos (*T. cruzi* I, *T. cruzi* IIa-IIe).

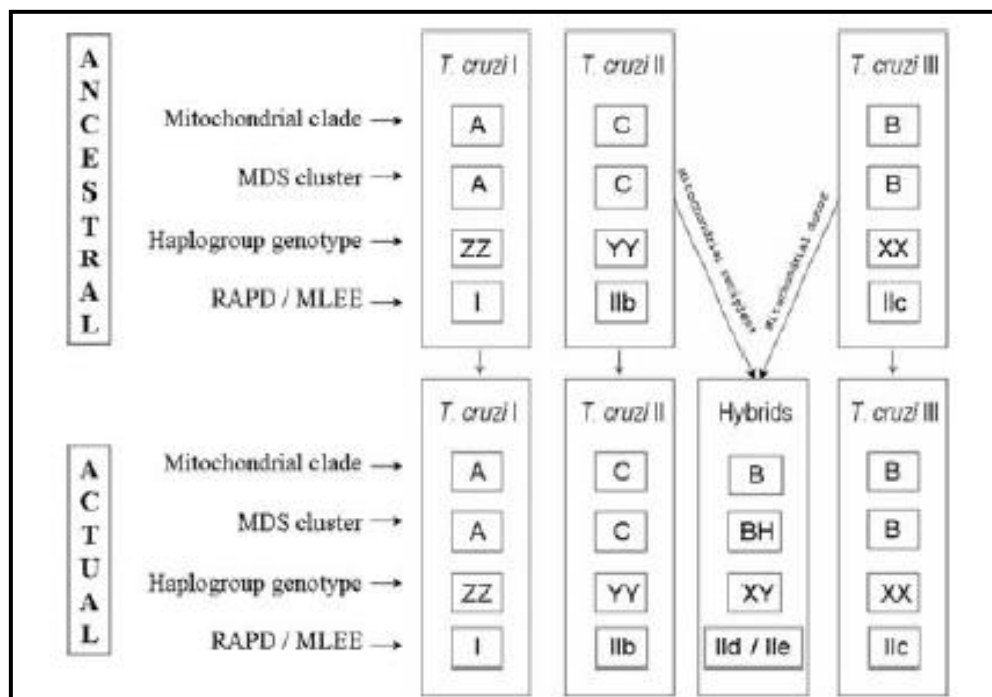


Análises baseadas em *riboprinting*, permitiu a construção de uma matriz onde um grupo continha isolados ZI e outro ZII e um ZIII; os outros isolados ZIII permaneceram intermediários entre esses dois grupos (Stothard *et al.*, 1998).

Recentemente, Brandão & Fernandes (2006) procurando uma nova evidência desta divergência entre *T. cruzi* estudaram a região 3' não traduzida (3'UTR) do gene da calmodulina. Este gene é essencial, pois modula o metabolismo de cálcio em várias atividades celulares (Hoelfling & Ikura, 2002). Foram observadas várias mutações localizadas no segmento de 330pb da 3'UTR dos quais três eventos de inserção/eliminação eram importantes: a presença do dinucleotídeo AG em isolados de ZIII, a ausência de 13 bases purinas em ZIII e cinco grupamentos de GT em *T. cruzi* II. Essas mutações em 3'UTR do gene da calmodulina levantam a possibilidade de que *T. cruzi* I e o ZIII estejam compartilhando vias funcionais comuns se comparados com os isolados de *T. cruzi* II (Brandão & Fernandes, 2006).

A posição de ZIII em relação aos grupos *T. cruzi* I e II continua controversa. Alguns autores consideram que ZIII está mais perto filogeneticamente do *T. cruzi* I do que do *T. cruzi* II (Miles *et al.*, 1981; Fernandes *et al.* 1998b; Brandão & Fernandes, 2006). Enquanto outros autores sugerem que ZIII esteja mais perto filogeneticamente do *T. cruzi* II (Barnabé *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2000; Machado & Ayala, 2001; Toma, 2005).

A estrutura populacional de *T. cruzi* esta distante de ser completamente entendida. Embora a existência de dois grupos seja bem aceita, incertezas sobre a existência ou não de um terceiro grupo ancestral têm sido levantadas (Pedroso *et al.*, 2003; Brisse *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2003). Baseado em dados de microsatélite - *multidimensional scaling plot* (MDS) e análises por RFLP do gene mitocondrial COII (citocromo oxidase subunidade II) foi demonstrado que todas as cepas agrupadas no grupo B e BH (ZIII e as cepas híbridas, respectivamente) pertenciam ao mesmo grupo mitocondrial B (Freitas *et al.*, 2006). Neste artigo foi demonstrado que o grupo mitocondrial B é uma terceira divisão filogenética de *T. cruzi*, distinto de *T. cruzi* I (grupo mitocondrial A) e *T. cruzi* II (grupo mitocondrial C). Baseado nesses resultados, foi proposto um cenário para a evolução das populações de *T. cruzi*, onde no passado existiram três grupos ancestrais (MDS *cluster* A, C, e B - Figura 4). É interessante observar que esta proposta combina com a sugestão inicial feita por Miles e colaboradores (Miles *et al.*, 1978) há quase 30 anos com base em estudos de isoenzimas. Provavelmente, *T. cruzi* II e *T. cruzi* III tiveram nichos ecológicos sobrepostos e, assim, as condições necessárias para hibridização (Freitas *et al.*, 2006)



**Figura 4:** Diagrama que representa o modelo proposto da evolução de cepas de *Trypanosoma cruzi* (Freitas *et al.*, 2006).

#### 1.5.4 - História evolutiva do *T. cruzi*

Diferentes hipóteses foram também formuladas a fim de explicar a evolução intraespecífica de *T. cruzi*. Os estudos iniciais baseados em zimodemas sugeriram uma associação de TCI e *Didelphis*, enquanto a linhagem TCII estaria associada com animais terrestres (Miles *et al.*, 1981a; Pova *et al.*, 1984; Gaunt e Miles, 2000). Diversos estudos sugerem que a linhagem TCI é nativa da América do Sul e está associada com marsupiais desde o final do Cretáceo (65 MYA), quando esse continente era uma ilha (Miles *et al.*, 1981a; Briones *et al.*, 1999; Kawashita *et al.*, 2001; Gaunt e Miles, 2000). De acordo com alguns autores, as linhagens TCI e TCII devem ter divergido quando uma população ancestral de *T. cruzi* (TCI) parasita de um marsupial passou a infectar xenartros (mais antigos placentários da América do Sul) e que isso pode ter ocorrido quando esses animais eram os únicos na América do Sul (Gaunt e Miles, 2000).

Outra hipótese sugere que a linhagem TcII teria surgido no Plioceno (5 MYA), após a conexão com a América do Norte e a introdução de mamíferos placentários na Américas Central e do Sul, ou no Oligoceno (38 MYA) em associação com roedores e

primatas (Briones *et al.*, 1999; Kawashita *et al.*; 2001). Estudos recentes sugerem que os primatas neotropicais, que provavelmente entraram nas Américas vindos da África, estão naturalmente associados com TcI na Amazônia e Mata Atlântica. Os casos de macacos infectados com TCII podem ter sido acidentais, causados pela infecção em cativeiro de micos leão-dourado que foram re-introduzidos na Mata Atlântica (Yeo *et al.*, 2005; Lisboa *et al.*, 2006). Os caviomorfos aparentemente chegaram as Américas na mesma época que os primatas e são, provavelmente, os mais antigos roedores hospedeiros de *T. cruzi*. Porém, também esses animais têm sido associados com TcI e somente quando capturados no peridomicílio de região endêmica da Doença de Chagas foram encontrados infectados por TcII (Herrera *et al.*, 2004). Isolados silvestres de *T. cruzi* dos USA (tatu, gambá e guaxinim) foram tipados como TcI ou Z3, mas nunca como TcIIb (Brisse *et al.*, 2001; Barnabé *et al.*, 2001; Roellig *et al.*, 2008a).

Além da associação preferencial com mamíferos, os ecótopos dos triatomíneos vetores e a associação destes com determinados mamíferos foram empregados a fim de sugerir histórias evolutivas para as linhagens de *T. cruzi*. O principal hospedeiro silvestre de TcI é o gambá *Didelphis marsupialis* que habita os ecótopos arbóreo e terrestre. Essa linhagem é transmitida por *Rhodnius* spp., que habitam somente ecótopos arbóreos, especialmente palmeiras. Apesar de associado preferencialmente a *Didelphis*, TcI tem sido descrito em outras espécies de marsupiais, roedores, primatas (Miles *et al.*, 1981; Pova *et al.*, 1984; Lisboa *et al.*, 2004; 2006). TcIIb, TcIIc e TCIIId estão associadas a *Triatoma infestans*, que tem hábito terrestre, e ao ambiente doméstico (homem e animais domésticos e do peridomicílio). Z3 foi associado com triatomíneos do gênero *Panstrongylus* (que habitam buracos e fendas de rochas) e principalmente com tatus, mas também foi encontrado em didelfídeos do gênero *Monodelphis*, todos animais de hábitos terrestres (Barrett *et al.*, 1980; Miles *et al.*, 1981; Gaunt e Miles, 2000; Yeo *et al.*, 2005).

A associação de *T. cruzi* e marsupiais parecer se bastante antiga, anterior a separação da Antártica e Austrália (~65 ma) (Stevens & Gibson 1999; 2001), indicando que esse parasita já infectava marsupiais nas Américas muito antes do aparecimento dos hemípteros vetores. Estudos realizados por Deane *et al.* (1984) fornecem uma possível explicação para esse cenário, demonstrando a existência de um ciclo equivalente ao que ocorre no vetor nas glândulas anais de gambás (*D. marsupialis*). Estudos posteriores também demonstraram a presença de *T. cruzi* nas glândulas anais de *D. marsupialis* e *D.*

*albiventris* naturalmente infectados (Steindel e Pinto, 1988; Fernandes *et al.*, 1989, 1991).

Esses dados levaram à hipótese da existência de tripanossomatídeos ancestrais associados com didelfídeos existentes no supercontinente sul há cerca de 65 ma (Stevens *et al.*, 1999, 2001).

Com a separação da América do Sul e Antártica (~40 ma) e as dispersão dos didelfídeos, esses tripanossomatídeos podem ter sido transmitidos diretamente entre os gambás através da secreção da glândula anal. No Pleistoceno (2,5 ma) os gambás, tatus, roedores cricetídeos e aves são comuns em toda a América do Sul, e os ninhos e abrigos destes animais devem ter sido atrativos para uma diversidade de reduvídeos predadores, que se tornaram hematófagos facultativos e, posteriormente, obrigatórios (triatomíneos), que foram responsáveis pela propagação dos tripanossomas a novos hospedeiros. Nas aves o *T. cruzi* não sobrevive devido à lise mediada pelo complemento (Kierszenbaum *et al.*, 1976), mas em roedores, tatús e morcegos sobrevive e sofreu pressões seletivas que levaram ao aparecimento das diversas linhagens de *T. cruzi*.

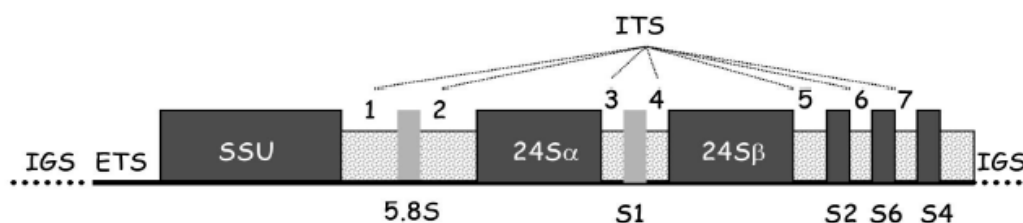
## 1.6 - Genes, seqüências e metodologias empregadas na análise de polimorfismo

### 1.6.1 - Gene ribossômico

Seqüências do gene ribossômico têm sido amplamente utilizadas para inferir relações filogenéticas entre os tripanossomatídeos e entre estes e representantes de outras famílias da ordem Kinetoplastida e filo Euglenozoa.

Os genes nucleares de rDNA dos tripanossomatídeos possuem uma estrutura complexa e característica, com um dos mais complexos padrões de moléculas maduras de RNA. A estrutura do DNA ribossômico (rDNA) compreende uma unidade de repetição composta por unidades de transcrição (cistrons ribossômicos) e espaçadores intergênicos (IGS), que se repetem "in tandem" mais de 100 vezes no genoma. Estes genes são processados em uma única unidade de transcrição, o pré-rRNA, seguido por diversas etapas de processamento originando três moléculas de RNA maduros: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 24S (LSU ou subunidade maior). Nos tripanossomatídeos, a seqüência da subunidade 24S é interrompida por um espaçador

interno, gerando duas moléculas, 24S $\alpha$  e 24S $\beta$ . As regiões transcritas não conservadas do pré-rRNA correspondem aos espaçadores transcritos internos (ITS) e externo (ETS). As unidades de transcrição dos genes ribossômicos são alternadas por uma região espaçadora, espaçador intergênico (IGS), com tamanho e seqüência altamente variáveis (Sogin *et al.*, 1986; Hernández *et al.*, 1990; Dietrich *et al.*, 1990) (Figura 5).



**Figura 5:** Representação esquemática do cistron ribossômico.

Os genes de rDNA têm se revelado bons marcadores para inferências de relacionamentos filogenéticos porque estão distribuídos universalmente e são funcionalmente equivalentes em todos os organismos conhecidos (Sogin *et al.*, 1986). A presença de diversas regiões, transcritas ou não, que exibem diferentes graus de variabilidade, acarretam um alto grau de polimorfismo dos cistrons ribossômicos e, por este motivo, têm se revelado excelente como ferramenta na identificação e em estudos filogenéticos dos tripanossomatídeos. Seqüências da subunidade menor, SSU, têm sido as mais utilizadas devido a diversas características, tais como o tamanho, a facilidade de obtenção (amplificação por PCR) e a presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas que permitem alinhamentos altamente confiáveis. A subunidade SSU dos genes de rDNA de tripanossomatídeos possui oito regiões universalmente conservadas (U1-U8) e nove regiões variáveis (V1-V9) (Hernández *et al.*, 1990). Seqüências de SSU rDNA de diversas espécies e isolados do gênero *Trypanosoma* estão disponíveis em bancos, permitindo inferir o relacionamento de novas espécies, linhagens e isolados com as já estudadas.

Os espaçadores IGS são altamente variáveis comparadas com ITS que, por sua vez, são muito mais variáveis do que as regiões SSU e LSU. Análises de polimorfismo de seqüências ribossômicas têm sido utilizadas na identificação e genotipagem de linhagens de *T. cruzi*. O primeiro marcador padronizado foi baseado na região 24Sa da LSU, utilizado como alvo para um método de PCR que distingue as linhagens *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Souto *et al.*, 1996). Outro ensaio utilizou os genes SSU e LSU rRNA,

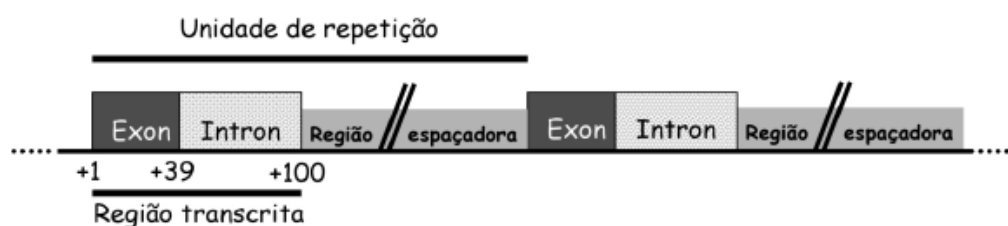
juntamente com o gene de mini-exon na distinção das 6 linhagens de *T. cruzi* (Brisse *et al.*, 2001). O método baseado no gene 24S LSU foi padronizado para PCR em tempo real utilizado na identificação de linhagens de *T. cruzi* diretamente em tecidos de pacientes cronicamente infectados com formas gastrointestinal e cardíaca da doença de Chagas (Freitas *et al.*, 2005).

