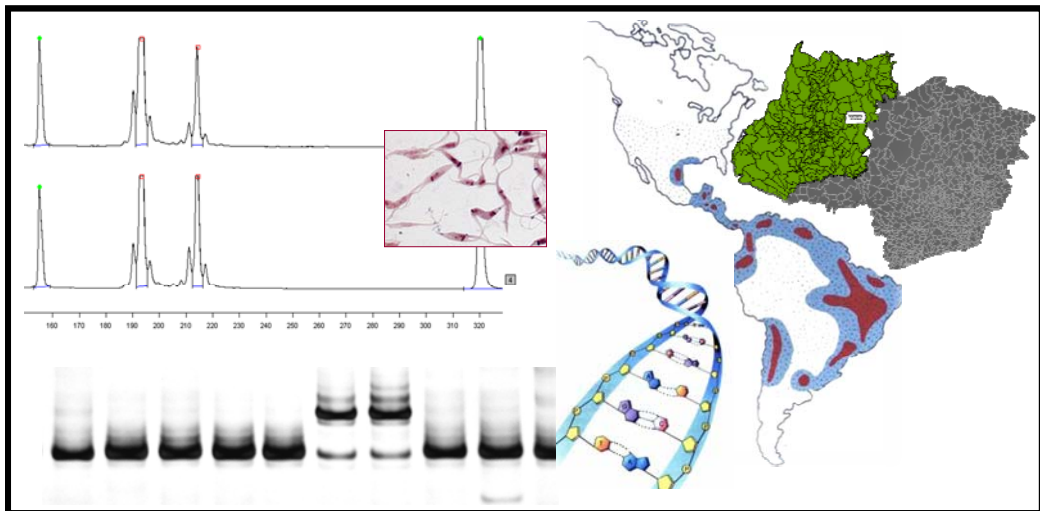


Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Parasitologia  
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**Daniella Alchaar D'Ávila**

**Avaliação da dinâmica populacional do  
*Trypanosoma cruzi* durante a fase  
crônica da doença de Chagas humana**



**Belo Horizonte, MG  
2008**

**Daniella Alchaar D'Ávila**

Avaliação da dinâmica populacional do *Trypanosoma cruzi*  
durante a fase crônica da doença de Chagas humana

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências/Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Lúcia Maria da Cunha Galvão, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG e Pesquisadora Visitante/CNPq nos Programas de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Ciências Farmacêuticas, UFRN.

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Andréa Mara Macedo, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG.

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2008

Tese desenvolvida nos Laboratórios de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, Departamento de Parasitologia e de Genética e Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG.

**COLABORADORES:**

Prof. Dr. Egler Chiari  
Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG

Prof. Dr. Carlos Renato Machado  
Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG

Dr. Helder Magno Silva Valadares  
Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG

Profa. Dra. Eliane Dias Gontijo  
Departamento de Medicina Preventiva e Social, Faculdade de Medicina/UFMG

Prof. Dra. Ana Maria de Castro  
Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, IPTSP/UFMG

**Apoio Financeiro:** PRONEX/CNPq/FAPEMIG; CNPq, Edital MCT/CNPq/MS-SCTIE-DECIT 25/2006-Estudo de Doenças Negligenciadas; CNPq (bolsas de Doutorado e Pesquisador Visitante)

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”*

*(Francisco Cândido Xavier)*

*Dedico esta tese com um carinho muito especial ao Ronaldo, que esteve ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri, nas horas que me lamentei e nas horas que de uma forma ou de outra demonstrei total alegria... Hoje quero parar e agradecer, porque você fez e fará sempre parte da minha história!*

*Aos meus pais, Marta e Moadison, cuja ausência foi por mim sentida em todos os momentos, mas que apesar da distância física sempre estiveram presentes nos meus pensamentos. Agradeço a eles o ponta pé inicial, a superação das dificuldades, os conselhos, o amor e o apoio recebidos.*

*Aos meus irmãos, Miller e Moadison, pelo apoio e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Toda a minha gratidão a minha orientadora Profa. **Lúcia Maria da Cunha Galvão**, por suas sugestões e apoio incondicional. Nunca serei capaz de esquecer a maneira com a qual fui recebida em seu laboratório. Agradeço a confiança em mim depositada, além da orientação segura e objetiva no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. **Andréa Mara Macedo** pela co-orientação, idéias e sugestões indispensáveis para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. **Egler Chiari**, pelo apoio científico recebido para a realização deste projeto. Agradeço a confiança em mim depositada e o privilégio de ter feito parte da sua equipe de trabalho e ainda por seu exemplo como, pesquisador e ser humano.

À Profa. **Eliane Dias Gontijo**, pela imprescindível colaboração referente a avaliação clínica dos pacientes chagásicos crônicos e a Profa. **Ana Maria de Castro** pela amizade e dicas constantes, mesmo à distância.

Ao Prof. **Carlos Renato Machado** por sua sabedoria, dicas e sugestões brilhantes.

Ao **Helder Magno Silva Valadares**, por seus esclarecimentos no procedimento e análise da técnica de microssatélites. E acima de tudo, pela amizade e apoio incondicional em tudo que precisei.

Agradeço a parceria com o grupo de pesquisa do Instituto de Química, USP, Profa. **Bianca Zingales** e aos doutorandos **Margoth Moreno** e **César Carranza** pelas sugestões compartilhadas.

Aos Profs. **Eliane Lages Silva** e **Wendell Sérgio Ferreira Meira** pela disponibilidade, amizade e sugestões.

Aos **Professores** do Programa de Pós-graduação em Parasitologia representados pelo coordenador Prof. Dr. **Pedro Marcos Linardi**, pela convivência e pelos ensinamentos ministrados durante o curso.

À **Maria Norma Melo** do laboratório de Leishmaniose (Departamento de Parasitologia/ICB, UFMG) pelas sugestões como relatora dessa tese, pelo carinho e exemplo de ser humano que foi por mim percebido desde que a conheci.

À **Sumara Aparecida Ferreira** pela amizade, carinho e atenção constantes, conduzindo a secretaria do Programa de Pós Graduação em Parasitologia.

Ao **Afonso Costa Viana** e **Orlando Carlos Magno**, técnicos do Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, pela amizade e apoio no decorrer desse trabalho.

À **Katita (Kátia Barroso)** do Laboratório de Genética e bioquímica (LGB), pelo sorriso encantador e pelo suporte técnico no ALF.

À **Rosálida Estevan Nazar Lopes** do Laboratório de Toxoplasmose (Departamento de Parasitologia/ICB, UFMG) pela amizade e palavras de fé.

À **Rosângela Gomes** e **Soraia de Oliveira Silva** do Laboratório de Leishmaniose (Departamento de Parasitologia/ICB, UFMG) pela paciência, competência e esclarecimentos em relação às técnicas de biologia molecular.

À **Edméa de Castro Xavier** e **Vera Lúcia Marques** pela atenção e amizade ao longo desse percurso.

Aos **colegas de turma** da Pós Graduação pelos momentos de agradável convivência.

Agradeço aos amigos especiais **Cíntia Fontes**, **Geane Peroni** e **Marco Antônio** pela amizade, convivência e pela paciência de me ouvir nos momentos de desânimo e também de total alegria. Já sinto saudades !!!

À Profa. **Antônia Cláudia Câmara** (“Claudinha ou Crau”), pela amizade, pelo sorriso faceiro nos momentos de dificuldades e pelas discussões do trabalho e tese no MSN.

À **Vanja Veloso**, por seus conselhos, amizade e apoio incondicional. Amizade que desejo cultivar por toda vida.

Ao **Paulo Marcos da Matta Guedes**, pela ajuda com as técnicas de imunologia e pela amizade.

Ao **Claudiney** e ao **Rodrigo** (LGB) pelo apoio e experiências compartilhadas.

Ao **Jamil Silvano de Oliveira**, do Laboratório de Enzimologia e Físico-química de proteínas, pela ajuda na quantificação do DNA.

Aos demais **técnicos** e **funcionários** do Departamento de Parasitologia, pela agradável convivência.

A **todos** que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho meu especial agradecimento.

Aos **pacientes chagásicos**, pela contribuição ao conhecimento científico.

À **DEUS**, por tudo que eu consegui tornar possível em minha vida!

## RESUMO

Neste trabalho analisamos o perfil genético de 102 amostras do *T. cruzi* previamente isoladas de 44 pacientes chagásicos crônicos procedentes de diferentes regiões endêmicas dos estados de Minas Gerais (MG) e Goiás (GO), Brasil. De cada paciente foi obtido mais de um isolado do parasito em diferentes períodos de tempo, para se compreender melhor a dinâmica populacional desse parasito durante a fase crônica da doença de Chagas. Todas as amostras de DNA do *T. cruzi* foram caracterizadas utilizando marcadores de DNA independentes: (i) amplificação do domínio D7 do gene 24S $\alpha$  do DNA ribossomal (rDNA 24S $\alpha$ ); (ii) gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (COII) e (iii) amplificação da região intergênica dos genes de mini-exon (SL-IR). Um total de 77 amostras do *T. cruzi* (procedentes de 32 pacientes) foram analisadas utilizando nove *loci* de microssatélites. Os dados relacionados aos marcadores rDNA 24S $\alpha$  e COII mostraram que a maior parte dos isolados pertencem ao grupo rDNA 1 e haplogrupo mitocondrial C, associados à linhagem *T. cruzi* II. Por outro lado, os isolados de dois pacientes foram inicialmente caracterizados (rDNA 24S $\alpha$ ) como *T. cruzi* I e cepas híbridas. Entretanto, a análise dos genes COII e SL-IR confirmaram que esses isolados pertencem a linhagem *T. cruzi* III e ao grupo de cepas híbridas, respectivamente. Esses resultados sugerem que a caracterização genética utilizando somente um marcador molecular não é suficiente para classificar as amostras do *T. cruzi* dentro das linhagens principais *T. cruzi* I, II e III, bem como cepas híbridas. As análises dos perfis de microssatélites mostraram que diferentes amostras do *T. cruzi* isoladas de um mesmo paciente foram geneticamente idênticas e monoclonais, exceto, nas amostras do parasito procedentes de dois pacientes, onde observamos uma alternância de correspondência entre os alelos para o *locus* SCLE11, sugerindo que pelo menos duas populações do parasito estariam circulando no sangue desse paciente. Os isolados obtidos de outros dois pacientes amplificaram simultaneamente três fragmentos de tamanhos diferentes para o *locus* de microssatélite TcAAAT6, sugestivo de policlonalidade ou aneuploidia para esse *locus*. Sendo assim, nossos resultados enfatizam a necessidade e relevância do estudo de diferentes amostras do *T. cruzi* isoladas de um mesmo paciente em diferentes períodos de tempo, incluindo amostras antes e após tratamento específico, para investigar a estrutura e a dinâmica populacional do *T. cruzi* durante a fase crônica da doença de Chagas.

## ABSTRACT

In this work we analyzed the genetic profile of 102 samples of the *T. cruzi* previously isolates from 44 Chagas disease chronic patients proceeding from different endemic regions of the states Minas Gerais (MG) and Goiás (GO), Brazil. At least two isolates were obtained from each patient at different times aiming to understand the parasite population dynamics during the chronic phase of the disease of Chagas. All the samples of DNA of the *T. cruzi* were characterized using marking of independent DNA: (i) amplification of the D7 domain of the 24S $\alpha$  ribosomal RNA gene (rDNA24S $\alpha$ ); (ii) mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2 (COII) gene and (iii) amplification of the intergenic region of spliced leader genes (SL-IR). A total of 77 samples of the *T. cruzi* (proceeding from 32 patients) were further analyzed for nine microsatellite loci. The data related to the markers rDNA 24S $\alpha$  and COII showed that most of the isolated belongs to the group rDNA 1 and haplogrupo mitochondrial C, associates to the *T. cruzi* II major lineage. On the other hand, isolates of the two patients were initially characterized (rDNA 24S $\alpha$ ) as *T. cruzi* I and hybrid strains. However, analyses of COII and SL-IR genes confirmed that those isolates belonged to the *T. cruzi* III and hybrid group, respectively. These results suggest that the genetic characterization only using a molecular marker is not enough to classify the samples of the *T. cruzi* inside of main lineages *T. cruzi* I, II and III, as well as strains hybrids. The analysis of the profiles of microsatellites showed that different samples of the *T. cruzi* isolated of exactly patient one were genetically identical and monoclonal, except, in the samples of the parasite originating two patients, where we observe a correspondence alternation enters the alelos for locus SCLE11, suggesting that at least two populations of the parasite they would be circulating in the blood of this patient. The isolated ones of others two patients, simultaneously amplified three fragmentos of different sizes for locus of microsatellite TcAAAT6, suggestive of policlonalidy or aneuploidy for this locus. Being thus, our results emphasize the necessity and relevance of the study of different samples of the *T. cruzi* isolated of exactly patient one in different periods of time, including samples before and after specific treatment, to investigate the structure and the population dynamics of the *T. cruzi* during the chronic phase of the disease of Chagas.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Mapas dos estados de MG e GO. Em destaque (várias cores) os municípios de procedência dos isolados estudados..... 45
- Figura 2- Eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% representativos da amplificação do gene rDNA 24S $\alpha$  nas amostras do *T. cruzi*, isoladas de pacientes chagásicos crônicos. PM: marcador de peso molecular de 25 pares de base (pb). Controles: DNA do clone Col1.7G2 (fragmentos de ~110pb, rDNA 2, *T. cruzi* I); clone CL Brener (~125pb, rDNA 1, híbrido) ou cepa JG (~125pb, rDNA 1, *T. cruzi* II); clone SO3 cl5 (~125 e 110pb, rDNA 1/2, híbrido); e a cepa 4166 (~117/119pb, associada a populações pertencentes ao zimodema 3 ou *T. cruzi* III). Na última canaleta o controle negativo da reação (Branco-BR). (A) e (B) Isolados do *T. cruzi* pertencentes aos grupos rDNA1, 2 e 1/2..... 56
- Figura 3- Eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% representativos da análise dos fragmentos do gene mitocondrial COII, após digestão com a enzima AluI (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism). PM: marcador de peso molecular de 25pb. Controles: DNA do clone Col1.7G2 (fragmentos de 264, 81 e 30 pares de base-pb, haplótipo mitoncondrial A, *T. cruzi* I); cepa JG (fragmentos de 212 e 81pb, haplótipo mitoncondrial C, *T. cruzi* II); e o clone CL Brener (fragmentos de 294 e 81 pb, haplótipo mitoncondrial B, *T. cruzi* III ou híbrido). Controle negativo da reação (Branco-BR). (A) Isolados do *T. cruzi* relacionados ao haplogrupo C, e (B) Isolados do *T. cruzi* pertencentes ao haplogrupo B. Não foram observados isolados haplogrupo mitoncondrial A..... 57
- Figura 4- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% representativo da amplificação do espaçador intergênico dos genes de mini-exon nas amostras do *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos. PM: marcador de peso molecular de 25 pares de base (pb). Controles: DNA do clone Col1.7G2 (fragmento de ~ 150-157pb, *T. cruzi* I); cepa JG (~ 150-157pb, *T. cruzi* II); clone CL Brener (150-157pb, híbrido); e a cepa 3869 (fragmento de ~ 200pb, *T. cruzi* III). Na penúltima canaleta o controle negativo da reação (Branco-BR)..... 58
- Figura 5- Perfis de eletrofluorogramas obtidos pelo seqüenciador automático de DNA A.L.F. (Automatic Laser Fluorescent Sequencer) dos fragmentos amplificados pela PCR dos loci de microssatélites MCLF10, SCLE10, e TcTAT20. Isolados monoclonais homozigotos (1 pico) e heterozigotos (2 picos). Os números correspondem ao tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb). Os picos das extremidades correspondem aos marcadores internos de 155, 210, e 320pb..... 63
- Figura 6- Perfis de eletrofluorogramas obtidos a partir de análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F. dos fragmentos amplificados pela técnica de PCR para o locus TcAAAT6 de amostras do *T. cruzi* isoladas de um mesmo paciente, mostrando perfis de microssatélites com mais de dois picos característicos de amostras policlonais ou aneuplóides para esse locus. Os picos das extremidades correspondem aos marcadores internos de 210 e 320 pares de base (pb)..... 64