O gene ITS do rDNA é composto por três regiões, ITS1, 5.8S (que é altamente conservado) e ITS2. Os espaçadores ITS1 e ITS2 diferem inter e intra-especificamente, sendo excelentes para análises de organismos filogeneticamente próximos, assim como alvos para diagnóstico e como marcadores taxonômicos. Análises comparativas de ITS rDNA revelaram variabilidade inter e intraespecífica em *Leishmania* e *Endotrypanum* (Cupolillo *et al.*, 1995, 2000), *T. cruzi* (Mendonça *et al.*, 2002), *T. rangeli* (Maia da Silva *et al.*, 2004b), *T. theileri* (Rodrigues *et al.*, 2006), espécies de tripanossomas Africanos (Desquesnes *et al.*, 2001; Njiru *et al.*, 2005; Cortez *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008) e tripanossomas de anuros (Ferreira *et al.*, 2007). Linhagens de *T. cruzi* também foram diferenciadas com análises de polimorfismo de restrição e de seqüências de ITS rDNA, que permitiu distinguir TCI, TCII, e diferenciar Z3 em Z3A e Z3B (Mendonça *et al.*, 2002; Cuervo *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002).

### 1.6.2 - Gene de mini-exon

Os genes de mini-exon ou “spliced leader” (SL) participam do mecanismo pós-transcricional denominado “trans-splicing” responsável pelo processamento que resulta na adição de seqüências de 39 nucleotídeos, denominadas “spliced-leader” ou mini-exon, na extremidade 5’ de todos os mRNAs maduros dos Kinetoplastida (Agabian, 1990).

Devido a sua organização composta por regiões com diferentes graus de conservação os genes de mini-exon têm sido utilizados com finalidades taxonômicas e para diagnóstico. Cada unidade de repetição do gene SL pode ser dividida basicamente em três partes: um exon altamente conservado de 39 nucleotídeos; um intron de 50-100 nucleotídeos moderadamente conservado, e uma região intergênica espaçadora que apresenta variações de tamanho e de seqüência entre espécies de tripanossomatídeos e linhagens de tripanossomas (Figura 6). Existem cerca de 200 cópias do gene SL repetidas “in tandem” no genoma dos tripanossomatídeos que são, assim, um bom alvo para diagnóstico (Agabian, 1990; Donelson e Zeng, 1990; Davis, 1996).



**Figura 6:** Representação esquemática da unidade de repetição do gene “Spliced leader”

A comparação de seqüências do gene SL de diversos tripanossomatídeos revelou regiões com diferentes graus de conservação entre gêneros e espécies. Entretanto, essas seqüências são úteis apenas para inferir graus de relacionamento genético entre espécies muito relacionadas, para análise de variabilidade genética e como alvo para diagnóstico de tripanossomatídeos, uma vez que são muito variáveis para permitir alinhamentos confiáveis entre organismos de espécies diferentes (Fernandes *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 1999b; Gibson *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2001; Maia da Silva *et al.*, 2007).

A identificação de linhagens de *T. cruzi* (genotipagem) utilizando métodos de PCR baseados em seqüências do gene de mini-exon tem sido amplamente utilizada (Souto *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1998a, b; Fernandes *et al.*, 1999; Brisse *et al.*, 2001). A utilização de métodos de PCR para genotipagem baseados nos genes de mini-exon e ribossômicos possibilitou a segregação de *T. cruzi* em duas grandes linhagens: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Souto *et al.*, 1996). Posteriormente, o método baseado em mini-exon foi modificado (novos primers) tornando possível a identificação da linhagem Z3, além de TCI e TCII (Fernandes *et al.*, 1998), e ainda foi possível segregar isolados de *T. rangeli* com esta metodologia (Fernandes *et al.*, 2001).

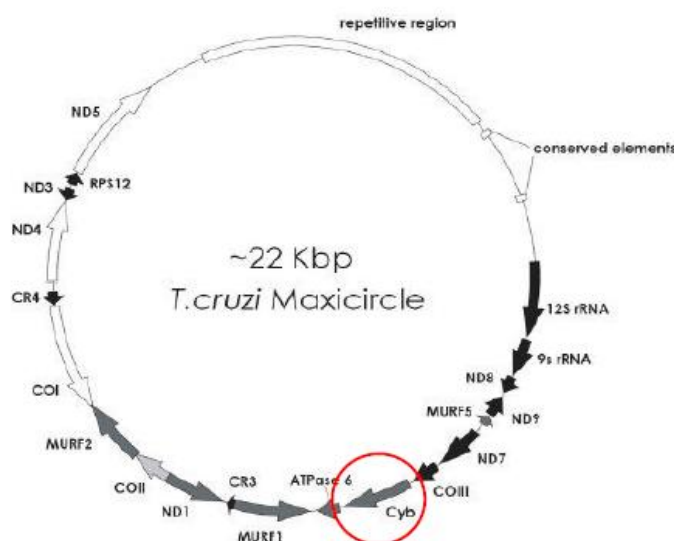
Recentemente, o polimorfismo de seqüências da região do espaçador do gene de SL propiciou a segregação dos isolados de *T. cruzi* genotipados como TCI em três grupos, de acordo com origem geográfica e hospedeiro de origem (O’Connor *et al.*, 2007). Com base nessa mesma região, isolados de diversas regiões da Colômbia foram separados em quatro haplótipos (Herrera *et al.*, 2007).

### 1.6.3 - Genes mitocondriais

O DNA mitocondrial nos tripanossomatídeos é denominado de DNA do cinetoplasto (kDNA) e representa ~20-25% do DNA celular total. Os maxicírculos correspondem ao DNA mitocondrial dos eucariotos, codificando as proteínas necessárias para a atividade mitocondrial. Os minicírculos codificam as moléculas de RNAs-guias utilizadas na edição de transcritos de maxicírculos (Simpson *et al.*, 1987). Os maxicírculos de *T. cruzi* possuem cerca de 22 kb (Figura 7) (Westenberger *et al.*, 2006).

A taxa de evolução do DNA mitocondrial não é homogênea entre os seus diferentes genes. Alguns genes acumulam mutações mais rapidamente, dentre os quais podemos citar os genes codificadores das subunidades da NADH desidrogenase, citocromo c oxidase e dos RNAs transportadores, enquanto os genes de citocromo b estão entre os mais conservados. A ausência de recombinação e sua alta taxa de evolução, heterogênea entre seus genes, fazem com que o DNA mitocondrial seja um excelente marcador para taxonomia e estudos filogenéticos (Meyer, 1993).

O gene citocromo b (Cyb) (~1080 pb) codifica uma proteína transportadora de elétrons (ferro-protoporfirina) presente em uma única cópia por maxicírculo (Westenberger *et al.*, 2006). Um estudo baseado na região 5' não-editada desse gene permitiu separar *T. rangeli* das espécies do subgênero *Schizotrypanum* (*T. cruzi*, *T. c. marinkellei* e *T. dionisii*), confirmou a monofilia de *T. cruzi* e *T. c. marinkellei* e segregou os isolados de *T. c. marinkellei* em dois grupos (Barnabé *et al.*, 2003).



**Figura 7:** Representação esquemática do maxicírculo de kDNA com o gene de citocromo b (Cyb) em destaque.



Análises conjuntas de genes nucleares e um gene mitocondrial (citocromo oxidase II) revelaram filogenias incongruentes. Porém, as topologias demonstraram a existência de híbridos e geraram hipóteses sobre eventos de trocas genéticas. Esse estudo sugeriu baseado em divergências de seqüências que a separação das principais linhagens de *T. cruzi* ocorreu durante o Mioceno-Plioceno (3-16 ma) (Machado e Ayala, 2001). A utilização de seqüências do gene *Cyb* e do promotor rRNA de isolados de *T. cruzi* das 6 linhagens também resultou em filogenias incongruentes. As seqüências de *CYb* e rRNA foram agrupadas em três e quatro linhagens, respectivamente (Brisse *et al.*, 2003).

A comparação de seqüências de três genes mitocondriais, *Cyb*, citocromo oxidase II e NADH desidrogenase, permitiu separar os isolados de *T. cruzi* em três grupos TCI, TCII e TCIII. Esse último grupo compreende os isolados da linhagem TCIIc (Freitas *et al.*, 2006). Análises de genes nucleares e mitocondriais (COII and ND1) também demonstraram trocas genéticas entre linhagens divergentes de TCII, assim como polimorfismo da linhagem TCI entre isolados da América do Sul. Entretanto, trocas genéticas não foram observadas entre populações de TCI das Américas Central e do Sul (Iwagami *et al.*, 2007). Isolados chilenos de *T. cruzi* foram incluídos junto com outros isolados Americanos em filogenias baseadas em seqüências de *Cyb* que diferenciaram Figura 6. Representação esquemática do maxicírculo de kDNA com o gene de citocromo b (*Cyb*) em destaque. isolados de TCI, revelando um genótipo ainda não descrito, associado com roedores caviomorfos e designado DTU Ib (Spotorno *et al.*, 2008).

O estudo comparativo através de microarray de isolados de *T. cruzi* humanos assintomáticos ou com forma cardíaca revelou transcritos expressos diferencialmente entre esses dois grupos de isolados, principalmente o do gene ND7 (NADH dehydrogenase subunit 7). A presença de uma deleção nesse gene permitiu padronizar um PCR para o diagnóstico diferencial de cepas de *T. cruzi* (Baptista *et al.*, 2006). A comparação de sequencias completas de maxicírculos das cepas CL Brener e Esmeraldo revelou genes dispostos na mesma ordem que *T. brucei* e *L. tarentolae*. Esse estudo revelou a existência de seqüências, em regiões não codificadoras, espécie e cepa-específicas, com potencial para utilização como marcadores taxonômicos (Westenberger *et al.*, 2006).

#### 1.6.4 - DNA do cinetoplasto – kDNA

Os tripanossomatídeos apresentam uma única mitocôndria que contém uma região rica em DNA (kDNA) denominada cinetoplasto. O kDNA consiste de moléculas dupla-fita circulares, cada organismo contendo de 5.000-10.000 minicírculos e 40-50 maxicírculos, concatenados em uma única rede (Simpson, 1987; Stuart e Feagin, 1992). Os minicírculos dos tripanossomatídeos são extremamente heterogêneos no tamanho e na seqüência, exceto pela presença de uma região conservada composta por três blocos (CSBs1, 2 e 3). O bloco CSB-3 consiste de uma região de 12 nucleotídeos, praticamente invariável nos tripanossomatídeos (“Universal minicircle sequence”), que corresponde à origem de replicação dos minicírculos, e *T. cruzi* possui 4 cópias (Degraeve *et al.*, 1988). Interspecificamente os minicírculos diferem em tamanho e seqüência. Intraespecificamente, estas moléculas diferem na seqüência, mas são homogêneas em tamanho e sempre hibridizam cruzadamente.

Os padrões de digestão de kDNA por endonucleases de restrição (esquizodemas) são característicos de espécies, subespécies, cepas e clones de tripanossomatídeos (Morel e Simpson, 1980; Morel *et al.*, 1980). Devido ao grande número de cópias ( $\sim 10^4$ ) e ao polimorfismo entre espécies e isolados, minicírculos de kDNA são excelentes alvos para diagnóstico por PCR.

Os padrões de digestão de minicírculos de kDNA por enzimas de restrição (esquizodemas) são característicos de isolados de *T. cruzi* (Morel *et al.*, 1986; Torres *et al.*, 2004). Amplificação por PCR de minicírculos de kDNA resulta nos métodos de diagnósticos mais sensíveis para *T. cruzi* (Sturm *et al.*, 1989; Ávila *et al.*, 1990, 1993; Wincker *et al.*, 1994; Junqueira *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1999; Rozas *et al.*, 2005; Burgos *et al.*, 2005; Zulantay *et al.*, 2007; Silva Manoel-Caetano *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2008).

A homogeneidade de tamanho destas moléculas entre isolados de *T. cruzi* facilita o diagnóstico (Wincker *et al.*, 1994; Junqueira *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1999; Lane *et al.*, 2003; Virreira *et al.*, 2003; Elias *et al.*, 2003; Junqueira *et al.*, 2005), além de permitir separar esta espécie de *T. rangeli* (Vallejo *et al.*, 1999).

A técnica de PCR baseada em seqüências de kDNA em baixa stringência com um único “primer” (“low stringency single specific primer LSSP-PCR”) é muito sensível na detecção de polimorfismos. Diversos isolados analisados com essa técnica revelaram altos graus de polimorfismo intraespecíficos, inclusive entre isolados TCI de

uma mesma região geográfica (Brito *et al.*, 2008; Salazar *et al.*, 2006). Análise de polimorfismo de restrição de uma DNA empregada na comparação de isolados de casos congênitos revelou padrões idênticos para isolados das mães e filhos (Burgos *et al.*, 2007).

### 1.6.5 - Gene MSH2

Um estudo recente realizado por Augusto-Pinto e colaboradores (2001) demonstrou que a espécie *T. cruzi* pode ser dividida em três haplogrupos distintos denominados A, B e C, baseado em uma análise de polimorfismos no gene MSH2 de diversas cepas desse parasita (Augusto-Pinto *et al.*, 2001). Foi verificado posteriormente que as cepas dos haplogrupos B e C apresentam uma menor eficiência de reparo de erros de pareamento (MMR) se comparado com cepas do haplogrupo A, após tratamento com cisplatina e hidróxido de hidrogênio (Augusto-Pinto et al, 2003).

Esses resultados propuseram que a menor eficiência de MMR dos haplogrupos B e C poderia estar associada a uma maior geração de variabilidade genética nessas cepas. Dessa maneira foi feita uma análise de variabilidade genética tomando como alvo o gene que codifica o antígeno de *T. cruzi* denominado TcAg48, presente em um grande número de cópias no genoma desse parasita.

A digestão do produto de amplificação de uma região desse gene com a enzima de restrição HhaI (*Haemophilus haemolyticus*) permitiu o agrupamento 35 cepas de *T. cruzi* nos mesmos haplogrupos já descritos pela análise do MSH2. Foi verificada ainda uma maior variabilidade genética desse antígeno nas cepas pertencentes aos haplogrupos B e C, que apresentaram um MMR menos eficiente. Algumas das cepas do haplogrupo B possuem um padrão de digestão com características tanto de cepas do haplogrupo B quanto de C, indicando um caráter híbrido.

### 1.6.6 – Clone F30

Estudos recentes sugerem que o *T. cruzi* II poderia ser subdividido em 5 subgrupos sendo o subgrupo IIe aquele que apresenta características híbridas (grupo IIb

e IIc). A presença de cepas híbridas vem sendo questionada e durante o seqüenciamento do genoma do parasita foi observada a característica híbrida da cepa CL Brener utilizada como protótipo. Utilizando-se a metodologia da Análise da Representação Diferencial, foi obtido o clone F30 diferencialmente presente em *T. cruzi* I que após o seqüenciamento mostrou similaridade acima de 90% com 2 seqüências para a proteína hipotética em CL Brener. A presença de duas seqüências para a mesma proteína, sugere o caráter híbrido do *T. cruzi* e torna essa seqüência um potencial marcador de populações. Toma *et al.*, (dados ainda não publicados) com o objetivo de padronizar um protocolo fácil e rápido de identificação de populações híbridas associando amplificação e digestão com endonucleases de restrição, sintetizaram iniciadores para amplificar a região do clone F30 de cerca de 500 pb em amostras de DNAs genômicos de 10 cepas *T. cruzi* I, 11 cepas *T. cruzi* II e 9 cepas zimodema 3 (previamente caracterizados pelo marcador de gene de mini-exon) que em seguida foram digeridos com diferentes endonucleases de restrição. A quantidade mínima de DNA detectável na amplificação foi de 100 pg. Foram testadas várias endonucleases de restrição e aquelas que mostraram poder discriminatório foram: *RsaI* e *EcoRI* digeriram as cepas *T. cruzi* I em dois fragmentos (200 e 300 pb) mas não digeriram as cepas *T. cruzi* II e zimodema 3, e a endonuclease *MspI* digeriu as cepas *T. cruzi* II e zimodema 3, gerando 2 fragmentos (400 pb e 100 pb) mas não digeriu as cepas *T. cruzi* I.

A estratégia não permitiu a identificação de cepas híbridas mas revelou que o clone F30 pode ser utilizado como um marcador de caracterização de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II utilizando um protocolo simples que envolve amplificação, digestão e análise em gel de agarose.

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

*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 esta 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).

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 microsatélites, 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 último 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 estringência 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.

### 3 – OBJETIVOS

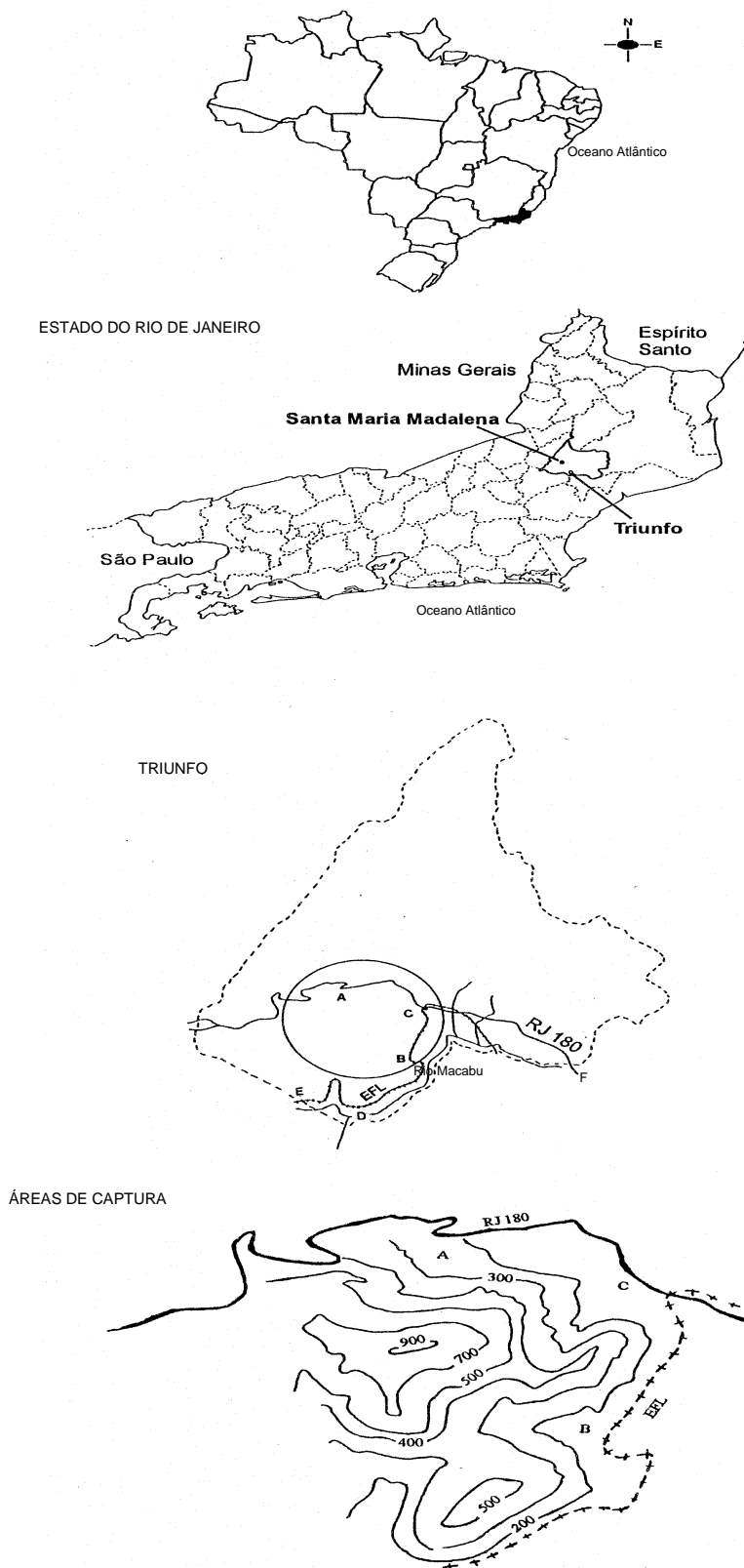
Com o intuito de estudar os *Trypanosoma cruzi*, esse trabalho teve por objetivos:

- ✓ Caracterizar as cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* no Município de Santa Maria Madalena, Estado do Rio de Janeiro utilizando diferentes marcadores moleculares;
- ✓ Analisar a variabilidade genética destas cepas silvestres;
- ✓ Avaliar a distribuição dos isolados de *T. cruzi* dentro de uma mesma área e entre as diferentes áreas de captura na localidade.

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - Procedência dos parasitas

Os isolados estudados são provenientes de espécimes de *Triatoma vitticeps* coletados na localidade de Triunfo cuja latitude é de 22° 02' 52'' S e longitude de 41° 56', 32'' W, no Município de Santa Maria Madalena como também Município de Conceição de Macabu, ambos do Estado do Rio de Janeiro. Foram isoladas de *Triatoma vitticeps* cerca de 119 amostras de *Trypanosoma cruzi*, intituladas SMM, em áreas denominadas A, B, C, D, E e F por (Gonçalves *et al.*, 1998) (Figuras 8 e 9). Neste estudo foram utilizadas um total de quatorze amostras, cinco delas (SMM10, SMM51, SMM57, SMM88 e SMM98) isoladas dos triatomíneos capturados na área A (Figura 10), área desmatada para dar lugar ao cultivo de banana, estando localizada a 250m de altitude e afastada 3.5km do povoado, sete amostras (SMM9, SMM 30, SMM34, SMM36, SMM39, SMM82 e SMM89) da área B (Figura 11), situada em um vale com vegetação preservada achando-se a 130m de altitude e distante 4 km do povoado. Estas duas áreas distam 2 km entre si sendo separadas por área montanhosa, com altitudes entre 400 a 900m, pertencentes à localidade de Triunfo, Município de Santa Maria Madalena e ma amostra (SMM106) da área D, uma área preservada com uma distância de 10km da área C. A amostra (SMM1) é proveniente de triatomíneo capturado no povoado de Vista Alegre, do município vizinho de Conceição de Macabu, sendo denominada área F (Figura 8).



**Figura 8:** Mapa dos locais de coleta (Distribuição geográfica de *Triatoma vitticeps*).

**Figura 9:** Vista geral da localidade de Triunfo, localizada no município de Santa Maria Madalena- RJ.

Créditos: Teresa Cristina M. Gonçalves



**Figura 10:** Vista geral da área A.

Créditos: Teresa Cristina M. Gonçalves



**Figura 11:** Vista geral da área B.

Créditos: Teresa Cristina M. Gonçalves

## 4.2 - Cultivo dos isolados

As amostras eram retiradas do nitrogênio líquido, e a partir daí crescidas e mantidas em tubos de ensaio com tampa rosqueável contendo meio NNN (NOVY & MACNEAL 1904, NICOLE 1908) acrescido de LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (CAMARGO 1964), como fase líquida, suplementado de 30% de soro fetal bovino. Os tubos permaneceram incubados em estufa do tipo BOD (FANEM) a 27,3°C, repicadas periodicamente a intervalos de 14 dias, para manutenção das amostras.

Em todos os experimentos foram utilizados DNAs de cepas de *T. cruzi*, DM28C (TCI), CL (TCII) e 3663 (Z3) e uma cepa de *Trypanosoma rangeli* (R1625) como controle.

## 4.3 – Extração de DNA

Foi utilizado um protocolo baseado no kit comercial para extração de DNA (DNAzol *Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA*), (Gibco). Em resumo, culturas de *T. Cruzi* (10mL) na fase exponencial de crescimento em meio LIT foram lavadas três vezes por centrifugação em PBS a 2.000 rpm por 10 minutos. Após retirada do sobrenadante, ao *pellet* foi adicionado 1mL de DNAzol, homogeneizando com a pipeta e centrifugando a 8900 rpm durante 10 minutos. Em seguida foi transferido o sobrenadante para tubos novos, adicionando-se 500µl de etanol absoluto para precipitar o DNA, centrifugando a 14.000 rpm por 10 minutos. Após desprezar o sobrenadante, foi lavado com 1 mL de etanol 75%, centrifugando a 14.000 rpm por 10 minutos. Por fim, desprezou-se o sobrenadante, deixando os tubos secando.

Após secagem dos tubos, foi adicionado 20µl de H<sub>2</sub>O milli-Q estéril em cada amostra.

## 4.4 – Quantificação de DNA

No sentido de estimar a concentração de DNA (Moore *et al.*, 1997), cada amostra extraída (5 µl) é diluída (1:100) em H<sub>2</sub>O milli-Q estéril, num tubo cônico de 1,5 ml (tipo EPPENDORF), submetida a agitação (RETSCH MIXER) para homogeneização da solução, sendo depois colocada em cuvette de quartzo e submetida

a leitura da densidade óptica a 260 nm (DO<sub>260</sub>), para avaliar a quantidade de DNA, num quantificador automático GeneQuant II (RNA/DNA CALCULATOR, AMERSHAM BIOSCIENCES). O quociente entre DO<sub>260</sub> e DO<sub>280</sub> deve situar-se entre 1,5 e 2, para se considerar que estamos perante uma amostra de DNA com pureza adequada para análise posterior. A concentração de DNA total foi estimada, de acordo com a **Equação 1**, tendo em conta que uma unidade de DO corresponde à concentração de 0,050 ug/ul de DNA de dupla cadeia (dsDNA) (Moore *et al.*, 1997).

#### **4.5 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

##### **4.5.1 – Variabilidade da região intergênica do gene de Mini-Exon**

A variabilidade da região intergênica do gene do mini-exon das amostras foi estudada através da técnica do PCR Multiplex, utilizando-se os iniciadores *TcI*, *TcII*, *Z3*, *TR* e *ME* (Fernandes *et al.*, 2001). Estes iniciadores geram um produto de amplificação de 250 pb (*TcII*), 200 pb (*TcI*), 150 pb (*Z3*) e 100 pb (*T. rangeli*). A reação foi realizada em um volume final para cada amostra de 50 µl contendo 1µl de DNA molde, 0,3 µl de Taq Gold DNA polimerase, 5 µl de dNTPs, 6 µl de MgCl<sub>2</sub>, 5 µl de tampão (Tris-HCl 10mM pH 8,5), 1 µl de cada iniciador (*TcI*, *TcII*, *Z3*, *Tr* e *ME*), completando o volume final com água MiliQ. A amplificação do fragmento foi realizada nas seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial a 94°C/5min, seguido de 5 ciclos (94°C/1min, 50°C/1min para ligação dos iniciadores, 72°C/1min para extensão), seguido de 25 ciclos (94°C/30seg, 55°C/30seg, 72°C/30seg) e uma extensão final a 72°C/5min. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, submetidos a coloração por Brometo de etídeo.

##### **4.5.2 – Variabilidade do segmento do gene do RNA ribossomal (24Sα)**

O estudo do segmento do gene do RNA ribossomal (DNAr24Sα) de *T. cruzi* foi realizado através dos iniciadores D71 e D72 (Souto *et al.*, 1996). Estes iniciadores geram um produto de amplificação de 110 pb para *TcI* e 125 pb para *TcII*. A reação foi realizada em um volume final de 50 µl contendo 1 µl de DNA molde, 0,3 µl de Taq

DNA polimeras, 5 µl de dNTPs, 5 µl de tampão (Tris-HCl pH 8,5), 6 µl de MgCl<sub>2</sub>, completando o volume final com água MilliQ. A amplificação do gragmento foi realizada nas seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial a 94°C/ 4min seguido de 30 ciclos (94°C/1min, 62,5°C/1min para ligação dos iniciadores, 72°C/1min para extensão), seguido de uma extensão final a 72°C/5min. A visualização do produto da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%. Os géis foram revelados por impregnação por prata (DNA Silver Staining Kit/Amersham Biosciences).

#### 4.5.3 – MSH2

O estudo para verificar possíveis caracteres híbridos entre as cepas analisadas, foi feito baseado em uma análise de polimorfismos no gene MSH2 com a digestão do produto de amplificação de uma região desse gene com a enzima de restrição HhaI (*Haemophilus haemolyticus*).

*Primers* específicos tmuts30 e tmuts41 foram usados para amplificar o fragmento de 875bp utilizados na análise. 10 ng de DNA foram utilizados em cada reação de PCR nas seguintes condições: Desnaturação por 30 segundos a 94°, anelamento do *primer* por 1 minuto a 55° e extensão do primer por 2 minutos a 72°, por um total de 30 ciclos. O fragmento TcMSH2 obtidos por PCR como descrito acima foi submetido à digestão com a enzima de restrição HhaI (*Haemophilus haemolyticus*) (5' GCG<sup>↓</sup>C3') por 16hs a 37°C. Os produtos de digestão foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%. Os géis foram revelados por impregnação por prata (DNA Silver Staining Kit/Amersham Biosciences).