Figura 7-	Perfis de eletrofluorogramas obtidos a partir de análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F. dos fragmentos amplificados pela técnica de PCR para o <i>locus</i> SCLE11 de amostras do <i>T. cruzi</i> isoladas de um mesmo paciente, mostrando tamanhos de alelos diferentes sugestivos de população policlonal. Os picos das extremidades correspondem aos marcadores internos de 75 e 210 pares de base (pb).....	66
Figura 8-	Rede de Wagner construída pelo método de máxima parcimônia, a partir dos dados da análise de nove <i>loci</i> de microssatélites (SCLE10, MCLF10, SCLE11, MCLG10, MCLE01, TcAAT8, TcTAT20, TcATT14, TcAAAT6) em 36 populações monoclonais do <i>T. cruzi</i> . Os valores de <i>bootstrap</i> acima de 70% estão destacados na árvore.....	71
Figura 9-	Árvore filogenética construída por UPGMA a partir dos dados da análise de nove <i>loci</i> de microssatélites (SCLE10, MCLF10, SCLE11, MCLG10, MCLE01, TcAAT8, TcTAT20, TcATT14, TcAAAT6) em 36 populações monoclonais do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Os valores de <i>bootstrap</i> acima de 70% estão destacados na árvore.....	72
Figura 10-	Rede de Wagner construída pelo método de máxima parcimônia, a partir dos dados da análise de nove <i>loci</i> de microssatélites (SCLE10, MCLF10, SCLE11, MCLG10, MCLE01, TcAAT8, TcTAT20, TcATT14, TcAAAT6) em 36 populações monoclonais do <i>T. cruzi</i> . Em destaque, os isolados procedentes de pacientes com a forma cardíaca (FC) e aqueles procedentes de pacientes com a forma indeterminada (FI) da doença de Chagas. Os valores de <i>bootstrap</i> acima de 70% estão destacados na árvore.....	73
Figura 11-	Rede de Wagner construída pelo método de máxima parcimônia a partir dos dados das análises de cinco <i>loci</i> de microssatélites (SCLE10, MCLF10, SCLE11, MCLG10, MCLE01), em 69 populações monoclonais do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Os valores de <i>bootstrap</i> acima de 70% estão destacados na árvore.....	75
Figura 12-	Árvore filogenética construída por UPGMA a partir dos dados obtidos das análises de cinco <i>loci</i> de microssatélites (SCLE10, MCLF10, SCLE11, MCLG10, MCLE01) em 69 populações monoclonais do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Os valores de <i>bootstrap</i> acima de 70% estão destacados na árvore.....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características dos 44 pacientes chagásicos crônicos procedentes dos estados de MG e GO: origem geográfica, idade, sexo, formas clínicas e seus respectivos isolados de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	111
Tabela 2 -	Iniciadores utilizados nas reações de microssatélites.....	51
Tabela 3-	Características dos nove <i>loci</i> de microssatélites analisados.....	59
Tabela 4 -	Tamanho (pb) dos alelos observado para nove <i>loci</i> de microssatélites analisados em 58 amostras do <i>T. cruzi</i> procedentes de MG.....	60
Tabela 5	Tamanho (pb) dos alelos observado para nove <i>loci</i> de microssatélites analisados em 19 amostras do <i>T. cruzi</i> procedentes de GO.....	62
Tabela 6-	Número, tamanho dos alelos (pb), percentual de amostras com genótipos heterozigotos e homozigotos, encontrados para os <i>loci</i> de microssatélites compostos por repetições de dinucleotídeos.....	67
Tabela 7-	Número, tamanho dos alelos (pb), percentual de amostras com genótipos heterozigotos e homozigotos encontrados para os <i>loci</i> de microssatélites compostos por repetições de trinucleotídeos e tetranucleotídeos.....	67
Tabela 8-	Número de repetições identificadas para cada <i>locus</i> de microssatélite em 37 isolados do <i>T. cruzi</i> .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALF-	<i>Automated laser fluorescent sequencer – Pharmacia</i>
COII-	Gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II
DNA-	Ácido desoxiribonucléico
dNTP-	Desoxinucleotídeos trifosfato
EDTA-	Ácido etilenodiamino tetracético
FCC-	Forma clínica cardíaca
FCI-	Forma clínica indeterminada ou assintomática
FIG.	Figura (s)
TAB.	Tabela (s)
GO-	Goiás
h-	hora
ICB-	Instituto de Ciências Biológicas
Kb-	Kilobase
kDNA-	DNA do cinetoplasto
KRT-	<i>Krebs-Rringer-Tris</i>
LIT-	<i>Liver infusion tryptose</i>
LSSP-PCR-	<i>Low stringency single specific primer</i>
MG-	Minas Gerais
mg-	miligrama
mL-	mililitro
mM-	milimolar
min-	minuto (s)
ng-	nanograma
nm-	nanômetro
Pb-	pares de base
PCR-	Reação em cadeia de polimerase
PHYLP-	<i>Phylogeny Inference Package</i>
PM-	peso molecular
RAPD-	<i>Randomly amplified polymorphic DNA</i>
RFLP-	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA-	Ácido ribonucléico
rDNA-	DNA ribossômico
s-	segundo (s)
SDS-	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
TA-	Tampão da amostra (TA 2x; 0,5% azul de bromofenol; xileno cianol 0,5%; glicérol 60%)
TBE 1x-	Tampão Tris-Borato, (89mM Tris-Borato, 2mM EDTA pH=8)
UPGMA-	<i>Unweighted pair- group method analysis</i>
UFMG-	Universidade Federal de Minas Gerais
U/ $\mu$ L-	Unidade por microlitro
$\mu$ g-	Micrograma
$\mu$ L-	Microlitro
$\mu$ M-	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
2.1	O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	21
2.2	O genoma do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
2.2.1	O genoma nuclear.....	24
2.2.2	O genoma mitocondrial.....	25
2.3	Variabilidade intra-específica do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	26
2.3.1	Variabilidade biológica.....	27
2.3.2	Variabilidade bioquímica.....	28
2.3.3	Variabilidade molecular.....	30
2.4	Linhagens principais do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	32
2.5	Os microssatélites em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	36
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	40
3.1	Objetivo Geral.....	41
3.2	Objetivos Específicos.....	41
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
4.1	Delineamento experimental .....	43
4.2	Pacientes e amostras do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	44
4.3	Avaliação clínica.....	46
4.4	Isolamento do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	46
4.5	Cultura acelular e obtenção de massa úmida do <i>Trypanosoma cruzi</i> ...	47
4.6	Preparação do DNA genômico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	47
4.7	Amplificação da região 3' do gene 24 S $\alpha$ do DNA ribossomal.....	48
4.8	PCR gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (CO II).....	49
4.9	Espaçador intergênico dos genes mini-exon de <i>T. cruzi</i> (SL-IR).....	49
4.10	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	50
4.11	Análises do polimorfismo de microssatélites.....	50
4.12	Determinação do tamanho dos alelos de microssatélites.....	52
4.13	Construção das árvores filogenéticas.....	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	54
5.1	Caracterização genética dos isolados do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	55
5.1.1	Amplificação dos genes rDNA 24 S $\alpha$ e citocromo oxidase subunidade II (COII).....	55
5.1.2	Genotipagem do gene SL-IR do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	58
5.2	Análises do polimorfismo de microssatélites.....	58
5.3	Análises filogenéticas dos isolados do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	68
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	77
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	91
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	94
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b> .....	110



## 1 E 2. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das questões atuais mais intrigantes na doença de Chagas se relaciona ao possível papel da diversidade genética de populações do *Trypanosoma cruzi* na determinação das diferentes formas clínicas da doença. Há quase 100 anos, desde a descoberta da enfermidade, pouco se conhece sobre os fatores determinantes das manifestações clínicas; e mesmo a existência de um papel relevante da persistência do parasito no indivíduo infectado já foi questionada, valorizando os mecanismos de auto-imunidade como os principais responsáveis pela doença (CUNHA-NETO *et al.*, 1995; SCHMUÑIS, 1987; TARLETON, 2001).

Os mecanismos pelos quais as diferentes formas clínicas da doença se estabelecem ainda não se encontram totalmente esclarecidos. Certamente, os fatores associados aos pacientes estão envolvidos, mas está cada vez mais evidente a existência de um papel fundamental associado aos aspectos genéticos do parasito. Apesar de existir um número elevado de marcadores moleculares disponíveis para a análise de parasitos e da diversidade genética exibida pelo *T. cruzi*, ainda não foi possível estabelecer uma correlação segura entre a variabilidade genética desse parasito e as características clínicas da doença de Chagas (ANDRADE *et al.*, 1999; BAPTISTA *et al.*, 2006; D'ÁVILA *et al.*, 2006; VAGO *et al.*, 1996a, VAGO *et al.*, 1996b, VAGO *et al.*, 2000).

A maioria das técnicas usadas para a genotipagem do *T. cruzi* requer o isolamento do parasito do sangue do paciente e a manutenção do mesmo em cultura acelular, o que poderia selecionar ou mesmo eliminar clones, de forma que as populações de parasitos disponíveis para as análises podem diferir daquelas presentes no sangue e/ou daquelas que estejam causando as lesões teciduais e, provavelmente, as manifestações clínicas (CARNEIRO *et al.*, 1990, DEANE *et al.*, 1984; ROMANHA *et al.*, 1979).

Sabe-se que algumas cepas do *T. cruzi* são constituídas por um conjunto de subpopulações ou clones geneticamente distintos que podem apresentar tropismo para diferentes tecidos (MACEDO *et al.*, 2004). Dessa forma, um fator importante na determinação da evolução clínica da doença parece estar relacionado aos diferentes clones e a seu tropismo específico. Nesse contexto, Macedo & Pena (1998) propuseram o modelo histotrópico clonal do *T. cruzi*, no qual clones geneticamente distintos apresentam propriedades biológicas diferentes, as quais podem determinar um tropismo tecidual diferencial, sendo este considerado um dos fatores responsáveis pelas diferentes manifestações clínicas da doença.

Vago *et al.* (1996a, 1996b e 2000) avaliaram o tropismo tecidual por meio da técnica de LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer-PCR*) diretamente de tecidos de animais e

humanos, caracterizando a porção variável de 330pb do kDNA do *T. cruzi*. A caracterização das populações do *T. cruzi* presentes nos tecidos cardíacos e esofageanos demonstraram diferentes perfis de assinaturas gênicas. Esses dados sugeriram que a variabilidade genética do parasito pode determinar tropismos diferentes com conseqüente impacto na evolução das diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Sendo assim, alguns pesquisadores enfatizam a necessidade da genotipagem do *T. cruzi* diretamente do sangue ou tecido infectado, principalmente porque estão disponíveis diferentes marcadores moleculares com sensibilidade suficiente para serem utilizados nesse tipo de estudo (FREITAS *et al.*, 2005; VAGO *et al.*, 2000; VALADARES *et al.*, 2008).

Todavia, deve-se observar em quais situações essas análises realizadas diretamente em tecidos de pacientes seriam eticamente recomendadas e adequadas, pois, diante das dificuldades éticas e operacionais com a obtenção de tecidos de diferentes órgãos humanos, o universo dessas amostras para este tipo de análise será sempre reduzido. Além do mais, Lages-Silva (2001) encontrou identidade entre os perfis de LSSP-PCR nas populações do *T. cruzi* presentes no tecido, sangue e seus isolados de pacientes chagásicos com a forma cardiodigestiva. Em geral, foi encontrada uma intensa homogeneidade entre as populações do *T. cruzi* obtidas de um mesmo paciente. Portanto, a caracterização genética do kDNA do *T. cruzi*, diretamente no tecido, sangue e seus isolados por hemocultura e/ou xenodiagnóstico, não evidenciaram padrões de assinaturas gênicas definidos que pudessem ser associados com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas humana e, sugerindo ainda, que não houve seleção de subpopulações do *T. cruzi* pela manutenção no meio de cultura. Este dado é importante, uma vez que em várias ocasiões o parasito só pode ser recuperado do sangue do paciente por meio das técnicas de hemocultura ou xenodiagnóstico (LAGES-SILVA, 2001).

De fato, para a análise da caracterização genética do *T. cruzi* associada aos diferentes quadros clínicos, é importante considerar que alguns pacientes podem estar infectados com mais de uma população do parasito e que amostras de tecido e sangue ou isolados do *T. cruzi* podem não representar todos os clones de uma cepa. Outro aspecto relevante está relacionado com a baixa parasitemia na fase crônica, uma vez que diferentes subpopulações que apresentam tropismo diferenciado podem não ser detectadas no momento do isolamento do parasito (LAGES-SILVA *et al.*, 2006). Assim, a análise de diferentes amostras isoladas de um mesmo paciente em diferentes períodos de tempo aumenta substancialmente as chances de detecção das populações que interagem com o organismo humano. É importante considerar, também, que alguns pacientes podem ter sido infectados por apenas uma população do *T. cruzi* e, desse modo, a população isolada do sangue do paciente é a mesma presente no tecido,

ou seja, associada à manifestação clínica da doença. A detecção do parasito ao longo da infecção é importante não somente para demonstrar sua presença, como também para caracterizá-lo, uma vez que já é bem estabelecido que o *T. cruzi* apresenta uma grande variabilidade genética que pode estar correlacionada às formas clínicas da doença de Chagas.