#### 4.5.4 – F#30

Para amplificação do DNA das amostras a reação foi realizada com um volume final de 50 µl, onde *primers* específicos F30 F e F30 R foram utilizados para amplificar os fragmentos com aproximadamente 500pb. A amplificação do fragmento foi realizada nas seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial a 95°C/ 5min seguido de 30 ciclos (95°C/30", 65°C/30" para ligação dos iniciadores, 72°C/45" para extensão). Em seguida, foi feito digestão dos fragmentos amplificados com enzimas de digestão a



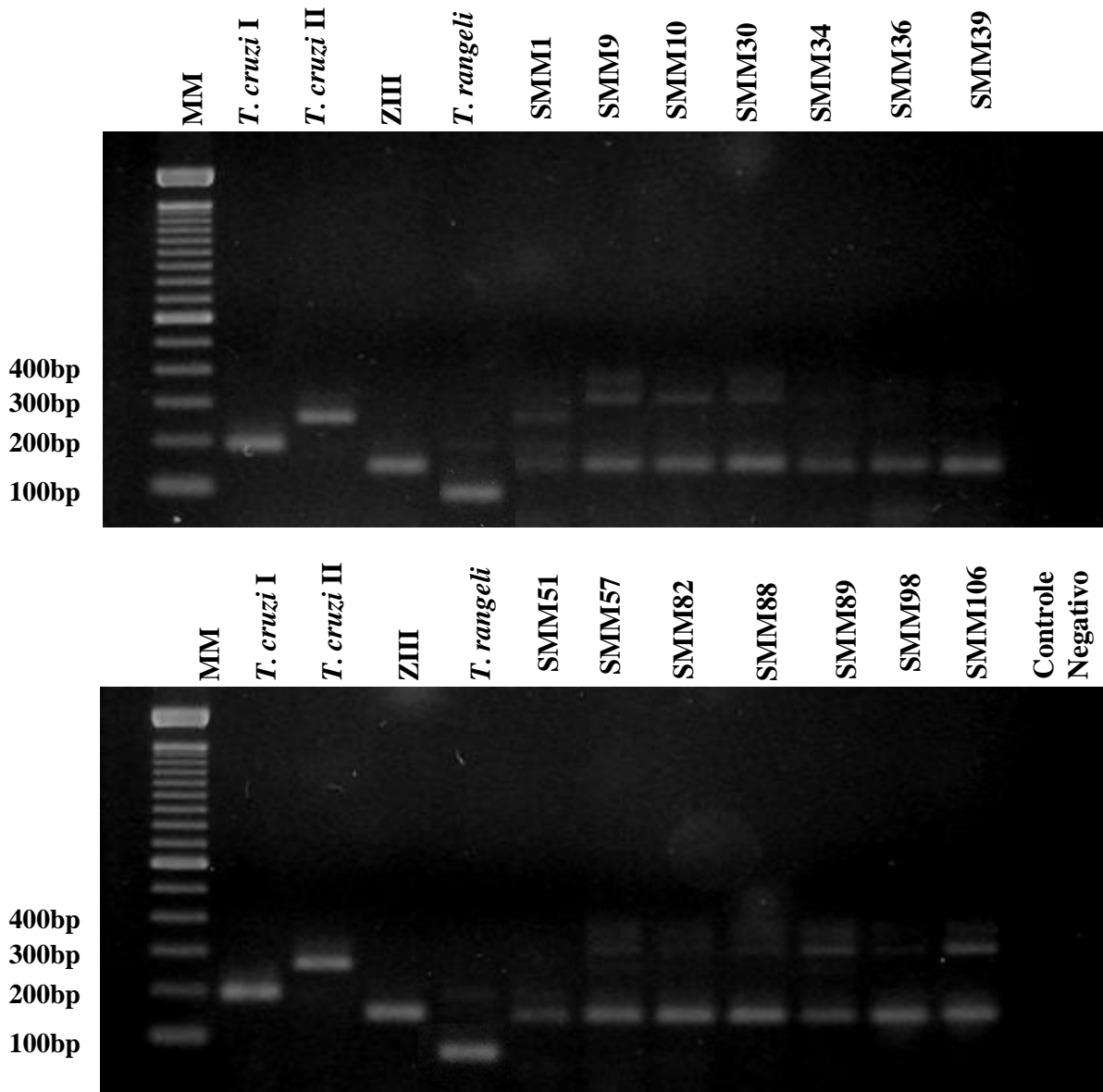
37°C por 16 hs, tais como, RsaI (*Rhodopseudomonas sphaeroides*) GT<sup>↓</sup>AC que apresenta sítio de restrição característico da linhagem TcI gerando bandas de 200 e 300pb, não tendo sítios de restrição para TcII e ZIII e MspI (*Moraxella sp*) C<sup>↓</sup>CGG com sítios de restrição característicos da linhagem TcII e ZIII gerando bandas de ~ 400 e 100 pb para ambos, não apresentando sítio de restrição para o padrão TcI. Os produtos de digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, submetidos a coloração por Brometo de etídeo.

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 - Variabilidade da região intergênica do gene de Mini-Exon

Aproximadamente 50ng de DNA genômico obtidos dos isolados silvestres de *Triatoma vitticeps* (SMM1, SMM9, SMM10, SMM30, SMM34, SMM36, SMM39, SMM51, SMM57, SMM82, SMM88, SMM89, SMM98 e SMM106), foram submetidos a amplificação do segmento do espaçador não-transcrito do gene de mini-exon de *T. cruzi*. Foram utilizados como controles o DNA genômico das cepas Dm28c (caracterizada como *T. cruzi* I), CL Brener (caracterizada como *T. cruzi* II), 3663 (pertencente ao ZIII) e cepa R1625 de *Trypanossoma rangeli*. Esta tipagem foi realizada em vários momentos diferentes do desenvolvimento desta tese, a fim de confirmar os resultados obtidos.

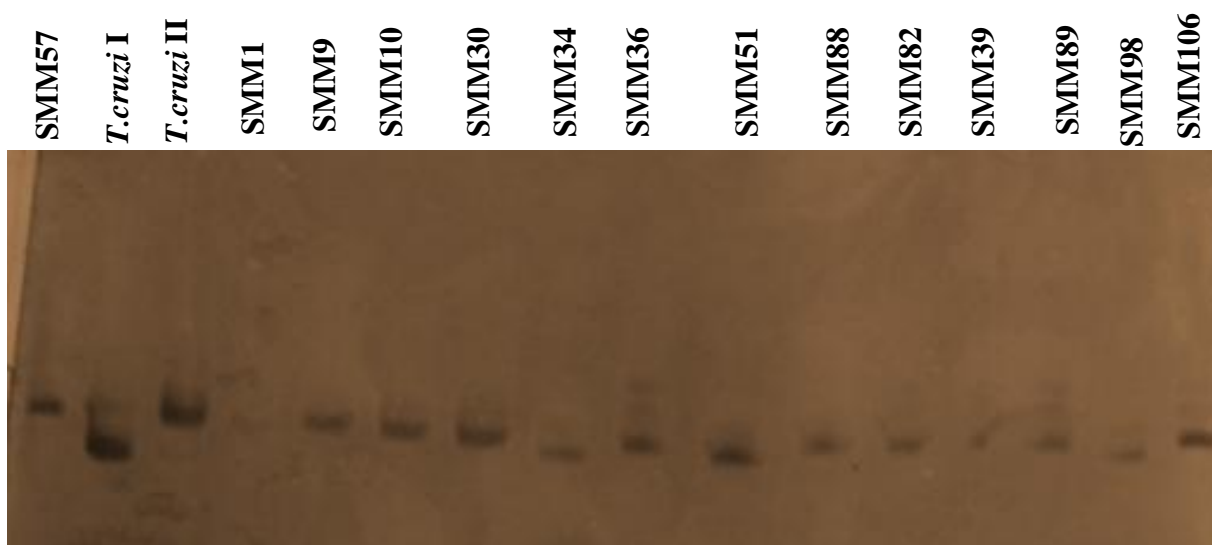
Todas os 14 isolados de *T. cruzi* analisadas apresentaram a banda de 150 pb característica do zimodema III (Figura 12). Ainda na mesma análise todos apresentaram também bandas com uma menor intensidade de ~ 250pb característico do grupo TcII, sugerindo a presença de possíveis misturas nos isolados.



**Figura 12:** Caracterização molecular dos isolados de *T. cruzi* através da análise do segmento do espaçador não-transcrito do gene de mini-exon por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado em brometo de etídeo. MM – Marcador molecular (100pb), amostra controle de *T. cruzi* I (Dm 28c), amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), amostra controle de ZIII, amostra controle de *T. rangeli*, 1 – SMM1, 2 - SMM9, 3 - SMM10, 4 - SMM30, 5 - SMM34, 6 - SMM36, 7 - SMM39. MM – Marcador molecular (100pb), amostra controle de *T. cruzi* I (Dm 28c), amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), amostra controle de ZIII, amostra controle de *T. rangeli*, 8 - SMM51, 9 - SMM57, 10 - SMM82, 11 - SMM88, 12 - SMM89, 13 - SMM98, 14 - SMM106 e 15 – controle negativo.

## 5.2 - Variabilidade do segmento do gene do RNA ribossomal (24S $\alpha$ )

A amplificação por PCR do gene do RNA ribossomal (24S $\alpha$ ) através dos iniciadores D71 e D72 dos isolados silvestres de *T. cruzi* de *Triatoma vitticeps* (SMM1, SMM9, SMM10, SMM30, SMM34, SMM36, SMM39, SMM51, SMM57, SMM82, SMM88, SMM89, SMM98 e SMM106), resultou em fragmentos de 125pb característica da linhagem TcII (Figura 13). Foram utilizados como controles cepas Dm28c (caracterizada como *T. cruzi* I) e CL Brener (caracterizada como *T. cruzi* II).

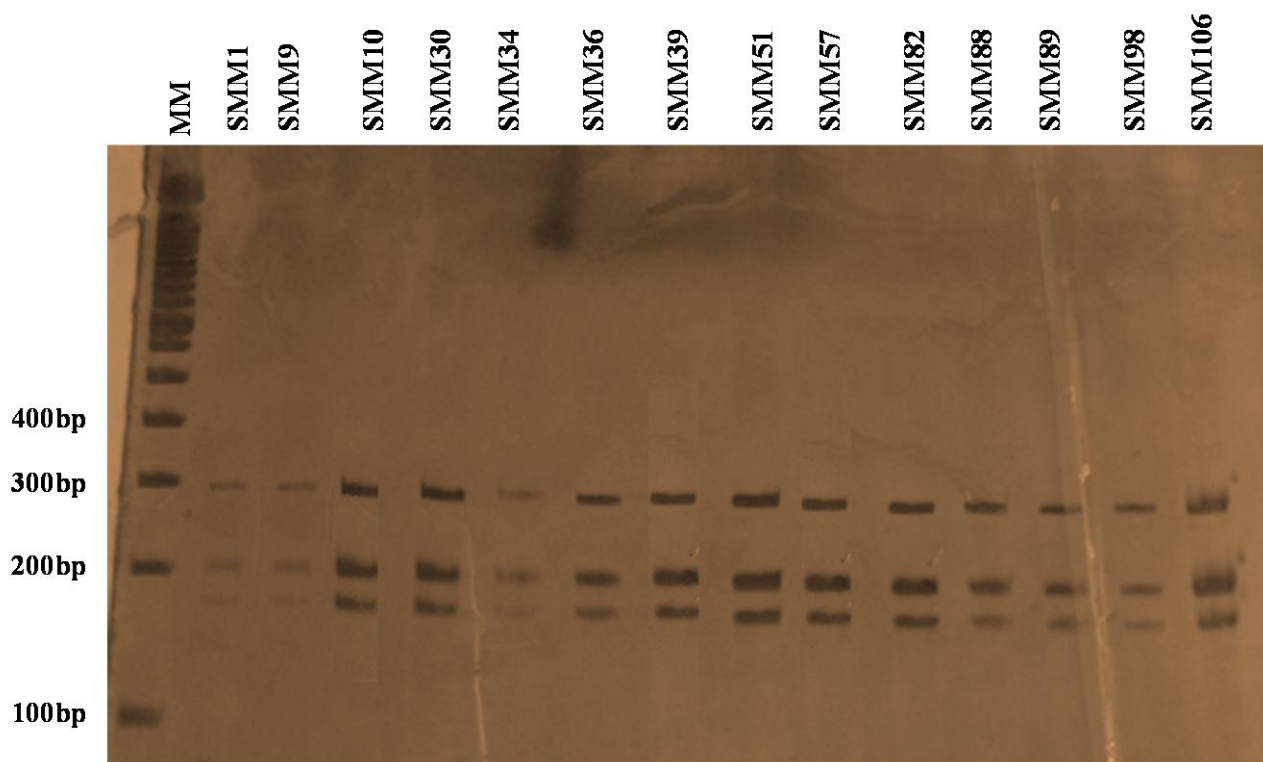


**Figura 13:** Gel de poliacrilamida a 7,5% corado pela prata, representativo de isolados silvestres de *T. cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* através do PCR do gene de DNAr24S $\alpha$ . MM = Marcador molecular (100pb), SMM57, amostra controle de *T. cruzi* I (Dm 28c), amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), 1 - SMM1, 2 - SMM9, 3 - SMM10, 4 - SMM30, 5 - SMM34, 6 - SMM36, 7 - SMM51, 8 - SMM88, 9 - SMM82, 10 - SMM39, 11 - SMM89, 12 - SMM98 e 13 - SMM106.

## 5.3 – Gene MSH2

Para verificar possíveis caracteres híbridos entre as cepas analisadas (SMM1, SMM9, SMM10, SMM30, SMM34, SMM36, SMM39, SMM51, SMM57, SMM82, SMM88, SMM89, SMM98 e SMM106), foi feito PCR baseado em uma análise de polimorfismos no gene MSH2 com a digestão do produto de amplificação de uma

região desse gene com a enzima de restrição HhaI (*Haemophilus haemolyticus*). Primers específicos tmuts30 e tmuts41 foram usados para amplificar o fragmento de 875bp. Os produtos de digestão com a enzima de restrição HhaI (*Haemophilus haemolyticus*), resultou em fragmentos de 173pb, 207pb e 294pb (Figura 14) para cada isolado, o que indica um padrão característico para a linhagem Tc II, demonstrando então, que não há híbridos entre nossos isolados.

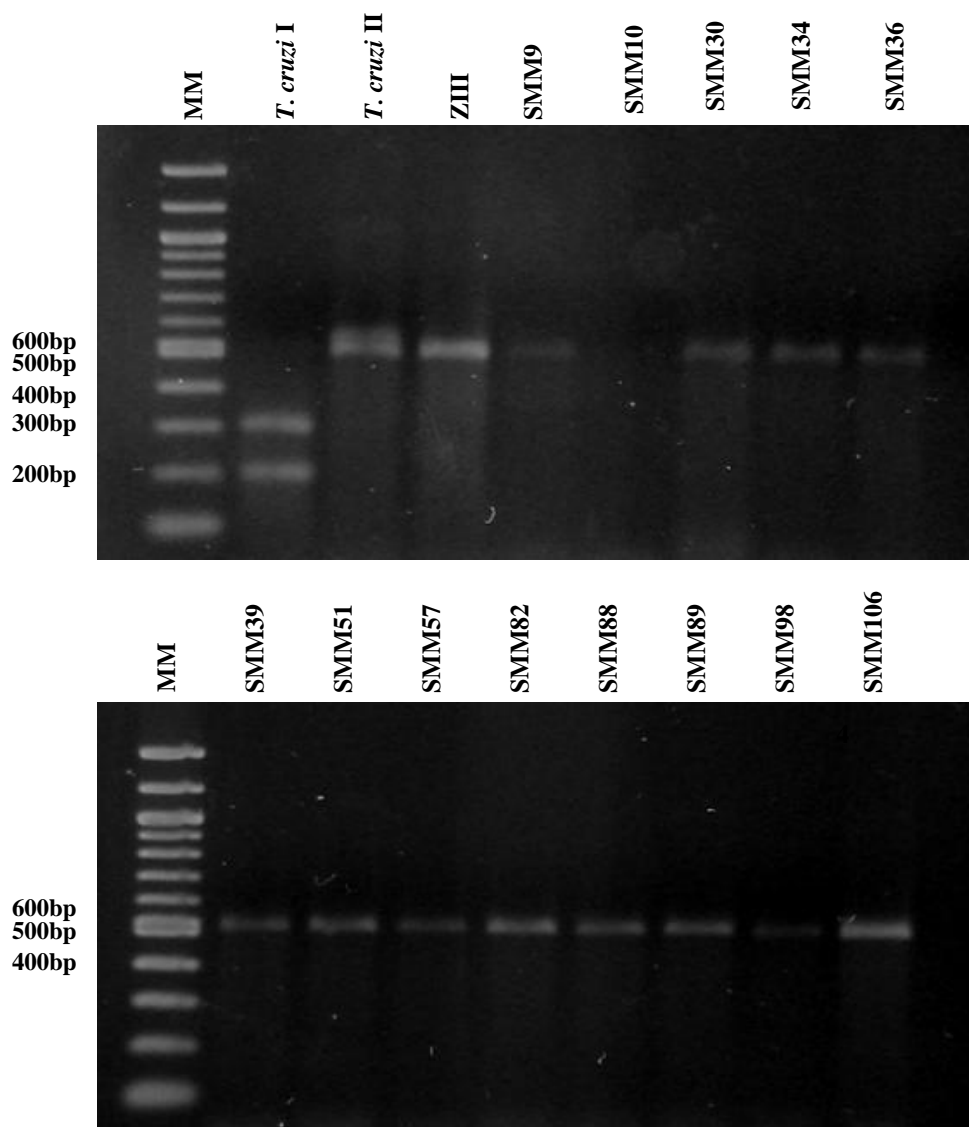


**Figura 14:** Gel de poliacrilamida a 7,5% corado pela prata, representativo de isolados silvestres de *T. cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* através do produto de digestão pela enzima de restrição HhaI (*Haemophilus haemolyticus*) do gene MSH2. MM – Marcador molecular (100pb), 1 - SMM1, 2 - SMM9, 3 - SMM10, 4 - SMM30, 5 - SMM34, 6 - SMM36, 7 - SMM39, 8 - SMM51, 9 - SMM57, 10 - SMM82, 11 - SMM88, 12 - SMM89, 13 - SMM98 e 14 - SMM106.

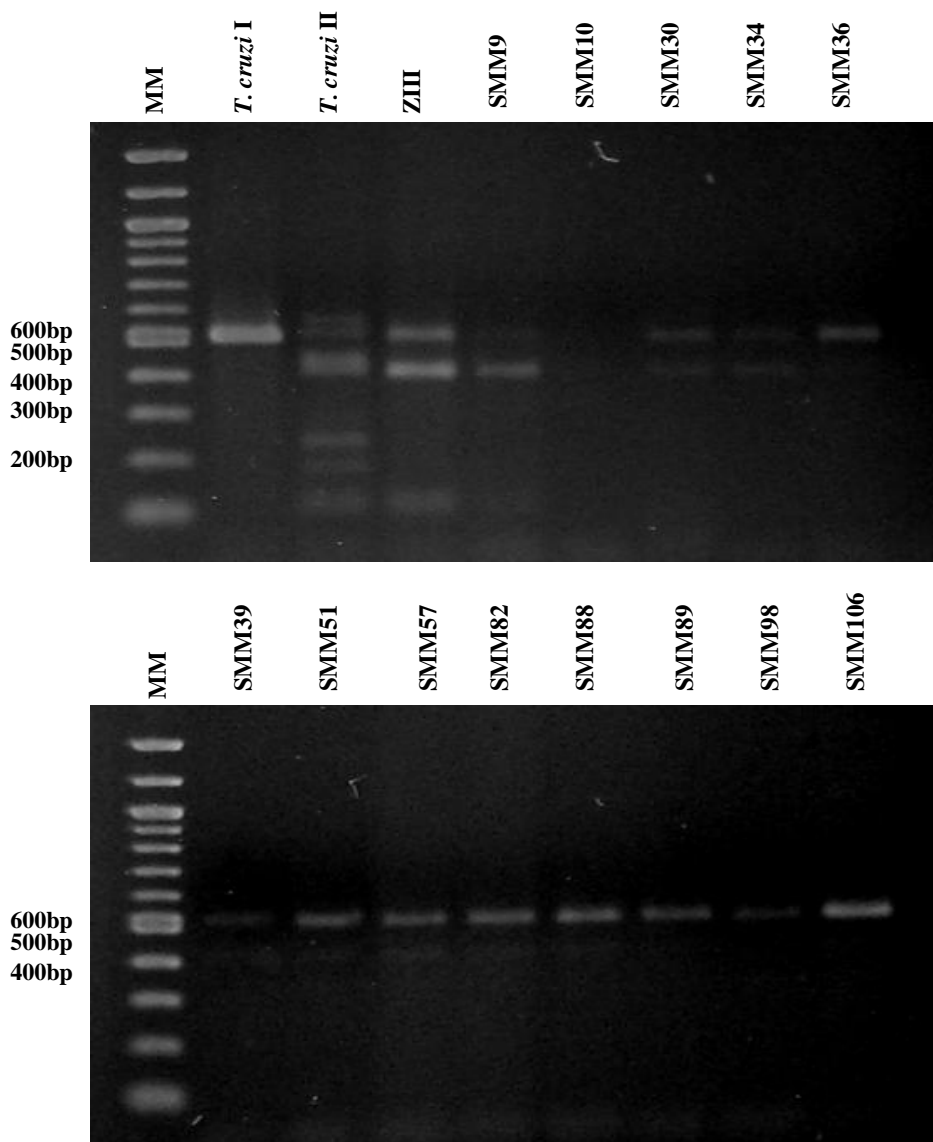
#### 5.4 – Gene F#30

Após amplificação do DNA das amostras utilizando os *primers* específicos F30 F e F30 R para amplificar os fragmentos com aproximadamente 500pb, foi feita digestão dos fragmentos amplificados com enzimas de digestão, tais como, RsaI (*Rhodopseudomonas sphaeroides*) GT<sup>↓</sup>AC, MspI (*Moraxella sp*) C<sup>↓</sup>CGG e Eco RI (*Escherichia coli*) G<sup>↓</sup>AATTC a 37°C por 16 hs.

Na digestão com a enzima RsaI foi observado que não houve corte nos fragmentos dos isolados, demonstrando bandas com 500pb para todos os isolados analisados, com exceção da SMM1 que não amplificou (Figura 15). A digestão com a enzima MspI, gerou fragmentos de ~400 e 100pb para as amostras SMM9, SMM10, SMM30, SMM34 e SMM36 demonstrando um perfil mais característico da linhagem TcII e/ou ZIII. As amostras SMM39, SMM51, SMM57, SMM82, SMM88, SMM89, SMM98 e SMM106, não apresentaram sítios de restrição com esta enzima, gerando bandas de 500pb (Figura 16). Repetimos o procedimento mais duas vezes, obtendo o mesmo resultado, porém precisamos repetir mais algumas vezes para confirmar esse resultado.



**Figura 15** - Gel de agarose a 1,5% corado em brometo de etídeo da digestão dos fragmentos amplificados do PCR de F30 com a enzimas de digestão RsaI. MM – Marcador molecular (100pb), amostra controle de *T. cruzi* I (Dm 28c), amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), amostra controle de ZIII, 1 - SMM9, 2 - SMM10, 3 - SMM30, 4 - SMM34, 5 - SMM36. Marcador molecular (100pb), 6 - SMM39, 7 - SMM51, 8 - SMM57, 9 - SMM82, 10 - SMM88, 11 - SMM89, 12 - SMM98 e 13 - SMM106.



**Figura 16** - Gel de agarose a 1,5% corado em brometo de etídeo da digestão dos fragmentos amplificados do PCR de F30 com a enzimas de digestão MspI. MM – Marcador molecular (100pb), amostra controle de *T. cruzi* I (Dm 28c), amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), amostra controle de ZIII, 1 - SMM9, 2 - SMM10, 3 - SMM30, 4 - SMM34, 5 - SMM36. Marcador molecular (100pb), 6 - SMM39, 7 - SMM51, 8 - SMM57, 9 - SMM82, 10 - SMM88, 11 - SMM89, 12 - SMM98 e 13 - SMM106.



A tabela 1 mostra os resultados gerais obtidos neste trabalho através da

	Áreas	Mini-Exon	24S $\alpha$	F30 (Enzima RsaI)	F30 (Enzima MspI)	MSH2
SMM1	F	Z3 e TcII	TcII	NA	NA	NA
SMM9	B	Z3 e TcII	TcII	TcII	TcII e/ou Z3	TcII
SMM10	A	Z3 e TcII	TcII	TcII	TcII e/ou Z3	TcII
SMM30	B	Z3 e TcII	TcII	TcII	TcII e/ou Z3	TcII
SMM34	B	Z3 e TcII	TcII	TcII	TcII e/ou Z3	TcII
SMM36	B	Z3 e TcII	TcII	TcII	TcII e/ou Z3	TcII
SMM39	B	Z3 e TcII	TcII	TcII	NA	TcII
SMM51	A	Z3 e TcII	TcII	TcII	NA	TcII
SMM57	A	Z3 e TcII	TcII	TcII	NA	TcII
SMM82	B	Z3 e TcII	TcII	TcII	NA	TcII
SMM88	A	Z3 e TcII	TcII	TcII	NA	TcII
SMM89	B	Z3 e TcII	TcII	TcII	NA	TcII
SMM98	A	Z3 e TcII	TcII	TcII	NA	TcII
SMM106	D	Z3 e TcII	TcII	TcII	NA	TcII

caracterização molecular por diversos marcadores dos isolados de *T. cruzi*.

\* NA = Não Amplificado

**Tabela 1:** Caracterização molecular por diversos marcadores de *Trypanosoma cruzi* isolados de *Triatoma vitticeps* capturados no estado do Rio de Janeiro.

## 6 – DISCUSSÃO

Muitos estudos foram realizados para a caracterização de isolados de *Trypanosoma cruzi* obtidos a partir de casos humanos, reservatórios silvestres e triatomíneos principalmente em países da América Latina, evidenciando a heterogeneidade desta espécie (Mello *et al.*, 1980, Gonzales *et al.*, 1995, Martinez-Diaz *et al.*, 2001, Pacheco *et al.*, 2005, Sanchez-Guillen 2006, Silva 2006, Cardinal *et al.*, 2008). Esses estudos contribuem para o entendimento de aspectos epidemiológicos e clínicos da doença de Chagas. Carlos Chagas em 1909, na sua descoberta já descrevia a diversidade morfológica do parasito sugerindo uma hipótese de que a dualidade morfológica encontrada poderia estar relacionada à diferenciação sexual.

Através de técnicas de biologia molecular (Morel 1986, Ávila *et al.*, 1990, Mormori 1992, Tibayrenc *et al.*, 1993, Steindel *et al.*, 1993, Macedo *et al.*, 1992, Vago *et al.*, 1996, Souto *et al.*, 1996, Zingales *et al.*, 1998, Fernandes *et al.*, 1998a), foi possível evidenciar um claro dimorfismo entre os isolados de *Trypanosoma cruzi*, levando ao agrupamento das amostras de *T. cruzi* em duas grandes linhagens filogenéticas: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Entretanto, em estudos anteriores utilizando análise de isoenzimas, as amostras de *T. cruzi* eram agrupadas em zimodemas e relacionavam-se três diferentes grupos isoenzimáticos encontrados com o perfil epidemiológico dos isolados. Dessa forma, os zimodemas I (Z1) e III (Z3) estariam relacionados ao ciclo silvestre do parasito e o zimodema II (Z2) ao ciclo doméstico (Miles *et al.*, 1978, 1980). Podem-se relacionar os grupos filogenéticos TcI e TcII com os zimodemas: TcI estaria relacionado ao Z1 e o TcII estaria relacionado ao Z2. Porém, a posição de Z3 em relação aos grupos filogenéticos TcI e TcII continua controversa e é constantemente debatida. Alguns autores consideram que Z3 está mais perto filogeneticamente de TcI do que de TcII (Miles *et al.*, 1981, Fernandes *et al.*, 1998b, Brandão & Fernandes 2006), enquanto outros autores consideram o contrário (Barnabé *et al.*, 2000, Brisse *et al.*, 2000, Machado a Ayala 2001, Toma 2005). No entanto, outros autores têm incluído Z3 em uma posição intermediária entre Z1 e Z2 (Stothard *et al.*, 1998).

A distribuição geográfica e as considerações epidemiológicas, tais como: fontes naturais de infecção, vetores e reservatórios, foram estudadas sugerindo-se diversas associações (Miles *et al.*, 2005, Yeo *et al.*, 2005). *T. cruzi* I, parece estar associado a

marsupiais americanos (*Didelphis* spp) e *T. cruzi* II se encontra associado a tatu em áreas do Cone-sul na América.

No presente estudo, amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* provenientes de áreas A (SMM 10, 51, 57, 88 e 98), B (SMM 9, 30, 34, 36, 39, 82 e 89) e D (SMM106) do município de Santa Maria Madalena, estado do Rio de Janeiro, e uma proveniente de triatomíneo capturado no povoado de Vista Alegre, do município vizinho de Conceição de Macabu, sendo denominada área F (SMM1), foram analisadas por vários marcadores moleculares, demonstrando uma grande heterogeneidade. Os 14 isolados analisados para a variabilidade da região intergênica do gene de Mini-Exon apresentaram um perfil de bandas com 150 pb característica de zimodema III e bandas com uma menor intensidade com ~ 250pb, indicando também um perfil para TcII. A amplificação por PCR do gene do RNA ribossomal (24S $\alpha$ ) através dos iniciadores D71 e D72, resultou em fragmentos de 125pb demonstrando uma característica da linhagem TcII. Para verificar possíveis caracteres híbridos entre as cepas analisadas foi feito PCR com *Primers* específicos tmuts30 e tmuts41 baseado em uma análise de polimorfismos no gene MSH2 com a digestão do produto de amplificação de uma região desse gene com a enzima de restrição HhaI (*Haemophilus haemolyticus*), que resultou em fragmentos de 173pb, 207pb e 294pb para cada isolado, o que indicou também um padrão característico para a linhagem Tc II, demonstrando então, que não há híbridos entre estes isolados.

Nossos resultados corroboram a hipótese de que os isolado de *T. cruzi* podem ser produto de uma mistura de populações de parasitos uma vez que o vetor no ambiente silvestre pode se alimentar de vários hospedeiros vertebrados. Esta complexidade foi demonstrada por Fernandes *et al.* (1999) em um estudo no estado do Rio de Janeiro que mostrou a associação de duas linhagens de *T. cruzi* (TcI e TcII) com diferentes hospedeiros silvestres.

Evidências indicam que diferentes populações do *T. cruzi* podem circular na natureza através de ciclos independentes de transmissão, e que estes podem, em determinadas condições, se sobepor. Nestes casos de superposição de ciclos, deve-se admitir que eventualmente diferentes populações, que se mantinham isoladas, passem a interagir no mesmo vetor e/ou hospedeiro. Mas, embora exista essa possibilidade, pouco se sabe a respeito destes mecanismos entre diferentes populalções do *T. cruzi* quando entram em simpatria. A notória capacidade do *T. cruzi* de infectar diversas espécies implica em adaptações do parasita para viver nos mais variados microhabitats, que

incluem os diferentes segmentos do trato intestinal do inseto (Dias, 1934; Schaub, 1989), células nucleadas de mamíferos incluindo macrófagos (Nogueira & Cohn 1976), o sangue e também a secreção das glândulas de cheiro de alguns marsupiais (Steindel e Cols, 1988; Deane e Cols, 1988). Alguns destes microhabitats são aparentemente hostis para o desenvolvimento do parasita (Garcia e Azambuja, 1991).