De acordo com o exposto acima, continua sendo importante a caracterização do parasito proveniente da corrente sanguínea, isso devido à possibilidade de que diferentes subpopulações possam ser isoladas em momentos diferentes, o que possibilita a análise da constituição populacional dos isolados, a comparação entre as populações isoladas no decorrer do tempo e o papel desse parasito na patogênese da doença de Chagas. Um exemplo digno de ser comentado são as duas populações do *T. cruzi* isoladas da primeira paciente examinada por Carlos Chagas, Berenice-62 e Berenice-78 (LANA, 1981; SALGADO *et al.*, 1962). Estudos iniciais realizados por Lana & Chiari (1986) já apontavam diferenças marcantes de seu comportamento em camundongos e em cultura acelular. Então, como explicar essas diferenças de comportamento, sendo que os parasitos foram isolados da mesma paciente? Posteriormente foi esclarecido que a cepa Berenice é constituída por diferentes subpopulações do parasito (VALADARES, 2007; VELOSO *et al.*, 2005).

Considerando a diversidade genética do *T. cruzi*, uma caracterização molecular criteriosa das populações que circulam na natureza é de fundamental importância para entender o papel que diferentes amostras do parasito desempenham na patogênese da doença, distribuição geográfica e nos diferentes índices de cura após a terapêutica específica. E ainda, diante da complexidade da doença de Chagas na fase crônica e da existência de milhões de chagásicos na América Latina, torna-se fundamental investir em estudos de polimorfismo de populações naturais do *T. cruzi*.

Nossa proposta foi realizar um amplo estudo epidemiológico molecular entre populações do *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos na fase crônica procedentes dos estados de Minas Gerais e Goiás. A utilização de um número mais elevado de amostras do *T. cruzi* recém isoladas por uma mesma técnica, a hemocultura, e pouco manipuladas em laboratório, além de, o estudo de diferentes marcadores genéticos com diferentes taxas de evolução molecular: região 3' do gene rDNA ribossomal 24S $\alpha$ , espaçador intergênico dos genes de mini-exon (SL-IR), polimorfismo de microssatélites e do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (COII), permitiram uma abordagem mais refinada tanto na tipagem das amostras como na análise filogenética das mesmas. Este estudo teve por finalidade analisar o perfil genético dos isolados do *T. cruzi* procedentes dos dois estados e, ainda, comparar esse perfil entre os isolados do parasito obtidos de um mesmo paciente em

diferentes períodos de tempo para compreender melhor a dinâmica populacional desse parasito durante a fase crônica da doença de Chagas, que é de evolução lenta e de longa duração.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A infecção humana pelo *T. cruzi* é endêmica exclusivamente nos países das Américas Central e do Sul e primeiramente associada à existência natural do inseto transmissor. Apesar das conquistas relacionadas ao incansável mecanismo de controle da doença de Chagas empregado nas últimas décadas, dados recentes mostram que aproximadamente 10 milhões de indivíduos encontram-se infectados, (SCHOFIELD *et al.*, 2006) e cerca de 25% deles apresentam sintomas da doença que podem estar associados à população do parasito, ao indivíduo infectado e à duração da infecção. Estima-se ainda que em 25-30% dos pacientes chagásicos crônicos ocorra uma considerável morbidade, uma vez que eles podem sofrer danos cardíacos e/ou lesões do trato digestivo irreversíveis, resultando em 14.000 mortes por ano (WHO, 2005). Devido à contínua imigração de indivíduos infectados procedentes de países endêmicos, hoje, a doença de Chagas também é problema de saúde nos EUA e na Europa (SCHOFIELD *et al.*, 2006).

A doença de Chagas humana era basicamente uma endemia rural, atingindo populações de baixo nível sócio-econômico e cultural, vivendo em casebres de má qualidade, onde algumas das espécies de triatomíneos se domiciliaram com relativa facilidade. Atualmente, a transmissão da doença se encontra em diferentes estágios de progressão, segundo o país e/ou região, sendo sua frequência relacionada com o nível econômico da população e com a natureza domiciliar do vetor (MONCAYO, 1999, 2003). Além de a transmissão natural, outra via importante de transmissão do *T. cruzi* é a transfusional, que contribui para a disseminação da doença de Chagas urbana, principalmente onde a transmissão pelos triatomíneos foi controlada por meio de um intenso e contínuo programa de saúde pública (MONCAYO, 1999; MONCAYO, 2003).

A transmissão transplacentária ou congênita, terceira em importância, ocorre devido à colonização da placenta pelo parasito, cuja incidência é variável de região para região. No Brasil, por exemplo, varia de 1% dos casos, enquanto que Argentina, Bolívia, Chile e Paraguai varia de 4-12%. Observa-se que a transmissão transplacentária parece depender de fatores ligados ao hospedeiro e ao parasito (PRATA, 2001; WHO, 1991; WHO, 2005). A prevenção neste sentido deve ser realizada com diagnóstico precoce e tratamento específico

das mães que pretendem engravidar e das crianças infectadas, o que depende de decisão política e infra-estrutura para o acompanhamento clínico em um programa de saúde pública. Em uma frequência menor, a infecção também pode ocorrer por transplantes de órgãos, de acidentes laboratoriais ou pela ingestão de alimentos contaminados (COURA *et al.*, 2002; DIAS, 2006).

Em condições naturais, o *T. cruzi* alterna seu ciclo de vida entre um hospedeiro invertebrado, correspondendo a hemípteros da família Reduviidae, subfamília Triatominae, e um hospedeiro vertebrado (mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes ordens), dentre eles o homem (CHAGAS, 1909; ZELEDON & RABINOVICH, 1981). Durante o ciclo, o *T. cruzi* passa por diferentes estágios de desenvolvimento em cada um dos hospedeiros, tais como formas epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicos nos vetores invertebrados (hematófagos) e formas amastigotas intracelulares replicativas e tripomastigotas na corrente sanguínea dos mamíferos. O aumento dessas formas circulantes e de células parasitadas pode levar à morte do hospedeiro e/ou, como ocorre na grande maioria dos pacientes, instala-se uma resposta imune, que controla gradativamente a proliferação parasitária.

A infecção chagásica humana inicia-se com uma fase aguda de intensidade e duração variáveis, ocorrendo exacerbada multiplicação parasitária, que pode desencadear manifestações clínicas como febre, aumento do volume dos linfonodos, mal estar, hepatomegalia, náusea, anorexia. Porém, a grande maioria dos indivíduos não apresenta sintomatologia. Nessa fase, os parasitos são facilmente detectáveis ao exame direto do sangue num período de um a dois meses (revisado por TEIXEIRA *et al.*, 2006b). Outra característica importante e que deve ser observada é a porta de entrada do parasito, que pode ser evidenciada por um processo inflamatório inespecífico identificado como chagoma de inoculação (lesão nodular da pele, consequência de uma reação inflamatória local) ou sinal de Romaña (manifestação típica da infecção via ocular com edema bi-palpebral unilateral e enfartamento ganglionar). Algumas crianças e menos frequentemente adultos desenvolvem sintomas mais graves (manifestações cardíacas, digestivas ou neurológicas) com taxa de mortalidade entre 10 e 15% em determinadas regiões, o que parece depender, pelo menos em parte, da cepa do parasito (revisado por TEIXEIRA *et al.*, 2006b).

A maioria dos indivíduos sobrevive à fase aguda e evolui para a fase crônica, permanecendo infectados por toda a vida. A fase crônica da doença de Chagas pode ser assintomática ou apresentar manifestações cardíacas, digestivas ou neurológicas, dependendo da localização e intensidade das lesões. A forma indeterminada representa aproximadamente

60-70% dos casos, e os pacientes podem permanecer sem qualquer manifestação clínica durante toda a vida ou evoluírem para formas clínicas definidas. Aproximadamente 10-40% dos indivíduos infectados evoluem para a cardiopatia chagásica crônica, que é a principal manifestação clínica da doença de Chagas com prognóstico e evolução variáveis. As síndromes digestivas são representadas pelas alterações funcionais do intestino e esôfago com prevalência de aproximadamente 10% dos casos. A forma cardio-digestiva é a menos freqüente, com cerca de 2% dos casos (COURA *et al.*, 1983; CUNHA-NETO *et al.*, 1995).

As formas clínicas apresentam características regionais distintas; em alguns países como o Panamá e a Venezuela, a infecção chagásica se manifesta exclusivamente na forma cardíaca. No Brasil, Argentina e Chile, as manifestações clínicas são bastante variadas (COURA *et al.*, 1983; GUEVARA *et al.*, 1977; MIJAREZ, 1965; MINOPRIO, 1966). Na Bahia predomina a forma cardíaca, em Goiás a forma digestiva, no estado de Minas Gerais observa-se uma elevada freqüência de formas mistas (cardio-digestiva), no Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro a maioria dos pacientes chagásicos são indeterminados (COURA *et al.*, 1983). A razão para essa heterogeneidade geográfica e o motivo pelo qual diferentes pacientes apresentam formas clínicas variáveis permanecem desconhecidos, mas, muito provavelmente, são determinados pela variação genética do *T. cruzi*; todavia, não podemos descartar aspectos relacionados ao hospedeiro.

A maior parte dos parasitos isolados do sangue periférico e tecidos de indivíduos infectados na fase crônica da doença de Chagas de vários estados do Brasil está associada à linhagem *T. cruzi* II e, portanto, associada à patogenia da doença humana (FREITAS *et al.*, 2005; LAGES-SILVA *et al.*, 2006; ZINGALES *et al.*, 1998). Por outro lado, há evidências de que cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* I podem causar a doença de Chagas em humanos (AÑEZ *et al.*, 2004; COURA *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2006a), principalmente no norte da América do Sul e Amazônia brasileira, onde a doença de Chagas tem sido considerada uma doença emergente. Nessas regiões ocorreram micro-epidemias, provavelmente causadas por contaminações orais, resultando em casos agudos severos da doença e em alguns fatais (COURA *et al.*, 2002).

O estudo das características fenotípicas e genotípicas do parasito tem avançado na última década, mas ainda não foi possível correlacionar os dados obtidos com os aspectos clínicos da doença de Chagas e a susceptibilidade aos quimioterápicos. A triagem de vários compostos contra o *T. cruzi* tem demonstrado que a maioria deles suprimem a parasitemia, reduz a mortalidade, mas apenas os derivados nitroheterocíclicos têm ação curativa e vêm sendo usados no tratamento da doença de Chagas humana (BRENER, 1984; CANÇADO,

1985; FILARDI & BRENER, 1987). Esses compostos previnem a letalidade, diminuem o período de infecção e são capazes de curar cerca de 50-60% dos pacientes na fase aguda. Contudo, as diferentes cepas do *T. cruzi* apresentam susceptibilidade ou resistência natural ao benznidazol e/ou nifurtimox, e ainda não estão disponíveis marcadores fenotípicos e genotípicos para resistência a drogas no caso do *T. cruzi* (ANDRADE *et al.*, 2008; FERREIRA, 1990; FILARDI & BRENER, 1987; MURTA *et al.*, 1998, 2008).

## 2.2 O genoma do *Trypanosoma cruzi*

### 2.2.1 O genoma nuclear

Como ocorre com os eucariotos, o *T. cruzi* apresenta dois genomas distintos, situados em dois compartimentos celulares bem definidos: o núcleo e a mitocôndria. O conteúdo de DNA total (nuclear e mitocondrial) em *T. cruzi* por célula varia de 125-330fg (fentogramas), incluindo o DNA do cinetoplasto responsável por 16-30% do DNA total. A existência de um intenso polimorfismo cromossômico tanto em número quanto em tamanho entre cepas e clones de *T. cruzi* pode estar relacionada às elevadas variações de conteúdo do DNA (CASTRO *et al.*, 1981; DVORAK *et al.*, 1982; HENRIKSSON *et al.*, 1996; McDANIEL & DVORAK, 1993).

Uma das particularidades observadas em *T. cruzi* e nos demais tripanossomatídeos é que seus cromossomos não se condensam durante a divisão celular, o que dificulta a análise pelos métodos convencionais de citogenética. Somente pela técnica de eletroforese em campo pulsátil ou PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*) é que foi possível a identificação de 20 bandas cromossômicas na faixa de 0,3-4Mb (megabase) para o clone CL Brener (PORCILE *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 1997). Ainda foi observado que a intensidade das bandas cromossômicas coradas com brometo de etídio varia bastante, sugerindo que algumas dessas bandas apresentam co-migração de mais de um cromossomo, que pode corresponder tanto a cromossomos homólogos quanto a cromossomos heterólogos de tamanho equivalente. Essa característica propõe que o número de cromossomos pode ser muito superior a 20 (BRANCHE *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 1997).

A ploidia do *T. cruzi* foi por muitos anos objeto de discussão e controvérsia por diferentes razões: (i) não se conhecem formas sexuadas do parasito, dificultando a análise e isolamento de recombinantes; (ii) a divisão binária impede a distinção entre os processos de fusão e divisão celulares. Apesar dessas limitações, evidências obtidas com métodos indiretos sugerem que o *T. cruzi* seja diplóide para a maior parte de seus cromossomos, característica recentemente confirmada com o advento do projeto genoma (EL-SAYED *et al.*, 2005). Várias

evidências suportam essa idéia, tais como o padrão de distribuição de várias isoenzimas do parasito ser típico de um organismo diplóide (TIBAYRENC *et al.*, 1986; TIBAYRENC, 1995); hibridização de vários marcadores genéticos com duas bandas cromossômicas, sugerindo a existência de dois alelos localizados em cromossomos homólogos de tamanhos distintos (GIBSON & MILES, 1986; HENRIKSSON *et al.*, 1990); medidas quantitativas de DNA por cinética de renaturação e microfluorimetria (BORST *et al.*, 1982). No entanto, existem estudos que sugerem a existência de cromossomos aneuplóides e/ou poliplóides no genoma de *T. cruzi* (CAMPETELLA *et al.*, 1992; HENRIKSSON *et al.*, 1996).