A interação *T. cruzi*-vetor continua sendo um ponto a ser profundamente discutido. A heterogeneidade deste parasita, levou Coura (1966) a propor que o taxon *T. cruzi* fosse referido como “complexo cruzi”. Sabe-se que o *T. cruzi*, por ser um parasita de grande variabilidade genética, é também um excelente modelo para se estudar aspectos relativos ao fenômeno parasitismo. Com o surgimento de ferramentas bioquímicas e moleculares de caracterização de parasitas, foi possível avaliar de maneira mais aprofundada a heterogeneidade intraespecífica deste parasita. A análise de isolados do *T. cruzi* derivados de humanos, animais silvestres e vetores de diferentes áreas geográficas em todas as Américas, mostraram que embora apresente uma estrutura populacional clonal (Tibayrenc & Ayala, 1988; Tibayrenc 1998), o *T. cruzi* inclui subpopulações extremamente heterogêneas quanto a todos os parâmetros biológicos, bioquímicos e moleculares testados.

A complexidade do ciclo de transmissão silvestre do *T. cruzi* pode ser comprovada na medida em que observou-se que os ciclos de transmissão independentes podem ocorrer em um mesmo fragmento de mata (Pinho *et al.*, 2000; Fernandes *et al.* 1998). Mais ainda, a prevalência e o perfil da infecção podem ser distintos em uma mesma espécie em fragmentos de mata de um mesmo bioma. O encontro de primatas naturalmente infectados com *T. cruzi* (TcII) resultou em uma série de hipóteses ainda não comprovadas, entre as quais uma antiga associação entre Z2/TcII com primatas não humanos e humanos (Fernandes *et al.*, 1998; 1999). Esta linhagem já foi descrita em outros animais, como marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Philander opossum*) e roedor (*Trichomys apereoides*) (Pinho *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2005). A posição filogenética do Z3, ainda é bastante discutida, já que possui afinidades com TcI e TcII. Sabe-se que a subpopulação de Z3 é endêmica na Amazônia (Coura *et al.*, 2002; Mendonça *et al.*, 2002).

Mendonça *et al.* (2002), em um estudo na região Amazônica brasileira, município de Barcelos, estado do Amazonas, isolaram amostras de *T. cruzi*, a partir casos humanos, de *Panstrongylus geniculatus* e de *Rhodnius brethesi*, que foram caracterizadas como Z3 por diversos marcadores moleculares (Fernandes *et al.*, 1998b,

Brandão & Fernandes 2006, Freitas *et al.*, 2006). Estudos sobre a doença de Chagas na região Amazônica têm demonstrado que diversos isolados de *T. cruzi* são caracterizados como Z3, baseado em testes padrões de isoenzimas (Miles *et al.*, 1978) e através da tipagem molecular (Fernandes *et al.*, 1998b, 2001).

A taxonomia numérica baseada em 24 perfis isoenzimáticos sugeriu que Z3 é mais correlacionado com TcI do que TcII (Ready & Miles, 1980). Por outro lado, outros autores têm incluído Z3 em uma posição intermediária entre os grupos TcI e TcII (Stochanrd *et al.*, 1998). Fernandes *et al.* (2000) estudando isolados de *T. cruzi* da Amazônia através da caracterização molecular, observou uma grande biodiversidade deste parasito nesta região. Suas análises indicaram uma maior correlação de Z3 com o grupo TcI. Já Brisse *et al.* (2000), estudando isolados de morcegos da América do Sul, através de análise de perfis isoenzimáticos e RAPD, correlacionaram Z3 com TcII. Mendonça *et al.* (2002) analisando isolados da Amazônia já caracterizados anteriormente como Z3 através do gene ribossomal 24S $\alpha$  demonstraram que através deste marcador suas cepas Z3 estariam mais correlacionadas ao grupo TcII.

São comuns na natureza infecções mistas envolvendo parasitas, ou seja, um mesmo indivíduo pode encontrar-se infectado por um único genótipo parasitário ou por diferentes genótipos de parasitas, concomitantemente. Na natureza encontram-se comumente infecções mistas de *T. cruzi* e *T. rangeli* em hospedeiros vertebrados e invertebrados (Ramirez *et al.*, 2002). Infecções mistas envolvendo os diferentes genótipos de *T. cruzi* (TcI e TcII) também podem ocorrer em hospedeiros naturalmente infectados, principalmente em regiões endêmicas (Bosseno *et al.*, 1996). Além disso, vêm sendo sugerido que infecções mistas geralmente favorecem a seleção natural do parasita de maior virulência, podendo aumentar assim a virulência da infecção (Taylor *et al.*, 1998; Ebert *et al.*, 2000; Gower & Webster, 2005). Deve-se também considerar que em determinada infecção, seja por um ou mais genótipos, o hospedeiro é um habitat que pode ser considerado como fator determinante para a virulência (Taylor *et al.*, 1998).

Em relação a dinâmica da interação interespecífica de parasitas, tem sido cada vez mais frequente competição e ou cooperação entre populações de parasitas. Um exemplo de altruísmo em parasitas seria a variação antigênica nos tripanosomas salivários, onde alguns membros da população são eliminados permitindo o aumento de outros (Vickerman, 1994). Um outro exemplo também mencionado por esse mesmo autor, é a evolução de *Leishmania* no vetor, onde na medida em que uma parte das

Leishmanias que não se diferenciam em metacíclicos, aparentemente tem a função de facilitar a transmissão das Leishmanias que se diferenciam. Desta forma, a hipótese de que o fenômeno de cooperação entre parasitas que infectam um mesmo habitat (um mesmo hospedeiro) seja mais frequente do que a competição, vem também sendo cada vez mais aceita (Rohde, 1994). Entretanto, é importante observar que qualquer espécie ou sistema biológico pode ser considerado como “filtro biológico”, definindo a composição final da população parasitária em um dado ecossistema (hospedeiro), que exercerá efeito modulatório sobre seus componentes.

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).

Nossos isolados demonstraram de fato uma correlação de Z3 com TcII, indicando que há nesta localidade amostras associando-se tanto ao ciclo silvestre, quanto ao ciclo doméstico, respectivamente, corroborando com a complexidade do ciclo silvestre da doença. Estes resultados sugerem que nesta área estudada possa estar ocorrendo o ciclo de *T. cruzi* com características epidemiológicas propostas por Zingales *et al.* (1998), onde ambas as linhagens circulam no hábitat silvestre. A inexistência de casos humanos da doença de Chagas impossibilita, contudo, fazer qualquer conjectura a respeito das características biológicas e histopatológicas que definem os tipos Tc II e Z3.

A existência de populações mistas nos isolados de *T. vitticeps* pode estar refletindo a pressão que estes insetos estão sofrendo em decorrência da atuação antropófica, impelindo-os a circular em diferentes nichos ecológicos, aumentando a possibilidade de contraírem a infecção de diferentes hospedeiros (Gonçalves *et al.*, 1998).

Gonçalves (2000) estudando aspectos ecológicos e biológicos de *Triatoma vitticeps* na localidade de Triunfo, no Estado do Rio de Janeiro, encontrou a incidência de formas adultas e as raras formas jovens achados no domicílio, demonstrando que não há processo de domicialização, confirmando o hábito silvestre desta espécie, caráter assinalado também em outros Estados (Silveira *et al.*, 1984; Correa 1986). Resultados diferentes, contudo, foram obtidos por Dias *et al.* (1989). Esses autores, capturaram 88.3% de *T. vitticeps* no domicílio, comentando, porém, que a espécie apresenta baixas

taxas de colonização e infestação domiciliar nos municípios estudados no Espírito Santo.

De acordo ainda com Gonçalves *et al.* (2000), a espécie *Triatoma vitticeps* em Triunfo alimenta-se eventualmente em homem. Porém, nesta localidade, o estudo do hábito alimentar de *T. vitticeps* demonstrou que há uma predominância para o sangue de tatu. Este estudo revelou ainda que nesta região há um ecletismo da espécie para fontes alimentares, tais como, aves, porcos, cavalos, gambás e roedores. Nossos resultados junto com essas informações nos levam a hipótese de que está ocorrendo nessa região uma grande variedade de reservatórios, o que requer uma análise mais detalhada deste aspecto. Apesar da diversidade alimentar observada e da mobilidade espacial desse inseto o que aumentaria as chances de transmissão da doença de Chagas, nenhum caso humano foi registrado na região, confirmando que esta espécie não é um vetor potencial para o homem (Gonçalves *et al.*, 1998). Esses autores confirmaram ainda que a infecção de triatomíneos por *T. cruzi* está sendo adquirida fora do domicílio, corroborando os dados obtidos por Dias *et al.* (1989).

Os avanços na compreensão da estrutura da população do *T. cruzi* indicam que existe uma necessidade de rever a nomenclatura de cepas de *T. cruzi*.

Nos 10 anos que se seguiram à uma reunião realizada por alguns pesquisadores, a comunidade científica tem avançado no conhecimento da diversidade de *T. cruzi*. A genotipagem de multilocus revelou seis DTUs distintas, que se partem em duas subdivisões principais, denominados DTU I e II. DTUs são definidos como conjunto de ações que são geneticamente mais relacionados entre si do que para qualquer outro material e que são identificáveis por marcadores genéticos comuns, imunológicos ou moleculares (Tibayrenc, 2003). *T. cruzi* DTU II foi dividido ainda em cinco DTUs, II-E (Brisse *et al.*, 2000, 2001), com base em informações filogenéticas congruente de MLEE e marcadores RAPD. DTUs I e Iib correspondem, respectivamente, para *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, grupos recomendados pelo comitê de especialistas em 1999. Estudos recentes indicam que quatro subdivisões surgiram dentro DTU (Herrera *et al.*, 2007), embora estes não tenham sido integrados a revisão da nomenclatura.

Embora tenha sido proposto inicialmente que a grande variabilidade genética do *T. cruzi* seja resultado da evolução clonal predominante (Tibayrenc *et al.*, 1986), existem provas crescentes de que a troca genética entre os parasitas tem contribuído para a presente estrutura da população (Sturm & Campbell 2009). Esta foi primeiro documentada pela existência de organismos híbridos em populações silvestres e

simpátricas de amostras clínicas de *T. cruzi* e, posteriormente, experimentalmente (Gaunt *et al.*, 2003). A visão predominante é de que DTU I e DTU IIb são linhagens antigas e que DTU IIc e DTU IIe são os produtos de no mínimo dois eventos de hibridação (Westenberger *et al.*, 2005, Freitas *et al.*, 2006, Tomazi *et al.*, 2009). A evolução das cepas DTU IIa e DTU IIc não é suficientemente compreendida no momento, embora estes DTUs também possam ter uma origem híbrida (Sturm *et al.*, 2003, Westenberger *et al.*, 2005). Com base em análises do DNA mitocondrial e microssatélites, DTU IIc pode representar uma terceira linhagem ancestral, que foi nomeada *T. cruzi* III (Freitas *et al.*, 2006).

Uma segunda Reunião foi realizada em Búzios, Brasil, em 23 de agosto de 2009, onde ocorreu o XIII Congresso Internacional de Protistology, a XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia e da XXXVI Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Por consenso, o comitê de especialistas reconheceu que a nomenclatura das cepas do *T. cruzi* deve ser modificada e classificadas em seis DTUs: *T. cruzi* I-VI.

Justificativa detalhada e as implicações destas decisões serão apresentadas em uma publicação futura, segundo os especialistas. Portanto, tal classificação ainda não está sendo totalmente considerada pela comunidade científica, que está aguardando mais informações. Sendo assim, não utilizamos tal classificação em nossos isolados.



## 7 – CONCLUSÕES

- ✓ A análise baseada no gene de Mini-Exon de todas as 14 amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* no Município de Santa Maria Madalena, Estado do Rio de Janeiro, revelou que estas pertencem ao Zimodema III;
- ✓ Análise baseada no gene do RNA ribossomal (24S $\alpha$ ) e no gene MSH2 resultou em fragmentos característicos da linhagem TCII;
- ✓ Análise baseada no fragmento F30 demonstrou um perfil característico da linhagem TcII e/ou ZIII;
- ✓ Os isolados de *T. cruzi* podem ser produto de uma mistura de populações de parasitos uma vez que o vetor no ambiente silvestre pode se alimentar de vários hospedeiros vertebrados.
- ✓ A existência de populações mistas nos isolados de *T. vitticeps* pode estar refletindo a pressão que estes insetos estão sofrendo em decorrência da atuação antropófica, impelindo-os a circular em diferentes nichos ecológicos, aumentando a possibilidade de contraírem a infecção de diferentes hospedeiros.
- ✓ Nossos isolados demonstraram uma correlação de Z3 com TcII, indicando que há nesta localidade amostras associando-se tanto ao ciclo silvestre, quanto ao ciclo doméstico, respectivamente, corroborando com a complexidade do ciclo silvestre da doença.
- ✓ Os resultados sugerem que nesta área estudada possa estar ocorrendo o ciclo de *T. cruzi* com características epidemiológicas propostas já por Zingales *et al.* (1998), onde ambas as linhagens circulam no hábitat silvestre.

**7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abad-Franch F, Monteiro FA 2007. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (1):57-70.

Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo O N, Gurgel-Gonçalves R, Dias FB, Diotaiuti L 2008. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop* Jun 21 (Epub ahead of print).

Afderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Bulkestra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers Jr LE, Fornaciari G, Alisson A 2004. A 9,000-years record of Chagas disease. *Proc Nat Acad Sci USA* 101: 2034-2039.

Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Coura JR 2007. Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 47-56.

Albajar P, Laredo SV, Terrazas MB, Coura JR 2003. Miocardiopatia dilatada em pacientes com infecção chagásica crônica. Relato de dois casos fatais autóctones do Rio Negro, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 401-407.

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.

Andrade SG 1974. Caracterizacao de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Reconcavo Baiano: contribuicao ao estudo da patologia geral da doenca de Chagas em nosso meio. *Rev Pat Trop* 3: 65-121.

Andrade SG, Magalhaes 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 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.

Anonymous 1991. Reunión de Ministros de Salud del MERCOSUR, Brasília, Junio 1991, *Resolution 04-3-CS*. Montevideo: Mercado Común del Sur.

Anonymous 1999. Recommendations from Satellite Meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 429-432.

Aragão MB 1983. Domiciliação de triatomíneos ou pré-adaptação à antropofilia e à ornitofilia? *Rev. Saúde públ.*, São Paulo, **17**: 51-55.

Augusto-Pinto L, Bartholomeu DC, Teixeira SM, Pena SD, Machado CR 2001. Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 272: 323-333.

Augusto-Pinto L, Teixeira SM, Pena SD, Machado CR 2003b. Single-Nucleotide Polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 Gene Support the Existence of Three Phylogenetic Lineages Presenting Differences in Mismatch-Repair Efficiency. *Genetics* 164: 117-26.

Ávila HA, Gonçalves AM, Nehme NC, Morel CM, Simpson L 1988. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and American by analysis of PCR – amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol* 42: 175-188.

Avila HA, Goncalves 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(2):175-87.

Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, Simpson L 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 31(9):2421-6.

Baptista CS, Vêncio RZ, Abdala S, Carranza JC, Westenberger SJ, Silva MN, Pereira CA, Galvão LM, Gontijo ED, Chiari E, Sturm NR, Zingales B 2006. Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. *Mol Biochem Parasitol* 150(2):236-48.

Barbosa SE, Belisário CJ, Souza RC, Paula AS, Linardi PM, Romanha AJ, Diotaiuti L 2006. Biogeography of Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) based on molecular marker and paleo-vegetational data. *Acta Trop* 99(2-3):144-54.

Bargues MD, Klisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, Perez R, Rojas MG, O'Connor JE, Gonzalez- Candelas F, Galvão C, Jurberg J, Carcavallo RU, Dujardin JP, Mas-Coma S 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infect Genet Evol* 6(1):46-62.

Barnabe C, Brisse S, Tibayrenc M 2000. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology* 120(Pt 5): 513-526.

Barnabe C, Brisse S, Tibayrenc M 2003. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. *Infect Genet Evol.* 2(3):201-8.

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.

Barretto MP 1976a. Ecologia de triatomíneos e transmissão do *Trypanosoma cruzi*, com especial referência ao Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 10:339-353.

Barretto MP 1979. Epidemiologia. Em: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. (Brener, Z. e Andrade, Z. Eds.) Guanabara-Koogan, Brasil.

Barrett TV, Hoff RH, Mott KE, Miles MA, Godfrey DG, Teixeira R, Almeida de Souza JA, Sherlock IA 1980. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74(1): 84-90.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Böhme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UC, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Bringaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth TJ, Churcher C, Clark LN, Corton CH, Cronin A, Davies RM, Doggett J, Djikeng A, Feldblyum T, Field MC, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Harper D, Harris BR, Hauser H, Hostetler J, Ivens A, Jagels K, Johnson D, Johnson J, Jones K, Kerhornou AX, Koo H, Larke N, Landfear S, Larkin C, Leech V, Line A, Lord A, Macleod A, Mooney PJ, Moule S, Martin DM, Morgan GW, Mungall K, Norbertczak H, Ormond D, Pai G, Peacock CS, Peterson J, Quail MA, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Reitter C, Salzberg SL, Sanders M, Schobel S, Sharp S, Simmonds M, Simpson AJ, Tallon L, Turner CM, Tait A, Tivey AR, Van Aken S, Walker D, Wanless D, Wang S, White B, White O, Whitehead S, Woodward J, Wortman J, Adams MD, Embley TM, Gull K, Ullu E, Barry JD, Fairlamb AH, Opperdoes F, Barrell BG, Donelson JE, Hall N, Fraser CM, Melville SE, El-Sayed NM 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309(5733): 416-22.

Bittencourt AL 1976. Congenital Chagas' disease. *American Journal of Diseases of Childhood* 130: 97-103.

Bittencourt AL 1984. Actual aspects and epidemiological significance of congenital transmission of Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79 (suppl.): 133-137.

Bittencourt AL, Mota E, Ribeiro-Filho R, Fernandes LG, De Almeida PR, Sherlock I, Maguire J, Piesman J & Todd CW 1985. Incidence of congenital Chagas' disease in Bahia, Brazil. *Journal of Tropical Pediatrics* 31: 242-248.

Borst P, Van der Ploeg M, Van Hoek JFM, Tas J, James J 1982. On the content and ploidy of trypanosomes. *Mol Biochem parasitol* 6: 13-23.

Bosseno MF, Telleria J, Vargas F, Yaksic N, Noireau F, Morin A, Brenière SF 1996. *Trypanosoma cruzi*: study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Exp Parasitol* 83: 275-282.

Brandão A, Fernandes O 2006. *Trypanosoma cruzi*: Mutation in the 3' untranslated region of calmodulin gene are specific for lineages *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, and Zymodema III isolates. *Exp Parasitol* 112(4): 247-252.

Brener Z 1977. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations. *PAHO Sc Publ* 347: 11-21.

Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Briones 1999. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol* 104(2):219-32.

Brisse 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.

Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M 2000b. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol* 111: 95-105.

Brisse S, Henriksson J, Barnabe C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M 2003. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol* 2(3):173-83.

Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 31(11):1218-26.

Brito CM, Lima MM, Sarquis O, Pires MQ, Coutinho CF, Duarte R, Pacheco RS 2008. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* I isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer-polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 103 (5):1111-7.

Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, 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.

Burgos JM, Begher SB, Freitas JM, Bisio M, Duffy T, Altcheh J, Teijeiro R, Lopez Alcoba H, Deccarlina F, Freilij H, Levin MJ, Levalle J, Macedo AM, Schijman AG 2005. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. *Am J Trop Med Hyg* 73(6):1016-8.

Buscaglia CA, Di Noia JM 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. *Microbes Infect* 5: 419-427.

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

Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE, Schijman AG 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol* 24: Epub ahead of print.

Carneiro M, Chiari E, Goncalves AM, Da Silva AA, Pereira AM, Morel CM, Romanha AJ 1990. Changes in the isoenzymes and Kinetoplastida DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* antigens in different clinical groups of patients. *Medicina Buenos Aires* n°2, 57:161-168.

Carrasco HJ, Torrellas A, García C, Segovia M, Feliciangeli MD 2005. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by

*Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *Int J Parasitol* 35(13):1379-84.

Chagas C 1909. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.

Correa RR 1986. Informe sobre a doença de Chagas no Brasil e em especial no Estado de São Paulo. *Ver Brasil Malariol D Trop* 20: 39-81.

Coura JR 1966. Contribuição ao estudo da doença de Chagas no Estado da Guanabara. *Ver Bras Malariol D Trop* 18: 9-98.

Coura JR 1996. Perspectivas actuales del tratamiento específico de la enfermedad de Chagas. *Bol Chil Parasitol* 51: 69-75.

Coura JR 2007. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I): 113-122.

Coura JR, Junqueira ACV, Carvalho-Moreira CJ, Borges-Pereira J, Albajar PV 2007. Uma visão sistêmica da endemia chagásica. In AC Silveira, La Enfermedad de Chagas a la Puerta de los 100 Años del Conocimiento de Una Endemia Americana Ancestral, Organización Panamericana de la Salud y Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, p. 25-35.

Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 18: 171-176.

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

de la Fuente AL, Dias-Lima A, Lopes CM, Emperaire L, Walter A, Ferreira A, Sherlock I, Noireau F 2008. Behavioral plasticity of Triatominae related to habitat selection in northeast Brazil. *J Med Entomol* 45(1):14-9.



Deane MP, Lenzi HL, Jansen A 1984. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79 (4):513-5.

Degrave W, Fragoso SP, Britto C, Van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MAB, Mueller R, Simpson L, Morel CM 1988. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mo. Biochem Parasitol* 27: 63-70.

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.

Dias E 1934. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 28: 1-110.

Dias E 1955. Observações sobre eliminação de dejeções e tempo de sucção em alguns triatomíneos sul-americanos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 54: 115-124.

Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (5):603-12.

Dias JCP 2000. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M (org.). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 48-74.

Dias JCP, Diotaiuti L 1998. Vetores secundários de la enfermedad de Chagas en el Brasil y perspectivas para su control. In: *Control de Tripanosomiasis Americana y Leishmaniosis: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares* (F. Guhl & C. A. Jaramillo, eds.), pp. 154-159, Santafé de Bogotá: Universidad de los Andes.

Dias JCP, Feitosa VR, Ferraz Filho NA, Rodrigues VLC, Alencar AS, Sessa PA 1989. Fonte alimentar e potencial vetorial de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859), com relação à doença de Chagas humana no Estado do Espírito Santo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 165-173.

Diotaiuti L, Bronfen E, Perilo MM, Machado GBN, Loiola CF 1987. Aspectos do comportamento do *Triatoma vitticeps* na transmissão da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 20 (suppl.): 87.

dos Santos CB, Ferreira AL, Leite GR, Ferreira GE, Rodrigues AA, Falqueto A 2005. Peridomestic colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(5):471-3.

Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F 2000. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches Taxinomiques Biologiques et Genetiques. *Acad R Scienc Natur Méd* 24(5):162.

Dujardin JP, Steindel M, Chavez T, Machane M, Schofield CJ 1999. Changes in the sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:565-9.

Ebert D, Zschokke-Rohringer C, Carius HJ 2000. Dose effects and density-dependent regulation of two microparasites of *Daphnia magna*. *Oecologia* 122: 200-209.

Elias FE, Vigliano CA, Laguens RP, Levin MJ, Berek C 2003. Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 68(2):242-7.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, *et al.* 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309(5733): 409-15.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony

M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-15.

Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F 2009. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop* 110: 15-21.

Fernandes AJ, Chiari E, Rodrigues RR, Dias JC, Romanha AJ 1991. The importance of the opossum (*Didelphis albiventris*) as a reservoir for *Trypanosoma cruzi* in Bambuí, Minas Gerais State. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86(1):81-5.

Fernandes AJ, Diotaiuti L, Dias JC, Romanha AJ, Chiari E 1989. Natural infection of the anal glands of the opossum (*Didelphis albiventris*) by *Trypanosoma cruzi* in the municipality of Bambuí--MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84(1):87-93.

Fernandes O, Coura JR 2000 Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* isolates from the Amazon basin revealing the biodiversity of the parasite in the region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95 (Suppl. II), 74.

Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM 1999. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 118: 161-166.

Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira AC, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA, Coura JR 2001. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(1):97-9.

Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR 1998b. 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* 58(6):807-11.

Fernandes O, Sturm NR, Derre R, Campbell DA 1998. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 95:129-33.

Filardi LS, Brener Z 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Trop Med Hyg* 81: 755-759.

Frasch ACC 1994. Transialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. *Parasitology* 108: 37-44.

Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves, VF, Teixeira SMR, Chiari E, Junqueira ACV, Fernandes O, Macedo CR, Pena SDJ 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Plos Path* 2 (3).

Galvão C 2003. A sistemática de Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. In: II Encuentro Nacional de Entomología Médica y Vetrinária. VII Jornadas de Zoología del Uruguay, 13-17 de octubre de 2003. *Montevideo Uruguay. Entomología y Vectores* 10: 511-530.

Garcia ES, Azambuja P 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* in insect vector. *Parasitol Today* 7(9): 240-244.

Garcia MH, Souza L, Souza RD, Paula AS, Borges EC, Barbosa SE, Schoffield CJ, Diotaiuti L 2005. Occurrence and variability of *Panstrongylus lutzi* in the State of Ceara, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(5): 410-415.

Gaunt M, Miles M 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 557-565.

Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GAJ, Acostak N, Ariask AR, Miles MA 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421: 936-939.

Gibson W, Bingle L, Blendeman W, Brown J, Wood J, Stevens J 2000. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcripts. *Mol Biochem Parasitol* 107:269-77.

Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E 1999. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* 60(2):205-10.

Gonçalves TCM, Oliveira E, Dias LS, Almeida MD, Nogueira WO, Ávila-Pires FD 1998. An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 711-717.

Gonçalves TCM, Rocha DS, Cunha R 2000. Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Triatominae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Saúde Pública* 34: 348-352.

Gonçalves TCM, Victorio VMN, Jurberg J, Cunha V 1988. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). I. Ciclo evolutivo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 519:523.

Gonçalves TCM, Victorio VMN, Jurberg J, Cunha V 1989. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). II. Resistência ao jejum. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 131-134.

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.

Gonzalez J, Muñoz S, Ortiz S, Anaconda D, Salgado S, Galleguillos M, Neira I, Sagua H, Solari A 1995. Biochemical, immunological, and biological characterization of *Trypanosoma cruzi* populations of the Andean north of Chile. *Exp Parasitol* 81(1):125-35.

Gower M, Webster JP 2005. Intraspecific competition and the evolution of virulence in a parasitic trematode. *Evolution* 59: 544-553.

Hajduk SL, Adler B, Madison-Antenucci S, McManus M, Sabatini R 1997. Insertional and deletional RNA editing in trypanosome mitochondria. *Nucleic Acids Symp Ser* 36: 15-18.

Heitzmann-Fontenelle TJ 1980. Bionomia comparativa de triatomíneos. IV. *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae). *Ecossistema* 5: 39-46.

Henriksson J, Aslund L, Petterson U 1996. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 12: 108-114.

Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, Guhl F 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol* 7: 535-9.

Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SCC, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM 2005. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 379-388.

Herrera L, Das Chagas Xavier S, Viegas C, Martinez C, Cotias PM, Carrasco H, Urdaneta-Morales S, Jansen AM 2004. *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the experimental infection of *Trichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Exp Parasitol* 107(1-2): 78-88.

Hoare CA 1972. *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph*. Blackwell Scientific Publication, Oxford.

Hoefling KP, Ikura M 2002. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* 108: 739-742.

Hypša V, Tietz DF, Zrzavy JR, Rego OM, Galvão C & Jurberg J 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 447–457.

Iwagami M, Higo H, Miura S, Yanagi T, Tada I, Kano S, Agatsuma T 2007. Molecular phylogeny of *Trypanosoma cruzi* from Central America (Guatemala) and a comparison with South American strains. *Parasitol Res* 102(1):129-34.

Junqueira AC, Chiari E, Wincker P 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90(2):129-32.

Junqueira AC, Degraive W, Brandão A 2005. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends Parasitol* 21(6):270-2.

Kawashita S, Sanson G, Fernandes O, Zingales B, Briones M 2001. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol Biol Evol* 18: 2250-2259.

Kierszenbaum F, Ivanyi J, Budzko DB 1976. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology* 30(1):1-6.

Krettli AU, Carrington WP, Nussenzweig R 1979. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: differences in susceptibility to complement lysis. *Clin Exp Immuno* 37: 416-423.

Lane JE, Ribeiro-Rodrigues R, Olivares-Villagómez D, Vnencak-Jones CL, McCurley TL, Carter CE 2003. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA within murine cardiac tissue sections by in situ polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(3):373-6.

Lent A, Wigodzinsky P 1979. Revision of the triatomine (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. Bulletin of the American Museum of Natural History, art. 3, New York, 520 pp.

Lent H 1942. Transmissores da moléstia de Chagas no estado do Rio de Janeiro. *Rev F de Medicina* 6: 3-13.

Lisboa CV, Mangia RH, Luz SL, Kluczkovski A Jr, Ferreira LF, Ribeiro CT, Fernandes O, Jansen AM 2006. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology* 133(Pt 5):603-11.

Lisboa CV, Mangia RH, Rubião E, de Lima NR, das Chagas Xavier SC, Picinatti A, Ferreira LF, Fernandes O, Jansen AM 2004. *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop* 90(1):97-106.

Lyman DF, Monteiro FA, Escalante A.A, Cordon-Rosales C, Wesson DN, Dujardin JP & Beard CB 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among Triatominae vectors of Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 377-386.

Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 1-12.

Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SD 1992. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol* 55: 147-153.

Macedo AM, Pena SDJ 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today* 14:119-123.

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.

Machado CA, Ayala FJ 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7396-401.



Machado CA, Ayala FJ 2002. Sequence variation in the dihydrofolate reductasethymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 121: 33-47.

Maia da Silva, F., Junqueira, A. C., Campaner, M., Rodrigues, A. C., Crisante, G., Ramirez, L. E., Caballero, Z. C., Monteiro, F. A., Coura, J. R., Añez, N. and Teixeira, M. M. G 2007. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol Ecol* 16, 3361-73

Marcilla A, Bargues MD, Abad-Franch F, Panzera F, Carcavallo RU, Noireau F, Galvão C, Jurberg J, Miles MA, Durjardin JP & Mas-Coma S 2002. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution* 1: 225–235.