### 2.2.2 O genoma mitocondrial

O *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, e os membros dessa ordem são caracterizados pela presença de uma estrutura denominada cinetoplasto, contido na única mitocôndria do parasito. O cinetoplasto apresenta um genoma próprio, o que caracteriza o genoma extranuclear do parasito conhecido como kDNA (DNA do cinetoplasto). O kDNA do *T. cruzi* está organizado em uma rede complexa de moléculas circulares concatenadas, denominadas de maxicírculo e minicírculo, que diferem em tamanho e função. A concentração de DNA encontrada em um cinetoplasto pode representar cerca de 30% do DNA total da célula (JUNQUEIRA *et al.*, 2005; SIMPSON, 1987).

Os maxicírculos possuem cerca de 22.000pb (pares de bases) de tamanho, e o número de cópias por célula varia de 20-50. Os genes das proteínas mitocondriais (subunidades das enzimas NADH desidrogenase, citocromo oxidase, citocromo b, ATPases), além de alguns RNAs ribossomais, estão localizados na região conservada do maxicírculo. Por essa razão, os maxicírculos são os equivalentes funcionais do DNA mitocondrial de outros eucariotos (JUNQUEIRA *et al.*, 2005; SIMPSON, 1987). Uma característica importante do genoma dos maxicírculos, além de a presença de vários genes, é a falta de alguns elementos-chave para a sua tradução, como códons de iniciação ou janelas abertas de leitura descontínua, o que é resolvido pela adição e/ou remoção de uridinas após a transdução (SIMPSON, 1987; WESTENBERGER *et al.*, 2006). Recentemente foram publicadas as seqüências de DNA de maxicírculos do clone CL Brener e da cepa Esmeraldo. Foi demonstrado que as regiões codificantes dos maxicírculos das duas cepas apresentam pouca ou nenhuma variação de nucleotídeos apesar de apresentarem algumas inserções e/ou deleções cepa-específicas. Além das regiões codificantes, os maxicírculos de *T. cruzi* também apresentam regiões não codificantes com tamanhos variáveis de 4-6kb (kilobases) (WESTENBERGER *et al.*, 2006).

Ainda explorando o genoma mitocondrial, recentemente, Baptista *et al.* (2006) analisaram seis amostras do *T. cruzi* isoladas de três pacientes chagásicos crônicos cardíacos e três indeterminados. Esses autores demonstraram um aumento da expressão do gene NADH desidrogenase subunidade 7 (ND7) em cepas isoladas de pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas (amplificação de um fragmento de ~ 900pb) em relação às cepas isoladas de pacientes indeterminados (amplificação de um fragmento de ~ 500pb), sugerindo que a análise de marcadores diferencialmente expressos em *T. cruzi* poderia ser usada como prognóstico e contribuir para a compreensão da patogênese da doença de Chagas (BAPTISTA *et al.*, 2006). Entretanto, com o aumento do número de isolados do *T. cruzi* procedentes de pacientes cardíacos e indeterminados, a análise desse marcador destacou resultados incongruentes (comunicação pessoal), o que inviabiliza a utilização dessa metodologia para a associação do perfil genético do parasito (gene ND7 kDNA) com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Os minicírculos, por sua vez, possuem cerca de 1.400pb e estão presentes em torno de 10.000-20.000 cópias por célula. Cada molécula do minicírculo está organizada em quatro regiões distintas, de seqüências extremamente variáveis, intercaladas por quatro regiões de 120-160pb de seqüências bastante conservadas entre si e que estão dispostas em ângulo de 90° uma em relação à outra (DEGRAVE *et al.*, 1988). Essas regiões contêm a origem de replicação do DNA e são conservadas entre diferentes cepas de *T. cruzi*. As regiões variáveis (280-230pb) dos minicírculos está envolvida na formação de pequenos RNAs guias que controlam a especificidade do processo de edição (adição ou deleção de uridinas) do RNA mensageiro formado a partir dos maxicírculos (JUNQUEIRA *et al.*, 2005; STUART & FEAGIN, 1992). Os minicírculos são bastante variáveis entre as diferentes populações de *T. cruzi* e evoluem rapidamente, permitindo a diferenciação de cepas evolutivamente muito próximas (JUNQUEIRA *et al.*, 2005). Devido ao seu elevado número de cópias, os minicírculos do kDNA de *T. cruzi* têm sido utilizados como alvos preferenciais para o diagnóstico do parasito em indivíduos com a doença de Chagas (ÁVILA *et al.*, 1991; CASTRO *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 1998a; LAGES-SILVA *et al.*, 2001; MEIRA *et al.*, 2002).

### **2.3 Variabilidade intra-específica do *Trypanosoma cruzi***

A estrutura populacional do *T. cruzi* é clonal e heterogênea. Esse parasito pode apresentar populações multiclonais complexas, diferindo em suas características biológicas e no seu comportamento no hospedeiro vertebrado. A comparação genética entre várias cepas

indica um forte desequilíbrio de ligação quando diversos alelos são estudados. Isso implica que essa espécie apresenta uma evolução tipicamente clonal, na qual a reprodução sexuada é muito rara. Dessa forma, cada cepa estudada representa o resultado de um longo período de evolução independente, o que gera uma grande diversidade genética para a população. Conseqüentemente, conceitos básicos como espécie e cepa não são facilmente aplicáveis no caso desse parasito (MOREL *et al.*, 1986; TIBAYRENC *et al.*, 1986, 1990; TIBAYRENC & AYALA, 1991). Ainda assim, o termo cepa tem sido utilizado para designar um isolado do parasito obtido a partir de um hospedeiro vertebrado ou invertebrado, constituindo-se, sobretudo, em um conceito operacional útil para os pesquisadores, em vista da grande heterogeneidade observada entre os diferentes isolados de *T. cruzi*.

Atualmente sabe-se que o *T. cruzi* é uma espécie heterogênea constituída por um conjunto de populações de parasitos que circulam na natureza entre diversos hospedeiros vertebrados e invertebrados, silvestres e domésticos (MOREL *et al.*, 1986; ZINGALES *et al.*, 1998). Com base nos resultados encontrados utilizando diferentes abordagens biológicas, bioquímicas e genotípicas, diversos autores têm demonstrado variações intra-específicas de isolados de *T. cruzi* obtidos de diferentes hospedeiros e de áreas geográficas (ANDRADE 1985; CARNEIRO *et al.*, 1990, 1991; MACEDO & PENA, 1998; MILES *et al.*, 1977; MOREL *et al.*, 1980; STURM *et al.*, 1989).

### **2.3.1 Variabilidade biológica**

A caracterização biológica de diferentes cepas do parasito tem reforçado a heterogeneidade dessas populações no que se refere à morfologia, à taxa de crescimento, à virulência, ao tropismo tecidual, à suscetibilidade a drogas e à composição antigênica das mesmas. Todavia, um dimorfismo das formas tripomastigotas sangüíneas do *T. cruzi* (formas delgadas e largas do parasito) já havia sido relatado (CHAGAS, 1909), o que foi posteriormente confirmado por outros pesquisadores (BRENER, 1965; SILVA, 1959). Brener (1977) e Melo & Brener (1978) estudaram o tropismo tecidual em camundongos inoculados com diferentes cepas (Y, Berenice, ABC e CL) e demonstraram parasitismo preferencial para dois sistemas de células: fagocitárias do baço, fígado e medula óssea; e células musculares lisa, esquelética e cardíaca. Tais autores postularam que o tropismo poderia ser influenciado pela interação entre diferentes componentes da membrana ou receptores do parasito e da célula hospedeira.

Diversos estudos demonstraram que no sangue periférico de animais infectados com diferentes cepas do *T. cruzi* havia porcentagens diferentes de formas tripomastigotas delgadas,

largas e muito largas (BRENER & CHIARI, 1963; BRENER, 1965). Sabe-se que as formas tripomastigotas delgadas predominam em cepas de elevada virulência para animais experimentais. As formas delgadas apresentam macrofagotropismo, desenvolvem parasitemia precoce e são mais sensíveis à ação de anticorpos circulantes, enquanto as formas largas são mais frequentes em cepas miotrópicas e de baixa virulência em animais infectados experimentalmente (ANDRADE, 1974; BRENER & CHIARI, 1963; BRENER, 1965; BRENER, 1969). Com base nos aspectos morfológicos, nas curvas de parasitemia e no tropismo tecidual do *T. cruzi*, foi sugerida a classificação de cepas em dois tipos polares, devido às diferenças marcantes observadas entre as cepas Y e CL (BRENER, 1977).

Outro tipo de classificação biológica do *T. cruzi* foi proposta por Andrade (1974) e baseado em vários parâmetros, tais como picos de parasitemia, morfologia das formas sanguíneas, tropismo tecidual, taxa de mortalidade, predomínio das formas largas ou delgadas e lesões histopatológicas, considerando como cepas tipo I, II e III. Posteriormente, Andrade & Magalhães (1997) propuseram o termo biodema para agrupar as populações do *T. cruzi* que apresentavam padrões de comportamento biológicos semelhantes. O tipo I (biodema I), cujo protótipo é a cepa Y, é constituído por cepas que se multiplicam rapidamente, originando uma elevada parasitemia e, como consequência, a morte dos camundongos após o 7º e 12º dia da infecção com predomínio das formas delgadas e macrofagotropismo na fase inicial da infecção. As cepas do tipo II (biodema II) apresentam multiplicação relativamente lenta, com picos de parasitemia irregulares entre o 12º e 20º dia de infecção, podendo, nesse período, ocorrer elevado índice de mortalidade. Possui como protótipo a cepa São Felipe, que se revela com predomínio de formas largas e miocardiotropismo. O tipo III (biodema III), representado pela cepa Colombiana, possui predomínio das formas tripomastigotas largas, de lenta multiplicação, com picos de parasitemia tardios após o 20º e 30º dia de infecção; acomete principalmente a musculatura esquelética com baixo índice de mortalidade (DEVERA *et al.*, 2003). Essa heterogeneidade poderia contribuir com a variabilidade das manifestações clínicas da doença de Chagas e ainda as diferenças regionais de sua morbidade.

### **2.3.2 Variabilidade bioquímica**

A variabilidade fenotípica das populações do *T. cruzi* tem sido amplamente avaliada pela técnica de eletroforese de isoenzimas, que permite o agrupamento de diferentes cepas isoladas de humanos, animais domésticos, silvestres e vetores em grandes grupos denominados zimodemas (CARNEIRO *et al.*, 1991; LEWICKA *et al.*, 1995). A caracterização isoenzimática de isolados do *T. cruzi* procedentes da área rural no Brasil

demonstrou a existência de populações distintas do parasito circulando entre os ciclos de transmissão silvestres e domésticos, de maneira a indicar uma possível correlação entre o zimodema e o ciclo de transmissão (MILES *et al.*, 1977). O polimorfismo genético das cepas do *T. cruzi* em nível de proteínas foi proposto inicialmente por Toyé (1974), que demonstrou significativa variabilidade do *T. cruzi* por meio de isoenzimas e permitiu a identificação de três grupos ou zimodemas (Z1, Z2, Z3) por Miles *et al.* (1977) e em quatro (ZA, ZB, ZC, ZD) por Romanha (1982). Contudo, Tibayrenc & Ayala (1988), utilizando 15 marcadores enzimáticos e 121 cepas do *T. cruzi* procedentes de diferentes regiões geográficas das Américas do Norte e do Sul, distinguiram 43 zimodemas que foram separados em três grupos bastante heterogêneos. De acordo com a análise dos perfis de zimodemas, foi possível estabelecer importantes parâmetros sobre a estrutura genética das populações do *T. cruzi*. Tibayrenc *et al.* (1986) e Tibayrenc & Ayala (1988, 1991) sugeriram que o *T. cruzi* é um protozoário diplóide de estrutura e evolução clonal, com reprodução sexuada e recombinação meiótica rara ou ausente, e que os padrões de isoenzimas poderiam ser distribuídos aos alelos. Dessa forma, a análise de um maior número de *loci* ou marcadores enzimáticos permitiria identificar um variado número de zimodemas, possibilitando a diferenciação entre aqueles aparentemente idênticos.

A hipótese do modelo clonal de populações do *T. cruzi* (MACEDO & PENA, 1998; TIBAYRENC & AYALA, 1988; ZINGALES *et al.*, 1999) é reforçada pelo isolamento de zimodemas distintos em uma mesma região geográfica, circulando entre diferentes hospedeiros dos ciclos doméstico e silvestre e, ainda, pela identificação de um mesmo zimodema em diferentes regiões durante longos períodos de tempo. A ausência de reprodução sexuada regular e também de recombinação genética clássica seriam aspectos importantes para que um isolado do parasito evoluísse independentemente dos outros, já que não existe troca de material genético entre eles. Essa assexualidade poderia determinar a extinção da espécie. Entretanto, como sugerido por Miles *et al.* (1984) e Bogliolo *et al.* (1986), é de se esperar que em determinadas condições o *T. cruzi* apresente algum tipo de reprodução sexuada, ou como acontece com o *Trypanosoma brucei*, no qual as trocas genéticas ocorrem no hospedeiro invertebrado (JENNI, 1990; TAIT, 1980; 1983). Nos dias atuais, ainda se discute a presença ou ausência de troca do material genético dos protozoários, *T. cruzi* e *Leishmania*. Gaunt *et al.* (2003) produziram clones híbridos e mostraram que o *T. cruzi* possui a capacidade de realizar troca genética (*in vitro*), mesmo sendo um mecanismo não usual e diferente de o que ocorre no *T. brucei*. A seleção artificial de parasitos recombinantes resistentes a drogas foi demonstrada na fusão dos genótipos nucleares parentais com perda de

alelos e evidências de processos de recombinação homóloga. Em todos os casos, observou-se a ausência de fusão do DNA mitocondrial, sugerindo-se um modelo de recombinação no qual um dos parentais é o doador do material genético e o outro, receptor, que mantém o DNA do cinetoplasto (GAUNT *et al.*, 2003).

### 2.3.3 Variabilidade molecular

O *T. cruzi* exibe elevado grau de polimorfismo genético, tanto em nível do DNA nuclear quanto do cinetoplasto (kDNA). As técnicas moleculares empregadas no estudo da diversidade genética do *T. cruzi* permitem gerar marcadores genotípicos polimórficos capazes de confirmar a homogeneidade e/ou heterogeneidade do parasito (MACEDO *et al.*, 2001; OLIVE & BEAN, 1999).

A variabilidade do kDNA desse parasito foi demonstrada pela primeira vez por meio da análise de polimorfismo de tamanhos dos fragmentos de restrição do kDNA (*RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism*). Essa técnica foi capaz de gerar perfis de bandas cepa-específicos, que foram denominados esquizodemas, indicando diferentes graus de variabilidade intra-específica nas seqüências dos minicírculos do kDNA (MOREL *et al.*, 1980). Observou-se, ainda, uma grande heterogeneidade entre os padrões de RFLP das cepas do *T. cruzi*, de forma a mostrar que o número de esquizodemas é muito superior ao de zimodemas previamente estabelecidos e que, dentro de um mesmo zimodema, as cepas podem apresentar diferentes esquizodemas. Tal técnica foi posteriormente utilizada também para diferenciar populações mistas naturais ou artificiais do *T. cruzi* (DEANE *et al.*, 1984).

Outra técnica, a LSSP-PCR, é altamente sensível e capaz de revelar variações do genoma e detectar mutações simples ou múltiplas em um fragmento de DNA, produzindo um padrão eletroforético característico, também denominado assinatura gênica (PENA *et al.*, 1994). Outros autores utilizaram essa técnica para estudar a variabilidade genética do *T. cruzi* em tecidos de animais e humanos, caracterizando a porção variável de 330pb do kDNA dos minicírculos desse parasito, discriminando clones e cepas do *T. cruzi*. Com o perfil de bandas obtidas tornou-se possível a caracterização genética de parasitos provenientes de amostras de tecidos de animais e humanos (ANDRADE *et al.*, 1999; LAGES-SILVA *et al.*, 2006; VAGO *et al.*, 1996a, 1996b; VAGO *et al.*, 2000). Vago *et al.* (1996a, 1996b, 2000) mostraram também que, em alguns casos, a população do *T. cruzi* presente em diferentes órgãos de um mesmo paciente apresentaram assinaturas de kDNA distintos, sugerindo que diferentes cepas do parasito poderiam apresentar diferentes tropismos e, assim, desencadear manifestações clínicas variadas.

No DNA nuclear do *T. cruzi* também é observado um intenso polimorfismo, o qual pode ser detectado por meio de várias abordagens moleculares. A técnica da Impressão Digital de DNA, por exemplo, explora a variabilidade de elementos repetitivos do DNA correspondente aos mini-satélites hipervariáveis e pode diferenciar várias cepas e clones do parasito. A identificação de regiões múltiplas de mini-satélites no DNA nuclear do parasito gera padrões de bandas polimórficos, típicos e cepa-específicos, além de permitir uma boa correlação com os esquizodemas determinados para essas amostras (MACEDO *et al.*, 1992).

Com a crescente evolução da ferramenta molecular, diferentes metodologias baseadas na PCR (*Polymerase chain reaction*) surgiram e têm sido utilizadas para reforçar a variabilidade genética do *T. cruzi*. A técnica de RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*) propiciou uma alternativa de análise mais simples que a impressão digital, principalmente por necessitar de uma quantidade bem menor de DNA. Nesta, realiza-se uma amplificação de múltiplos fragmentos de DNA, empregando-se iniciadores de seqüências arbitrárias que se ligam em sítios dispersos do genoma, gerando padrões complexos de bandeamento, contendo produtos de DNA de tamanho e intensidade variáveis. A estrutura genômica de várias cepas do *T. cruzi* isoladas de humanos, triatomíneos e gambás e analisada por RAPD demonstra uma forte heterogeneidade e evidencia de que as cepas pertencentes aos zimodemas Z2 e ZB apresentam padrões mais polimórficos (FERNANDES *et al.*, 1997; STEINDEL *et al.*, 1993; TIBAYRENC *et al.*, 1993). Outros pesquisadores demonstraram que os perfis de RAPD de isolados do *T. cruzi* procedentes de pacientes chagásicos crônicos apresentam elevada homogeneidade (o que indica claramente a presença de um grupo geneticamente bem correlacionado) e/ou heterogeneidade, dificultando a associação da variabilidade genética do parasito com os aspectos clínicos da doença de Chagas e origem geográfica (D'ÁVILA *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 1998b; LAGES-SILVA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 1997).

Análises comparativas de seqüências do gene do RNA ribossômico (rRNA 24S $\alpha$ ) de *T. cruzi* com outros tripanossomatídeos mostraram uma elevada homologia entre as diferentes espécies avaliadas, exceto para uma região de aproximadamente 100pb na extremidade 3' do gene de *T. cruzi* (região divergente D7). Os iniciadores específicos desenhados para a amplificação dessa região variável foram capazes de demonstrar um polimorfismo de tamanho no produto de amplificação nas diferentes cepas analisadas, sendo possível classificá-las em dois grupos: grupo 1, fragmento de 125pb e grupo 2, fragmento de 110pb (SOUTO & ZINGALES, 1993). Com o aumento do número de amostras, foi observada a existência de um terceiro grupo de cepas que apresentava os dois fragmentos, sendo

denominado grupo 1/2 (SOUTO *et al.*, 1996). Posteriormente, Mendonça *et al.* (2002) e Pimenta (2002) observaram que algumas cepas classificadas como pertencentes ao zimodema 3 amplificavam um produto de PCR do gene rRNA 24S $\alpha$  de tamanho intermediário (117pb), o que pode corresponder a um novo grupo de rDNA.

A comparação dos genes de mini-exon de diferentes cepas de *T. cruzi* mostrou, inicialmente, a existência de dois alelos discretos, com elevada divergência de seqüência na região intergênica e um nível de similaridade entre eles menor que 59% (MURTHY *et al.*, 1992; SOUTO *et al.*, 1996). Uma PCR multiplex para a amplificação do espaçador não transcrito do gene mini-exon foi desenvolvida por Souto *et al.* (1996) utilizando três diferentes iniciadores, dois deles específicos para cada grupo, e o terceiro comum para ambos os grupos. Com essa metodologia, foi possível agrupar as cepas de *T. cruzi* em dois grupos de acordo com o tamanho do produto amplificado. As cepas que apresentaram um produto de 300pb foram designadas como pertencentes ao grupo 1, enquanto aquelas que apresentaram um produto de 350pb foram designadas como pertencentes ao grupo 2 (SOUTO *et al.*, 1996).

Souto *et al.* (1996) correlacionaram os produtos de PCR de seqüências gênicas do mini-exon e do RNA ribossomal do *T. cruzi* com a estrutura genômica utilizando a técnica de RAPD e demonstraram a existência clara de um polimorfismo entre isolados desse parasito, classificando-os em três grupos: Grupo 1 (rDNA/125pb e mini-exon/300pb); Grupo 2 (rDNA/110pb e mini-exon/350pb) e Grupo 1/2 (ambos produtos do rDNA com os do mini-exon do Grupo 1).

A heterogeneidade genética do taxon *T. cruzi* tem profunda significância biológica. O conjunto de características heterogêneas das populações do *T. cruzi*, juntamente aos hábitos alimentares dos insetos vetores, e o conjunto de hospedeiros vertebrados presentes em um determinado ambiente definem dois ciclos de transmissão do *T. cruzi*: o ciclo silvestre, que envolve principalmente marsupiais e pequenos roedores silvestres, e o ciclo doméstico, que acomete o homem e alguns outros mamíferos do ambiente peridomiciliar (WHO, 1991, 2005).

## **2.4 Linhagens principais do *Trypanosoma cruzi***

Diante do acúmulo de diferentes marcadores que indicavam o agrupamento de boa parte das cepas de *T. cruzi*, em abril de 1999, durante o Simpósio Internacional Comemorativo dos 90 anos da descoberta da Doença de Chagas, no Rio de Janeiro, a subdivisão da espécie *T. cruzi* em pelo menos duas linhagens filogenéticas principais foi reconhecida, sendo elas *T. cruzi* I, primariamente associadas ao ciclo silvestre de transmissão, e *T. cruzi* II, relacionadas ao ciclo doméstico (ANONYMOUS, 1999). As cepas caracterizadas como pertencentes ao

zimodema 3 (Z3) ou as que apresentam características híbridas (por exemplo, rDNA 1/2) não puderam ser classificadas nos grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANONYMOUS, 1999). Na mesma situação estão aquelas cepas que, por serem híbridas, apresentam incongruências entre as tipagens com diferentes marcadores moleculares.

As seguintes regras foram estabelecidas para essa nova nomenclatura (ANONYMOUS, 1999): (i) as cepas devem ser designadas como *T. cruzi* I quando forem equivalentes ao Zimodema 1 (BARRETT *et al.*, 1980; MILES *et al.*, 1977, 1978), Tipo III (ANDRADE, 1974), Linhagem 2 (SOUTO *et al.*, 1996), grupo 1 (TIBAYRENC, 1995), Ribodemas II/III (CLARK & PUNG, 1994) ou similar;

(ii) as cepas devem ser designadas como *T. cruzi* II quando forem equivalentes ao Zimodema 2 (BARRETT *et al.*, 1980; MILES *et al.*, 1977, 1978), Zimodema A (ROMANHA *et al.*, 1979), Tipo II (ANDRADE, 1974), Linhagem 1 (SOUTO *et al.*, 1996), Grupo 2 (TIBAYRENC, 1995), Ribodema I (CLARK & PUNG, 1994) ou similar;

(iii) as cepas que não foram previamente caracterizadas ou consideradas inconclusivas devem ser referidas como *T. cruzi* (sem a designação de grupo);

(iv) a designação de cepas aparentemente híbridas como as classificadas como Zimodema 2b Chileno (MILES *et al.*, 1984), Zimodema B (ROMANHA *et al.*, 1979), Tipo I (ANDRADE, 1974), Grupo 1/2 tipado pelo rDNA 24S $\alpha$  (SOUTO *et al.*, 1996), genótipo 39 (TIBAYRENC, 1995) será decidida após estudos adicionais, situação semelhante é observada para o Zimodema 3 (MILES *et al.*, 1978, 1980).

Apesar de a existência de duas linhagens principais no taxon *T. cruzi* (*T. cruzi* I e *T. cruzi* II) ser bem aceita, outras subdivisões foram propostas utilizando marcadores moleculares com diferentes taxas evolutivas na tentativa de obter uma classificação para as cepas que não foram previamente caracterizadas ou consideradas inconclusivas (AUGUSTO-PINTO *et al.*, 2003; BRISSE *et al.*, 2000, 2003; FREITAS *et al.*, 2006; MACHADO & AYALA, 2001).

Subseqüentemente utilizando-se análises de isoenzimas e RAPD, Brisse *et al.* (2000) propuseram a divisão do taxon *T. cruzi* em seis subdivisões ou DTUs (*Discret Taxonomic Units*) I, IIa, IIb, IIc, IId, IIe, sendo o DTU I correspondente à linhagem *T. cruzi* I e o DTU IIb correspondente à linhagem *T. cruzi* II. As sublinhagens IIa, IIc-e incluem as cepas híbridas e aquelas pertencentes ao zimodema 3. O DTU é definido como uma coleção de cepas que são geneticamente relacionadas e que são identificadas utilizando marcadores moleculares comuns. Cada uma dessas sublinhagens é representada por uma cepa de referência: SilvioX10 cl1 (I), CanIII cl1 (IIa), Esmeraldo cl3 (IIb), M5631 cl5 (IIc), MN cl2 (IId) e CL Brener (IIe).

Apesar de não ter sido oficialmente recomendada, esta nomenclatura vem sendo muito citada pela comunidade científica.

Augusto-Pinto *et al.* (2003) investigaram a existência de SNPs (polimorfismo de nucleotídeos únicos) no gene de reparo do DNA (TcMSH2) do *T. cruzi* e a possibilidade de eles estarem associados à variação na eficiência do sistema do reparo por erros de pareamento (*mismatch repair*-MMR) nessa espécie. De fato, esses autores demonstraram a existência de três grupos de seqüências diferentes, que denominaram MSH2A, MSH2B e MSH2C. A seqüência MSH2A foi encontrada em cepas da linhagem *T. cruzi* I, enquanto o MSH2C é típico de cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* II. O terceiro grupo apresentou um tipo de seqüência diferente para este gene MSH2B, sugerindo, então, a existência de pelo menos três linhagens distintas da espécie do *T. cruzi*. Outra metodologia, baseada na análise de RFLP do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (gene mitocondrial CO II presente no maxicírculo-kDNA) é utilizada para identificar o genótipo mitocondrial de cepas do *T. cruzi*, sendo capaz de identificar a existência de três grupos mitocondriais distintos denominados: haplogrupo A, C e B associado ao *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, *T. cruzi* III, respectivamente. Curiosamente, todas as cepas híbridas caracterizadas até o momento apresentam haplótipo mitocondrial B diferente daquele compartilhado pelas cepas pertencentes às linhagens *T. cruzi* I ou II. Esses achados sugerem que na história evolucionária da espécie *T. cruzi* houve poucos eventos de hibridização seguidos de diferenciação, ao invés de vários eventos recentes de hibridização entre clones do parasito (FREITAS *et al.*, 2006; MACHADO & AYALA, 2001).

Em relação à tipagem do DNA mitocondrial, o clone CL Brener, na verdade, é um bom exemplo da complexidade e da dificuldade em se determinar com exatidão a estrutura populacional e filogenética da espécie *T. cruzi*. Baseado nos marcadores de rDNA 24 S $\alpha$ , mini-exon e RAPD, esse clone foi associado à linhagem *T. cruzi* II (ANONYMOUS, 1999; SOUTO *et al.*, 1996). Dados na literatura sobre polimorfismo em outras regiões expressas ou não do genoma confirmaram que CL Brener é um clone híbrido (BRISSE *et al.*, 2000; CANO *et al.*, 1995; EL SAYED *et al.*, 2005) e resultante do evento de hibridização entre as linhagens *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (CRIBB *et al.*, 2004; ELIAS *et al.*, 2005), mas atualmente é reconhecido como híbrido, originado da fusão de amostras das linhagens *T. cruzi* II e *T. cruzi* III, também denominadas DTU I1b e I1c, respectivamente (FREITAS *et al.*, 2006; WESTENBERGER *et al.*, 2005).