Martínez-Díaz RA, Escario JÁ, Nogal-Ruiz JJ, Gómez-Barrio 2001. A Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 53-59.

Martins A, Versiani V, Tupinambá A 1940. Estudos sobre a tripanosomíase americana em Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 35: 286-301.

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.

Martins LP, Castanho RE, Casanova C, Caravelas DT, Frias GT, Ruas-Neto AL, Rosa JÁ 2006. Rupestrian triatomines infected by Trypanosomatidae, collected in Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(2):198-202.

Martins LPA, Castanho REP, Rosa JA, Silva LC, Godoy CAP, Rosa RM 2003. Caracterizacao biologica, histopatologica e analise de acido nucleico de uma cepa *Trypanosoma cruzi* da regio de Marilia, SP. *Soc Bras de Med Trop* 36(1): 35-39.

Massad E 2007. The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol Infect* 136: 1153-1164.

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

Mello DA, Borges MM, Chiarini LH 1980 Growth and differentiation in vitro of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from wild animals. *Rev Saude Publica* 4(4): 569-81.

Mendonça MB, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo E, Vargas N, Junqueira A, Naiff RD, Barrett TV, Coura JR, Zingales B, Fernandes O 2002. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodema 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology* 124(Pt 2): 177-184.

Meyer A 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochchka, HN, Mommsen, GT: Biochemistry and molecular biology of fishes vol. 2.

Miles MA, Cibulskis RE 1986. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 2(4): 94-97.

Miles MA, Feliciangeli MD, Rojas de AA 2005. American trypanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* 326: 1444-1448.

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

Miles MA, Povia MM, Prata A, Cedilos RA, De Souza AA, Macedo V 1981. Do radically dissimilar *Trypanosma cruzi* strains (zimodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lance* 1: 1338-1340.

Miles MA, Souza A, Povia M, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272(5656): 819-21.

Miles MA, Toyé PJ, Oswald SC, Godfrey DG 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.

Moncayo A 2003. Chagas Disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 577-591.

Moncayo A, Ortiz Yanise MI 2006. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasit* 100: 663-667.

Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ & Beard CB 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 460-465.

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 C, Simpson L 1980. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am J Trop Med Hyg* 29(5 Suppl): 1070-4.

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.

Morel CM, Deane MP, Gonçalves AM 1986. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol Today* 2(4): 97-101.

Mormori T 1992. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolates, using restriction enzyme analysis of kinetoplast DNA. *Nippon Rinsho* 50 (Suppl):475-9.

Neiva A 1914. Presença em uma localidade do Estado do Rio de um novo transmissor da moléstia de Chagas encontrado infectado em condições naturais (Nota prévia). *Brasil Med* 28: 333-335.

Neves DP, Carvalho ALM 1972. Comportamento do *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) em xenodiagnóstico. *Rev Pat Trop* 1: 277-281.

Nicolle GL 1908. Culture du parasite du Boutond'Orient. *CR Acad Sci* 1: 1-30.

Nogueira N, Cohn Z 1976. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J Exp Med* 143(6): 1402-1420.

Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Abad-Franch F, Flores E, Vargas F 2000. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(1):23-7.

Noireau F, Zegarra M, Ordoñez J, Gutierrez T, Dujardin JP 1999. Genetic structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) domestic populations from Bolivia: application on control interventions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (3):347-51.

Novy FG, Mcneal WJ 1904. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J Infect Dis* 1: 1-30.

O'Connor O, Bosseno MF, Barnabé C, Douzery EJ, Brenière SF 2007. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. *Infect Genet Evol* (5):587-93.

Oliveira R, Broude N, Macedo A, Cantor C, Smith C, Pena S 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci* 95: 3776-3780.

Pacheco RS, de Brito CM, Sarquis O, Pires MQ, Borges-Pereira J, Lima MM 2005. Genetic heterogeneity in *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected triatomine vectors in northeastern Brazil: epidemiological implications. *Biochem Genet* 43(9-10): 519-30.

Paula AS, Diotaiuti L & Schofield CJ 2005, Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Molecular Phylogenetics Evolution* 35: 712–718.

Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B 2003. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol Biochem Parasitol* 129(1): 79-90.

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.

Perlowagora-Szumlewicz AP, Muller CA, Moreira CJ de C 1990. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. IV: The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. *Rev Saúde Pública* 24: 165-177.

Pinho AP, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM 2000. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 509-514.

Pinto AY, Valente SA, Valente VC 2004. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. *Braz J Infect Dis* 8: 454-460.

Póvoa MM, de Souza AA, Naiff RD, Arias JR, Naiff MF, Biancardi CB, Miles MA 1984. Chagas' disease in the Amazon basin IV. Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the states of Amazonas and Rondonia, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 78(5):479-87.

Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, Zingales B 2002. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic: área of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta Trop* 84: 189-198.

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

Richer W, Kengne P, Cortez MR, Perrineau MM, Cohuet A, Fontenille D, Noireau F 2007. Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. *Trop Med Int Health* 12(6):759-64.

Roellig DM, Brown EL, Barnabé C, Tibayrenc M, Steurer FJ, Yabsley MJ 2008a. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerg Infect Dis* 14(7):1123-5.

Rohde K 1994. Niche restriction in parasites: proximate and ultimate causes. *Parasitol* 109: S69-S84.

Rohwedder RW 1969. Infección chagásica en dadores de sangre y las probabilidades de transmitirla por medio de la transfusión. *Bol Chil Parasitol* 24: 8893.

Romanha AJ 1982. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. Tese PhD, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 110p.

Romanha AJ, Pereira AAS, Chiari E, Kilgour V 1979. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp Biochem Physiol* 62: 139-142.

Rozas M, Botto-Mahan C, Coronado X, Ortiz S, Cattán PE, Solari A 2007. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. *Am J Trop Med Hyg* 77(4):647-53.

Ruas Neto AL, Corseuil E 2002. Hábitos, distribuição geográfica e potencialidade dos triatomíneos rupestres como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil. *Entomol. Vect* 9: 231-249.

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.

Sánchez-Guillén Mdel C, Bernabé C, Tibayrenc M, Zavala-Castro J, Totolhua JL, Méndez-López J, González-Mejía ME, Torres-Rasgado E, López-Colombo A, Pérez-Fuentes R 2006. *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(6):585-90.

Santos UM, Pinto AFS, Almeida AZ, Zaganelli FL, Carrancho PV, Netto NA 1969. Doença de Chagas no estado do Espírito Santo. III: Vetores do *Trypanosoma*. *Rev Soc Bras Med Trop* 3: 51-52.

Saraiva NG, Holguin AF, Cibulskis RE, D'Alessandro A 1987. Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the Eastern plains, piedmont and highland of Colômbia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36: 59-69.

Schaub GA, Boker CA 1987. Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi*: Influence of the starvation studied by scanning electron microscopy. *Acta Trop* 43: 349-354.

Schlemper Jr. BR, Ávila CM, Coura JR, Brener Z 1893. Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 16: 23-30.

Schmunis GA 1985. Chagas' disease and blood transfusion, p. 127145. In RV Dodd & LF Barker (eds), *Infection, Immunity and Blood Transfusion*, AR Liss, New York.

Schmunis GA 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I): 75-85.

Schofield CJ & Dolling WR 1993. Bedbugs and kissing-bugs (bloodsucking Hemiptera). In: *Medical Insects and Arachnids* (R. P. Lane & R. W. Crosskey, eds.), pp. 483-516, London: Chapman & Hall.

Schofield CJ 1988. Biosystematics of the triatominae. In: *Biosystematics of haematophagous insect*. M.W. Service, Clarendon Press, Oxford, p.284-312.

Schofield CJ, Maudlin I 2001. Trypanosomiasis control. *Int J Parasitol* 31: 615-620.

Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG 1999a. Phytomonas: Analysis of polymorphism and genetic relatedness between isolates from plants and phytophagous insects from different geographic regions by RAPD fingerprints and synapomorphic markers. *J Eukaryot Microbiol* 46(6):618-25.

Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MMG 1999b. Trypanosomatidae: Phytomonas detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. *Exp Parasitol* 91(3):268-79.

Sessa PA, Carias VRD 1986. Infecção natural de triatomíneos do Espírito Santo por flagelados morfologicamente semelhantes ao *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 19:99-100.

Shapiro TA and Englund PT 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* 49: 117–143.

Silva CS 2006. Estudo morfológico e histopatológico de amostras silvestres de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1959) no estado do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 85p.

Silva IG 1985. *Influência da temperatura na biologia de 18 espécies de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) e no xenodiagnóstico*. MSC Thesis, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 169p.



Silveira AC, Alencar TA, Máximo MHC 1983. Sobre o *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859), no estado do Espírito Santo, Brasil. X Reunião Anual Pesquisa Basica doença de Chagas, Caxambu, p.58.

Silveira AC, Feitosa VR, Borges R 1984. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975/1983, Brasil. *Rev Bras Malariol D Trop* 36: 15-312.

Silveira AC, Rezende DF 1994. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27: 11-22.

Silveira JF 2000. Biologia Molecular de *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, 127-147.

Simpson L 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol* 41:363-82.

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, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83(2):141-52.

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

Spotorno O AE, Córdova L, Solari I A 2008. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* I subgroups through characterization of cytochrome b gene sequences. *Infect Genet Evol*.

Stal C 1859. Monographie der gattung *Conorhinus* und Verwandten. *Berliner Entomol Zeitschr* 3:101-117.

Steindel M 1993. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* isoladas de reservatórios e vetores silvestres naturalmente infectados de Santa Catarina. Belo Horizonte: UFMG, 166p (Tese de doutorado).

Steindel M, Dias Neto E, Menezes CPL, Romanha AJ, Simpson AJG 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 60: 71-80.

Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, Kosmann C, Sincero TC, Stoco PH, Murta SM, de Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC 2008. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Jan; 60(1): 25-32.

Steindel M, Pinto CJ 1988. *Trypanosoma cruzi* development in the anal glands of experimentally infected *Lutreolina crassicaudata* (Marsupialia, Didelphidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83(3):397.

Steindel M, Toma HK, Ishida MM, Murta SMF, Carvalho Pinto CJ, Grisard EC, Schlemper Jr. BR, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ 1995. Biological and isoenzymatic characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from sylvatic reservoirs and vectors from the state of Santa Catarina, Southern Brazil. *Acta Trop* 60: 167-177.

Stevens J, Rambaut A 2001. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol* 1(2):143-50.

Stevens JR, Gibson WC 1999. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol Today* 15(11):432-7.

Stothard JR, Frame IA, Carrasco HJ, Miles MA 1998. On the molecular taxonomy of *Trypanosoma cruzi* using riboprinting. *Parasitology* 117:243–247.

Stothard JR, Frame IA, Carrasco HJ, Miles MA 1998. Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) analysis of riboprints from *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 117(Pt 3): 249-253.

Stuart K, Allen TE, Kable ML, Lawson S 1997. Kinetoplastid RNA editing: complexes and catálisis. *Curr Opin Chem Biol* 1(3): 340-346.

Stuart K, Feagin JE 1992. Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int Rev Cytol* 141:65-88.

Sturm NR, Campbell DA 2009. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*, in press.

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 33(3):205-14.

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

Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA 2003. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 33(3): 269-279.

Tartarotti B, Sommaruga R 2006. Seasonal and ontogenetic changes of mycosporine-like amino acids in planktonic organisms from an alpine lake. *Limnology and Oceanography* 51: 1530–1541.

Taylor LH, Mackinnon MJ, Read AF 1998. Virulence of mixed-clone and single-clone infections of the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Evol* 52: 583-591.

Thompson RCA, Lymbery AJ 1990. Intraespecific variations in parasites – What is a strain? *Parasitol Today* 6: 345-348.

Tibayrenc M 1995. Population genetic of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in Parasitology* 83: 141-145.

Tibayrenc M 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis* 2(1): 12.

Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabe C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1335-1339.

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

Toma HK 2005. Seleção de transcritos diferenciais pertencentes às duas linhagens filogenéticas principais de *Trypanosoma cruzi*, RJ. Doutorado [Dissertação em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz.

Toma HK, Yamada-Ogatta SF, Brandão A, Krieger MA, Goldenberg S, Fernandes O 2007. *Trypanosoma cruzi*: Subtractive hybridization as a molecular strategy to generate new targsens to distinguish groups and hybrids. *Exp Parasitol* 117: 178-187.

Tomazi L, Kawashita SY, Pereira PM, Zingales B, Briones MRS 2009. Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic. *Genet Mol Res* 8: 458-476.

Torres JP, Ortiz S, Muñoz S, Solari A 2004. *Trypanosoma cruzi* isolates from Chile are heterogeneous and composed of mixed populations when characterized by schizodeme and Southern analyses. *Parasitology* 128(Pt 2):161-8.

Toyé PJ 1974. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68: 147.

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.

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, Macedo AM, Oliveria RP, Andrade LO, Chiare E, Galvao 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.

Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM 1999. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop* 72(2):203-12.

Ventura RM, Paiva F, Silva RAMS, Takeda G, Buck GA, Teixeira MMG 2001. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp Parasitol* 99:37-48.

Vickerman K 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol* 24: 1317-1331.

Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M 2003. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 68(5):574-82.

Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell D, Sturm NR 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171: 527-543.

Westenberger SJ, Sturm NR, Campbell DA 2006. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. *Int J Parasitol* 36(3):337-46.

WHO - World Health Organization 1998b. Chagas disease. Interruption of transmission in Uruguay. *Weekly Epidemiological Record* 73: 1-4.

WHO - World Health Organization 1999. Chagas disease. Interruption of transmission in Chile. *Weekly Epidemiological Record* 74: 9-11.

WHO - World Health Organization 2000. Chagas disease. Certification of interruption of transmission in Chile. *Weekly Epidemiological Record* 75: 10-12.

WHO - World Health Organization 2002. *Control of Chagas disease*. Second report of the WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 905, Geneva, 96 pp.

WHO-World Health Organization 1991. Control of Chagas disease, Technical Report Series, 811. Geneva, 91 pp.

Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM 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(6):771-7.

Xavier SS, Sousa AS, Albajar VP, Junqueira ACV, Bóia MN, Coura JR 2006. Cardiopatia chagásica crônica no Rio Negro, Estado do Amazonas. Relato de três novos casos autóctones, comprovados por exames sorológicos, clínicos, radiográficos do tórax, eletro e ecocardiográficos. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 211-216.

Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, de 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(2): 225-33.

Zeledón R 1974. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. Trypanosomiasis and Leishmaniasis with reference to Chagas' disease. 20 Ciba Foundation Symposium (new series), Amsterdam, p.51-85.

Zingales B, Pereira MES, Oliveira R, Almeida KA, Umezawa ES, Souto RP, Vargas N, Cano MI, Da Silveira JF, Nehme NS, Norel CM, Brener Z, Macedo A 1997. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Trop* 68: 159-173.

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 sequence. *Int J Parasitol* 28: 105-112.

Zulantay I, Apt W, Gil LC, Rocha C, Mundaca K, Solari A, Sánchez G, Rodríguez C, Martínez G, De Pablos LM, Sandoval L, Rodríguez J, Vilchez S, Osuna A 2007. The PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic American trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result than routine xenodiagnosis. *Ann Trop Med Parasitol* 101(8):673-9.