As cepas com características híbridas têm sido alvo de constantes investigações, especialmente após a demonstração da capacidade de recombinação de células de *T. cruzi in vitro*. Usando a seleção artificial de parasitos recombinantes resistentes a drogas, foi

demonstrada a fusão dos genótipos nucleares parentais com perda de alelos e evidências de processos de recombinação homóloga. Em todos os casos observou-se a ausência de fusão do DNA mitocondrial, sugerindo um modelo de recombinação, no qual um dos parentais é o “doador” do material nuclear e o outro, o “receptor” que mantém o seu DNA do cinetoplasto (GAUNT *et al.*, 2003). É importante ressaltar que, apesar de ser capaz de recombinação *in vitro*, o *T. cruzi* se reproduz predominantemente por meio de divisão binária. Por consequência, o seu genótipo nuclear diplóide é transmitido “em blocos” para a prole, o que provavelmente resulta nos elevados níveis de desequilíbrio de ligação observado e na estrutura tipicamente clonal da população de parasitos (OLIVEIRA *et al.*, 1998; TIBAYRENC & AYALA, 1991; TIBAYRENC *et al.*, 2002). Apesar de a fusão de células do *T. cruzi* não ser um fenômeno comum, estudos baseados em análises de padrões de isoenzimas (BOGLIOLO *et al.*, 1996; CARRASCO *et al.*, 1996), RFLP de genes constitutivamente expressos (HIGO *et al.*, 2000), RAPD, análises de cariótipos (BRISSE *et al.*, 2003) e de análises de seqüências nucleares e mitocondriais (MACHADO & AYALA, 2001; STURM *et al.*, 2003; WESTENBERGER *et al.*, 2005) sugerem a existência de populações híbridas naturais.

Hipóteses diferentes foram propostas para explicar a origem das populações híbridas do *T. cruzi* (SOUTO *et al.*, 1996). Uma dessas hipóteses sugere a evolução independente dos genótipos 1 de rDNA (*T. cruzi* II) e 2 (*T. cruzi* I). A origem do grupo híbrido (rDNA 1/2) é explicada pela transferência eventual do gene de rDNA grupo 2 para organismos contendo o gene rDNA grupo 1. Dados de RAPD e mini-exon demonstraram que as cepas pertencentes ao grupo rDNA 1/2 apresentam uma estrutura genética mais relacionada às cepas do rDNA grupo 1 ou *T. cruzi* II (SOUTO *et al.*, 1996). A presença de organismos com genótipo de rDNA 2, porém mais relacionados a 1/2 poderia ser explicada por uma deleção subsequente do cistron do gene rDNA 1 de um grupo individual 1/2, originando um novo grupo de organismos com o cistron de rDNA 2; porém, com características semelhantes às cepas rDNA 1/2 (MACEDO *et al.*, 2001). Por outro lado, estudos *in vitro* de recombinação do *T. cruzi* indicam que o processo de fusão das células envolve perdas alélicas e recombinações, o que explica incongruências de marcadores nas populações híbridas naturais, como a presença de apenas um dos alelos parentais ou de alelos discrepantes (MACEDO *et al.*, 2004).

Westenberger *et al.* (2005, 2006) propuseram que, a partir de um genótipo ancestral, originaram-se dois descendentes, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, DTU's I e IIb, respectivamente. Os descendentes com esses genótipos hibridizaram subsequentemente para produzir DTU's IIa e IIc. Uma segunda hibridização entre as populações com DTU's IIb e IIc originaram as DTU's

IId e IJe. Esses autores sugeriram ainda que o grupo mitocondrial A e C está relacionado às cepas das linhagens *T. cruzi* I e II, respectivamente. O grupo mitocondrial B agrupa aquelas cepas classificadas como, DTU's IId, IIc, IId, e IJe (WESTENBERGER *et al.*, 2006).

Utilizando abordagens haplotípicas a partir de dados da genotipagem de cinco *loci* de microssatélites, da análise da região D7 do rDNA 24S $\alpha$  e do seqüenciamento dos genes mitocondriais COII, ND1 e CyB em 75 isolados do *T. cruzi* foi sugerida a existência de três linhagens ancestrais em *T. cruzi* denominadas: *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e *T. cruzi* III, correspondentes aos zimodemas 1, 2 e 3 e aos haplótipos A, C e B mitocondriais (FREITAS *et al.* (2006). Ainda segundo Freitas *et al.*, (2006), as cepas híbridas teriam se originado a partir de pelo menos dois eventos de hibridização entre membros das linhagens *T. cruzi* II e *T. cruzi* III, originando progênes viáveis do ponto de vista evolutivo. Em ambos os eventos, o DNA mitocondrial foi doado apenas pelas cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* III. Assim, todas as cepas com características híbridas (DTU IId e IJe) apresentam o mesmo haplótipo mitocondrial B, característico da linhagem *T. cruzi* III (DTU IIc). De fato, Gaunt *et al.* (2003) mostraram que a hibridização de cepas do *T. cruzi* envolve apenas o genoma nuclear sem fusão mitocondrial. Sendo assim, apenas uma das cepas parentais doa o DNA mitocondrial à progênie híbrida, de modo que o estudo do DNA mitocondrial pode ser muito útil para o entendimento das cepas híbridas naturais.

Os modelos propostos por Westenberger *et al.* (2006) e Freitas *et al.* (2006) para explicar a evolução da espécie *T. cruzi* apresentam pontos em comum e também divergentes. Em comum pode-se destacar a associação do grupo *T. cruzi* IId à linhagem *T. cruzi* II (ANONYMOUS, 1999) e das cepas *T. cruzi* IId e IJe ao grupo de cepas com características híbridas. Todavia, Freitas *et al.* (2006) consideraram as cepas IIc pertencentes a uma terceira linhagem ancestral, uma vez que foram encontradas características próprias nesse subgrupo, como a mitocôndria do tipo B, que não está presente na linhagem *T. cruzi* I e II. Entretanto, Westenberger *et al.* (2005, 2006) acreditam que a sub-linhagem IIc e IId são resultantes de um evento de hibridização mais recente entre as linhagens *T. cruzi* I e II, seguidos por um acúmulo de mutações.

## 2.5 Os microssatélites em *Trypanosoma cruzi*

A análise de microssatélite também denominado STR (*Short Tandem Repeats*) é uma técnica que tem como alvo a variabilidade genética do *T. cruzi* e baseia-se na amplificação por PCR de fragmentos de DNA contendo repetições curtas (1-6pb), dispersos no genoma dos eucariotos. Devido a sua abundância, dispersão no genoma e alto grau de polimorfismo de

tamanho, os microssatélites são considerados como poderosos marcadores genéticos, sendo amplamente utilizados em análises de parentesco, construção de mapas genéticos de alta densidade e estudos filogenéticos e populacionais (GOLDSTEIN & POLLOCK, 1997; KNAPICK *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Os microssatélites são classificados quanto ao tamanho da sua repetição, sendo denominados mononucleotídeos, di, tri, tetra, penta e hexa, para repetições de um, dois, três, quatro, cinco ou seis pares de bases, respectivamente. Eles também podem ser classificados quanto à estrutura da repetição, sendo denominados como perfeitos, quando existe um motivo único de repetição, sem interrupções; imperfeitos, quando existem bases diferentes intercalando a repetição; e compostos quando mais de duas repetições perfeitas ou imperfeitas estão separadas por no máximo 3pb (WEBER, 1990).

O alto grau de polimorfismo encontrado nos microssatélites é resultante da variação no número de repetições de um alelo para outro (LITT & LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; WEBER & MAY, 1989). As taxas de mutação para a maioria dos *loci* de microssatélites são usualmente de várias ordens de magnitude maiores que as taxas de mutação para outros *loci* dentro do mesmo genoma, que são na ordem de  $10^{-9}$  a  $10^{-10}$ ; *in vivo* tem sido calculada em  $10^{-2}$  por *locus* por replicação em *Escherichia coli* (LEVINSON & GUTMAN, 1987a) e cerca de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  em leveduras (HENDERSON & PETES, 1992). Enquanto a evolução do DNA de cópia única é devida, principalmente, ao acúmulo de substituições de bases, o mecanismo predominante de mutação de microssatélites é a derrapagem da DNA polimerase (SCHLÖTTERER, 2000). Durante o processo de replicação do DNA, as duas fitas podem deslizar (*slippage*) uma sobre a outra, formando bolhas de DNA não-pareado. Muitas dessas bolhas são corrigidas pelo sistema de reparo de erros, mas uma pequena proporção de bolhas não reparadas resulta no ganho ou na perda de uma unidade repetitiva (ELLEGEN, 2004; LEVINSON & GUTMAN, 1987b).

Os primeiros microssatélites do *T. cruzi* foram descritos por Oliveira *et al.* (1998). Esses autores, analisaram o grau de polimorfismo de oito *loci* de microssatélites em diferentes amostras do *T. cruzi* e demonstraram que são marcadores com um elevado poder de resolução, uma vez que não foi observada a repetição de um único genótipo multilocal com a análise dessas repetições em um total de 26 amostras (OLIVEIRA *et al.*, 1998) e de 131 amostras do *T. cruzi* (PIMENTA *et al.*, 2002). Dentre as amostras analisadas, a maior parte apresentou um único pico (homozigose) ou dois picos de tamanhos diferentes (heterozigose) para todos os *loci* de microssatélites, o que enfatiza, mais uma vez, a estrutura diplóide do genoma do *T. cruzi* (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Entretanto, algumas amostras apresentaram

mais de dois alelos para um determinado *locus* de microssatélites, sugerindo que estas seriam aneuplóides ou então que elas seriam constituídas de mais de uma subpopulação do parasito, apresentando alelos diferentes para esse *locus*, ou seja, seriam multiclonais. As amostras que apresentaram mais de dois alelos foram, na sua grande maioria, aquelas isoladas de reservatórios e vetores silvestres, ou de pacientes chagásicos na fase aguda da doença. Essas amostras correspondem, justamente, àquelas que apresentaram alto grau de variabilidade genética identificada pelas técnicas de RAPD e SSR-PCR (OLIVEIRA *et al.*, 1997), indicando que o grau de variabilidade genética observada nessas amostras pode estar intimamente relacionado com uma possível constituição multiclonal de algumas populações do *T. cruzi*.

Os microssatélites também foram utilizados para averiguar as relações filogenéticas entre isolados do *T. cruzi*. Primeiramente, 54 amostras do parasito foram analisadas pela abordagem de parcimônia, de acordo com modelo de mutação passo a passo. Utilizando uma distância genética baseada no número de mutações necessárias para uma cepa se transformar em outra, foi construída uma rede de Wagner que permitiu a separação das cepas do grupo 2 para o gene rRNA 24S $\alpha$  das cepas do grupo 1 e 1/2 (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Mais recentemente, Freitas *et al.* (2006) analisaram 75 amostras do *T. cruzi* e construíram um gráfico de escala multidimensional, mostrando claramente o agrupamento das cepas do *T. cruzi* em quatro grupos bem definidos: MDS A (correspondente à linhagem *T. cruzi* I), MDS C (linhagem *T. cruzi* II), MDS B (linhagem *T. cruzi* III) e MDS BH (cepas híbridas).

As amostras do *T. cruzi* são usualmente obtidas pela cultura de parasitos isolados de triatomíneos ou hospedeiros mamíferos. Os indivíduos que vivem em áreas endêmicas podem ser infectados por vários contatos com diferentes triatomíneos e estes, por sua vez, podem se alimentar de vários indivíduos infectados. Esta característica propicia a formação de populações multiclonais em hospedeiros e vetores, favorecendo o isolamento dessas populações quando cultivadas (MACEDO & PENA, 1998). Sendo assim, a tipagem genética por microssatélites em consequência de seu elevado polimorfismo representa uma técnica rápida, reprodutiva e sensível, adequada ao estudo da dinâmica da estrutura populacional do *T. cruzi* e, ainda, pode indicar se uma cepa é formada por uma população mono ou multiclonal (MACEDO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 1997, 1998; VALADARES *et al.*, 2008). Além disso, os microssatélites são marcadores unilocais, o que nos permite determinar exatamente os alelos presentes em uma cepa e fazer inferências populacionais muito mais precisas do que outros marcadores aleatórios, tais como RAPD e SSR-PCR (OLIVEIRA *et al.*, 1997).

De acordo com o exposto acima, a amplificação de microssatélites é uma excelente ferramenta para estudos moleculares do *T. cruzi*, uma vez que é capaz de caracterizar as diferentes subpopulações desse parasito que formam as cepas naturalmente policlonais e responsáveis pela doença de Chagas. Em nosso trabalho, analisamos o polimorfismo de nove *loci* de microssatélites, constituídos por repetições de dinucleotídeos SCLE10, SCLE11, MCLF10, MCLG10, MCLE01 (OLIVEIRA *et al.*, 1998); trinucleotídeos e tetranucleotídeos TcATT14, TcAAT8, TcTAT20, TcAAAT6 (VALADARES *et al.*, 2008) para a análise da estrutura populacional do *T. cruzi*, e ainda uma comparação entre as populações isoladas de um mesmo paciente em diferentes períodos de tempo. Essa metodologia abre nova perspectiva para a compreensão da dinâmica populacional do *T. cruzi* durante a fase crônica da doença de Chagas, além de estudos populacionais que nos permitirá entender, cada vez melhor, o papel que diferentes amostras do parasito desempenham na patogênese da doença, distribuição geográfica e nos diferentes índices de cura após a terapêutica específica.



### 3. OBJETIVOS

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Analisar a diversidade genética e a dinâmica populacional de amostras do *Trypanosoma cruzi* recém-isoladas de pacientes chagásicos crônicos de diferentes regiões dos estados de Minas Gerais e Goiás, empregando marcadores genéticos com diferentes taxas evolutivas.

#### 3.2 Objetivos específicos

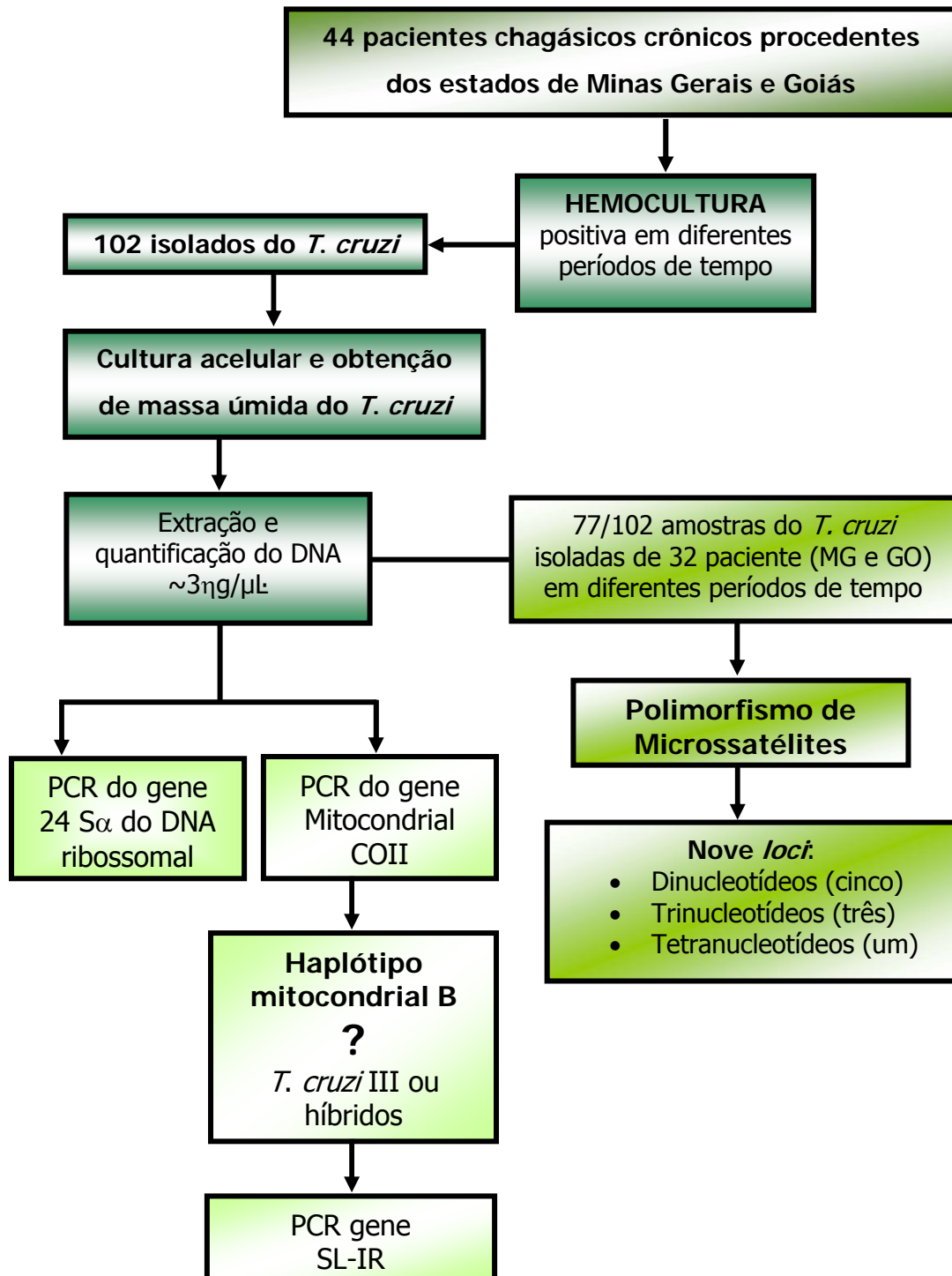
- ❖ Avaliar a diversidade genética das amostras do *Trypanosoma cruzi* por meio da tipagem com marcadores nucleares: rDNA 24S $\alpha$ , SL-IR e microssatélites e do gene mitocondrial COII (kDNA).
- ❖ Comparar os padrões da diversidade genética, possivelmente encontrada nos isolados do parasito procedentes dos dois estados.
- ❖ Analisar a estrutura populacional e evolutiva das amostras do *Trypanosoma cruzi* utilizando o polimorfismo de microssatélites.
- ❖ Analisar e comparar o perfil de microssatélites entre amostras do *Trypanosoma cruzi* isoladas de um mesmo paciente em diferentes períodos de tempo, incluindo amostras isoladas de um mesmo paciente antes e após o tratamento específico.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental



#### 4.2 Pacientes e amostras do *Trypanosoma cruzi*

Foram estudados 44 pacientes chagásicos crônicos procedentes de diferentes regiões endêmicas dos estados de Minas Gerais (MG) e Goiás (GO). De cada paciente, foi obtido mais de um isolado do parasito em diferentes períodos de tempo, sendo 19 amostras isoladas de nove pacientes de GO e 83 isoladas de 35 pacientes de MG, totalizando 102 amostras do *T. cruzi*. Todas as amostras foram previamente isoladas e mantidas criopreservadas a  $-196^{\circ}\text{C}$  no laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG.

Esse grupo de pacientes faz parte de um amplo projeto sobre “Avaliação clínica, parasitológica, imunológica antes e após o tratamento específico da doença de Chagas humana”, incluindo o sub-projeto “Avaliação de métodos laboratoriais para o estabelecimento de critério de cura da doença de Chagas humana” desenvolvido no Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, ICB/UFMG desde 1997. Esse projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética N° 087/99 da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG e do Hospital São Salvador, Goiânia, GO.

Vinte e sete pacientes (61%) apresentam a forma indeterminada da doença de Chagas (FI) e 17 (39%) apresentam manifestações cardíacas (FC). A idade desses pacientes variou de 20 a 75 anos (média de 40 anos, desvio padrão  $\pm 11,49$  anos). Avaliando-se a distribuição das formas clínicas segundo a idade, foi observada uma variação da idade de 25 a 59 anos entre os pacientes portadores da FC (média de 44 anos, desvio padrão  $\pm 10,4$ ). A média da idade para os portadores da FI foi de 38 (desvio padrão  $\pm 11,6$ ), variando de 20 a 75 anos. Dos 44 pacientes que fizeram parte desse estudo, 16 (36%) foram tratados, e seis (37,5%) positivaram a hemocultura após a terapêutica específica. Nos demais pacientes, as hemoculturas foram negativas, variando em número de duas a cinco repetições.

O local onde os pacientes viveram a infância ou a primeira área endêmica onde permaneceram por mais de um ano foi considerado a origem geográfica dos isolados do *T. cruzi* (FIG. 1). Os dados relacionados a procedência, sexo, idade, data e positividade de tubos por hemocultura, formas clínicas e data do tratamento específico de alguns pacientes estão demonstrados na TAB. 1 (ANEXO).

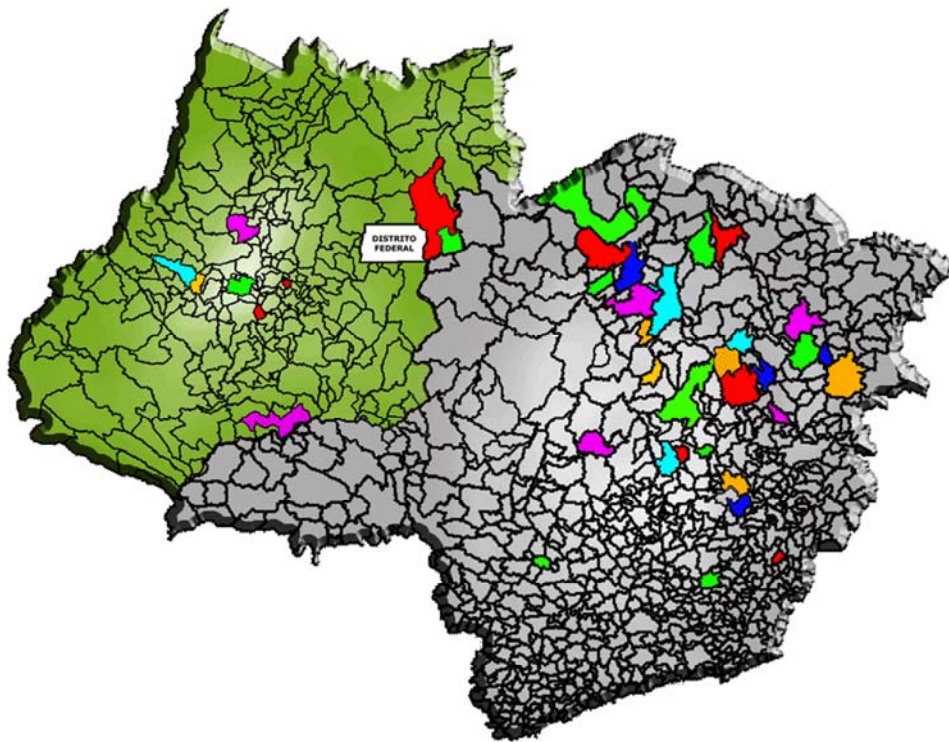


FIGURA 1- Mapas dos estados de MG e GO. Em destaque (várias cores) os municípios de procedência dos isolados estudados (TAB. 1, ANEXO).

### 4.3 Avaliação clínica

Todos os pacientes foram submetidos a exames sorológicos realizados por três técnicas baseadas em princípios diferentes: Imunofluorescência Indireta (IFI), Hemaglutinação Indireta (HAI) e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Considerou-se chagásico o indivíduo com resultados reativos em pelo menos duas técnicas diferentes (WHO, 1991).

A classificação clínica dos pacientes chagásicos crônicos portadores da forma indeterminada da doença baseou-se no exame clínico, ECG-Eletrocardiograma convencional de 12 derivações sem alterações, RX de tórax normal, ausência de sinais e sintomas de alterações digestivas e intestinais. Os pacientes chagásicos portadores da forma cardíaca foram agrupados em estádios evolutivos de I a IV, dependendo da avaliação clínica (sinais e sintomas), ECG convencional e RX de tórax/área cardíaca (RASSI & RASSI, 1998).

Trinta e cinco pacientes (79,5%) procedentes de MG permaneceram em acompanhamento ambulatorial. Em cada atendimento era preenchido um formulário pré-codificado, contendo, entre outras, informações sobre a idade, sexo, cor, estado civil, profissão, naturalidade e residência, além de dados clínicos, epidemiológicos e resultados de exames complementares. Esses pacientes foram reavaliados e reclassificados de acordo com as normas estabelecidas pelo Consenso Brasileiro em doença de Chagas/2005. Essa classificação leva em consideração a avaliação clínica (sinais e sintomas), eletrocardiograma, ecocardiograma e insuficiência cardíaca. Nenhum deles apresentou comprometimento digestivo (forma digestiva da doença), com esofagograma e enema opaco de enchimento normal.

### 4.4 Isolamento do *Trypanosoma cruzi*

As 102 amostras do *T. cruzi* utilizadas nesse estudo foram previamente isoladas pela técnica de hemocultura (CHIARI *et al.*, 1989), que consiste na coleta de 30mL de sangue venoso em *vacuntainer* heparinizado e transferência para um tubo plástico cônico de 50mL (*Falcon, USA*) e centrifugação a  $300 \times g$  por 10min a temperatura ambiente, seguido da remoção do sobrenadante (plasma) para um tubo plástico cônico de 15mL (*Falcon, USA*). Ao sedimento de hemácias foram adicionados 10mL de meio de cultura acelular LIT (*Liver infusion tryptose*), seguido de centrifugação a  $900 \times g$  (20min,  $4^{\circ}C$ ). O tubo contendo o plasma foi centrifugado nas mesmas condições. Descartado o sobrenadante, o sedimento de hemácias foi distribuído em alíquotas de 3mL em seis tubos de 15mL que continham 3mL de meio LIT. O plasma removido foi transferido para outro tubo e congelado a  $-20^{\circ}C$ . Ao sedimento obtido

do plasma foram adicionados 5mL de LIT. Todos os tubos foram incubados a 28°C, sendo agitados levemente duas vezes por semana e examinados ao microscópio aos 30, 60, 90 e 120 dias durante o cultivo, observando-se alíquotas de 10µL da suspensão de cada tubo entre lâmina e lamínula, com aumento de 400×.

#### **4.5 Cultura acelular e obtenção de massa úmida do *Trypanosoma cruzi***

A partir dos tubos positivos na hemocultura, foi realizada uma passagem em meio de cultura acelular (LIT) com igual volume (v/v). Todos os tubos foram incubados a 28°C e, após um período de 30 dias, foram centrifugados a 1.800×g a temperatura ambiente durante 20min, seguido da remoção do sobrenadante para um tubo plástico cônico de 15mL e acréscimo de igual volume de LIT. Esse procedimento é realizado com a finalidade de limpar a cultura, ou seja, descarte total dos restos celulares. O crescimento dos parasitos foi monitorado periodicamente e quando necessário foram realizadas novas etapas de: centrifugação, remoção do sobrenadante e acréscimo de LIT, como descrito anteriormente. Posteriormente, a cultura foi transferida para *Erlenmeyer*, sendo examinada periodicamente para a adição de LIT em média a cada dois dias, para o crescimento e multiplicação do *T. cruzi* em fase logarítmica até a concentração de  $1 \times 10^9$  epimastigotas/mL. Quando necessário, foi realizada outra passagem em meio de cultura acelular (LIT) com igual volume (v/v). Na tentativa de evitar seleção de subpopulações do parasito por prolongada manutenção em meio artificial, todos os cultivos permaneceram aproximadamente 60 dias em meio LIT quando os parasitos foram criopreservados em Nitrogênio líquido, e uma parte da cultura lavada três vezes com tampão KRT (*Krebs-Ringer-Tris*) pH 7,2 por centrifugação a  $1.800 \times g$  a 4°C durante 15min. O sedimento de parasitos (massa úmida) foi estocado a -20°C até o momento da extração do DNA.

#### **4.6 Preparação do DNA genômico do *Trypanosoma cruzi***

A extração do DNA foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Macedo *et al.* (1992). O sedimento de parasitos foi re-suspendido em 1mL tampão de lise (NaCl 80mM/ EDTA 45mM, pH 8,0/ SDS 1%) contendo 0,1mg/mL de proteinase K (*Promega, USA*) e incubado a 37°C durante 12h. A extração do DNA foi realizada por desproteíntização com fenol (v/v), agitação durante 5min, centrifugação a  $5.000 \times g$  a temperatura ambiente por 10min. A fase aquosa foi recuperada e submetida à extração com igual volume (v/v) de uma solução preparada com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 e de

outra solução contendo clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) seguido de agitação e centrifugação nas mesmas condições anteriores. A precipitação do DNA ocorreu na presença de dois volumes de etanol absoluto gelado, incubado a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 2h ou a  $-20^{\circ}\text{C}$  *overnight*. Após a centrifugação e volatilização do etanol, o precipitado obtido foi tratado com 1mL de tampão da ribonuclease (NaCl 80mM/ EDTA 5mM, pH 8,0, 10U/ $\mu\text{L}$  de ribonuclease - *Promega, USA*) e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2h. A seguir foram realizadas outra extração e precipitação do DNA, como descrito anteriormente. O DNA obtido foi diluído em 300 $\mu\text{L}$  de tampão *Low TE* (10mM Tris-HCl e 0,1mM EDTA pH 8,0) e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro a 260nm, sendo o grau de pureza das amostras determinado pela relação das absorvâncias a 260/280nm. A concentração final de cada amostra de DNA foi ajustada para  $\sim 3\text{ng}/\mu\text{L}$ , e as amostras foram estocadas a  $4^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso nas reações de PCR.

#### 4.7 Amplificação da região 3' do gene 24 S $\alpha$ do DNA ribossomal

Para a tipagem do gene rDNA 24S $\alpha$ , o DNA das amostras foi submetido a uma PCR composta de 10mM Tris-HCl pH 9,0; 50mM KCl; 0,1 % Triton X-100 (*Buffer B, Promega, USA*); 3,5mM MgCl<sub>2</sub> (*Promega*); 0,625U Taq DNA Polimerase (*Promega*); 200 $\mu\text{M}$  de cada dNTP; 0,25 $\mu\text{M}$  de cada iniciador: D71: 3'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-5', D72: 3'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-5'; 2 $\mu\text{L}$  de DNA total ( $\sim 3\text{ng}/\mu\text{L}$ ) e quantidade de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril suficiente para 12,5 $\mu\text{L}$ . Os ciclos de amplificação consistiram de uma primeira etapa de desnaturação ( $94^{\circ}\text{C}$ , 1min), um outro passo de desnaturação ( $94^{\circ}\text{C}$ , 30s), seguido de anelamento ( $60^{\circ}\text{C}$ , 30s) e extensão ( $72^{\circ}\text{C}$ , 30s) totalizando 30 ciclos (SOUTO & ZINGALES, 1993; SOUTO *et al.*, 1996).

Após essa etapa, uma alíquota de 5 $\mu\text{L}$  dos produtos da PCR foi analisada em gel de acrilamida a 6% corado pela prata para a visualização dos produtos amplificados. Como controles das amplificações, foram utilizados DNA de cepas ou clones que representam os seguintes grupos: rDNA tipo 1 (clone CL Brener ou a cepa JG, fragmento de 125pb), rDNA tipo 2 (clone Col1.7G2, fragmento de 110pb), Zimodema 3 (cepa 4166, fragmento de 117pb) e o grupo rDNA 1/2 (clone SO3 Cl5, fragmentos de 110 e 125pb).

#### 4.8 PCR gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (CO II)

Para a amplificação da região gênica que compreende a subunidade II da enzima mitocondrial citocromo oxidase de *T. cruzi*, o DNA das amostras foi submetido a uma PCR composta de tampão IO 10x *Phonutria*, Belo Horizonte, MG, Brasil (10mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl); 3,5mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5U Taq DNA Polimerase (*Promega*); 250μM de cada dNTP; 0,3μM dos iniciadores externos TcMit21 (5'-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3') e TcMit10 (5'-CCATATATTGTTGCATTATT-3'); 3μL de DNA total (~3ηg/μL) e quantidade de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril suficiente para 20μL. Os ciclos de amplificação da PCR consistiram de uma desnaturação inicial (95°C, 5min), um outro passo de desnaturação (94°C, 45s), anelamento (48° C, 45s) e extensão (72° C, 1min), totalizando 40 ciclos.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% e depois 10μL da PCR foi submetido à digestão utilizando a enzima de restrição *Alu I* (*Promega*) conforme instrução do fabricante. A análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição para esse gene, em gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata, permite distinguir as linhagens de *T. cruzi* I, II, III ou híbridos. Como padrão de comparação dos RFLP, foi utilizado o DNA de cepas e clones característicos das linhagens de *T. cruzi* I (clone Col.17G2, fragmentos de 30, 81 e 264pb; haplótipo A), *T. cruzi* II (cepa JG, fragmentos de 81 e 212pb; haplótipo C). Entretanto, esse marcador não diferencia as cepas da linhagem *T. cruzi* III das cepas híbridas já que apresentam o mesmo perfil de restrição para o gene COII (fragmentos de 81 e 294pb, haplótipo B). Como padrão para o haplótipo B, foi utilizado o clone híbrido CL Brener (FREITAS *et al.*, 2006).

#### 4.9 Espaçador intergênico dos genes mini-exon de *T. cruzi* (SL-IR)

Para a amplificação da região intergênica dos genes de mini-exon, o DNA das amostras de *T. cruzi* foi submetido a uma PCR contendo 20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl; 3mM MgCl<sub>2</sub>; 250mM de cada dNTP; 3μM de cada iniciador (TcIII 5'-CTCCCCAGTGTGGCCTGGG-3'; UTCC 5'-CGTACCAATATAGTACAGAAACTG-3'); 1U Taq DNA polimerase Platinum (*Invitrogen, USA*); 1μL de DNA total (~3ηg/μL) e quantidade de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril suficiente para 15μL. Os iniciadores utilizados reconhecem as posições entre 368-386 e 546-570 da unidade repetitiva do mini-exon do *T. cruzi* (BURGOS *et al.*, 2007).

Os ciclos de amplificação da PCR consistiram de uma etapa inicial de desnaturação (94°C, 3min), anelamento (68°C, 1 min), extensão dos iniciadores (72°C, 1 min) e

desnaturação (94°C, 1 min). A cada três ciclos, a temperatura de anelamento foi diminuída para 66, 64, 62 e 60°C. Na última temperatura, o número de ciclos foi aumentado para 35, seguido de uma extensão final (72°C, 10 min). A análise dos produtos amplificados, em gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata, permite distinguir a linhagem de *T. cruzi* III (amplifica um fragmento de 200pb) das cepas pertencentes às linhagens *T. cruzi* I, II e híbridos (que amplifica um fragmento de 150-157pb) (BURGOS *et al.*, 2007). Como controle padrão de comparação, foi utilizado o DNA de cepas ou clones característicos das linhagens *T. cruzi* I (clone Col.17G2), II (cepa JG), III (cepa 3863) e híbridos (clone CL Brener).

#### **4.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Os produtos de amplificação obtidos por meio das técnicas de PCR (gene rDNA 24 S $\alpha$ , gene mitochondrial COII e região intergênica dos genes de mini-exon) foram analisados em géis de poliacrilamida não desnaturante na concentração de 6% e coloração por nitrato de prata a 0,2% para visualização dos fragmentos amplificados. Uma alíquota de 3 a 5 $\mu$ L do produto amplificado, diluído com igual volume do tampão da amostra 2 $\times$  (0,5% de azul de bromofenol; 0,5% de xileno-cianol; 60% de glicerol) foi aplicado em cada canaleta do gel. A corrida eletroforética foi realizada a 100-120 volts cerca de 3 horas, ou seja, com a migração de 6-7cm do corante xileno cianol. Em todas as técnicas, o tamanho das bandas amplificadas foi monitorado com a utilização do marcador de peso molecular (PM) de 25pb (*Promega, USA*). Após a eletroforese, os géis foram transferidos para solução fixadora (etanol absoluto 10%, ácido acético 0,5%) durante 10min e revelados pela coloração com 0,2% de nitrato de prata (AgNO<sub>2</sub>) diluído em solução fixadora por 10min sob agitação lenta. Posteriormente foram lavados rapidamente em água milli-Q e seguido da redução dos sais de prata com 3% (p/v) de hidróxido de sódio (NaOH) e 0,3% de formaldeído a 37% até a visualização das bandas (SANTOS *et al.*, 1993). Quando completa, a revelação foi interrompida com a solução fixadora e os géis fotografados (câmara digital: *Sony Cyber shot*, 5.1 mega pixels) para documentação.

#### **4.11 Análises do polimorfismo de microssatélites**

Para a análise do polimorfismo de microssatélites, o DNA de 77 amostras do *T. cruzi* (procedentes de 32 pacientes) foi submetido a ensaios de PCR com nove *loci* de microssatélites compostos por repetições de dinucleotídeos: SCLE10, SCLE11, MCLF10, MCLG10, MCLE01 (OLIVEIRA *et al.*, 1998) trinucleotídeos: TcATT14, TcAAT8, tcTAT20

e um *locus* composto por repetições de tetranucleotídeo, TcAAAT6 (VALADARES *et al.*, 2008).

Cada reação continha 10mM Tris-HCl pH 9,0; 50mM KCl; 0,1 % Triton X-100; *Buffer* B; 2,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5U Taq DNA Polimerase (*Promega*); 250µM de cada dNTP (*Invitrogen, USA*); 0,3µM de cada iniciador (iniciadores direto marcado com fluoresceína e reverso não marcado); 3 µL de DNA total (~3ng/µL) e quantidade de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril suficiente para 15µL. A amplificação foi realizada no termociclador (*MJ Research PTC-100*), usando o protocolo *step-down* modificado para a amplificação de microssatélites do *T. cruzi*: desnaturação inicial (94°C, 5min), anelamento (58°C, 30s) e extensão (72°C, 1min), seguido de outro passo de desnaturação (94°C, 30s). A cada cinco ciclos, a temperatura de anelamento foi diminuída para 55, 53, 51 e 48°C. A esta última temperatura o número de ciclos foi aumentado para 15, seguido de uma extensão final dos iniciadores por 10 min. As seqüências dos iniciadores utilizados para a amplificação específica de cada um dos nove *loci* estão descritas na TAB. 2. Em todos os casos, um dos iniciadores do par foi marcado com fluoresceína na sua extremidade 5'.

TABELA 2

Iniciadores utilizados nas reações de microssatélites

INICIADORES	SEQÜÊNCIAS
SCLE10- direto	5'- GATCCCGCAATAGGAAAC - 3'
SCLE10- reverso	5'- Fluoresceína GTGCATGTTCCATGGCTT - 3'
SCLE11- direto	5'- Fluoresceína ACGACCAAAGCCATCATT - 3'
SCLE11- reverso	5'-GATGCTAACTGCTCAAGTGA - 3'
MCLF10- direto	5'- Fluoresceína GCGTAGCGATTCATTTCC - 3'
MCLF10- reverso	5'- ATCCGCTACCACTATCCAC - 3'
MCLG10- direto	5'- Fluoresceína AGGAGTCAAATATAATGAGGCA- 3'
MCLG10- reverso	5'-ACGTGTGAAAGGCATCTATC - 3'
MCLE01- direto	5'- Fluoresceína - CTGCCATGTTTGATCCCT - 3'
MCLE01- reverso	5'- CGTGTACATATCGGCAGTG- 3'
TcAAT8- direto	5'-FluoresceinACCTCATCGGTGTGCATGTC-3'
TcAAT8- reverso	5'-TATTGTCGCCGTGCAATTC-3'
TcATT14- direto	5'-FluoresceinTTATGGATGGGGTGGGTTTG-3'
TcATT14- reverso	5'-AGCAATAATCGTATTACGGC-3'
TcTAT20- direto	5'-FluoresceinGATCCTTGAGCAGCCACCAA-3'
TcTAT20- reverso	5'-CAAATTCCTAACGCAGCAGC-3'
TcAAAT6- direto	5'-FluoresceinGCCGTGTCTAAAGAGCAAG-3'
TcAAAT6- reverso	5'-GGTTTTAGGGCCTTTAGGTG-3'

#### 4.12 Determinação do tamanho dos alelos de microssatélites

Inicialmente, uma alíquota de 5 $\mu$ L dos produtos da PCR foi analisada em gel de poliacrilamida não desnaturante na concentração de 6%, seguido da coloração por nitrato de prata. Após a verificação da presença do produto de tamanho esperado, alíquotas de 1 a 3 $\mu$ L dos amplicons foram desnaturados a uma temperatura de 90°C por 3 min e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% sob condição desnaturante (8M uréia) no seqüenciador automático de DNA, ALF (*Automated laser fluorescent sequencer*, Pharmacia, USA) para determinação do tamanho dos alelos, 50°C durante 10h. Como padrão externo das corridas eletroforéticas, foram utilizadas escalas alélicas contendo uma mistura de fragmentos fluorescentes de pesos moleculares variando de 50 em 50pb, "sizer 50-500" (*Pharmacia, Amersham Biosciences, USA*), na concentração de 5fmol por fragmento. Para cada canaleta aplicada, incluindo aquelas contendo os padrões externos, foram acrescentados fragmentos fluorescentes de tamanhos conhecidos (75, 155, 210 e 320pb) que foram utilizados como padrões internos nas corridas. Os resultados em forma de cromatogramas foram analisados com o auxílio do programa de computador "Alleleloc" (versão 1.0, *Pharmacia-Biotech, USA*), e os fragmentos amplificados foram detectados em forma de picos. Os fragmentos de tamanhos conhecidos, presentes nos padrões externo e interno da corrida, foram corretamente alinhados, e os tamanhos dos alelos de cada *locus* de microssatélites foram calculados para cada amostra. Para um organismo diplóide, como o *T. cruzi*, é de se esperar a presença de um ou dois picos indicando homozigose ou heterozigose para determinado *locus* de microssatélite (neste caso teremos uma cepa monoclonal, formada por uma única população). A detecção de mais de dois picos pode ser sugestivo de uma mistura de populações (cepa policlonal) ou, ainda, aneuploidia (cepa aneuplóide) para um determinado *locus*.

#### 4.13 Construção das árvores filogenéticas

O pacote de programas PHYLIP (*Phylogeny Inference Package*) versão 3.67 (FELSENSTEIN, 2007) foi utilizado para a construção das árvores filogenéticas. Inicialmente, cada um dos dois alelos de cada *locus* de microssatélite foi considerado como um estado particular de caractere discreto, com múltiplos estados possíveis. Considerando que a evolução de microssatélites segue o modelo de mutação de um passo, um alelo com  $n$  repetições muda para o alelo  $n + 1$  ou  $n - 1$  (SHRIVER *et al.*, 1993, VALDES *et al.*, 1993). O alelo mais freqüente é considerado o estado ancestral, os alelos variando apenas por uma unidade de repetição foram ordenados de forma adjacente, por meio de letras. Por exemplo, o

alelo mais freqüente (d) poderia dar origem aos alelos adjacentes (c), com uma unidade repetitiva a menos ou (e) com uma unidade repetitiva a mais, e assim por diante. Dessa forma, a caracterização genotípica para cada amostra do parasito foi descrita levando-se em conta cada um dos dois alelos presentes nos *locus* estudados. Estes dados foram submetidos ao programa FACTOR, que transformou os dados de caracteres discretos (com múltiplos estados) em caracteres com dois estados, 0 ou 1. O arquivo obtido por meio desse programa foi inserido no programa MIX para determinação dos agrupamentos entre as amostras (método de Wagner). A estratégia do programa MIX para achar a árvore ou as árvores mais parcimoniosas baseia-se em adição e rearranjos de cada OTU (Unidade Taxonômica Operacional). À medida que cada OTU era adicionada, todas as topologias possíveis são avaliadas, uma após a outra, e as mais prováveis são selecionadas. O método de Wagner assume que transformações 0-1 ou 1-0 são igualmente prováveis e que o estado ancestral é desconhecido. A distância genética entre as cepas foi calculada como sendo o número de mutações necessárias para que uma cepa se transforme em outra. O programa *TreeView*, versão 1.6.6 (PAGE, 2007) foi utilizado para a construção da rede de Wagner.

Os fenogramas representando as matrizes de distância genética foram construídos pelo método da média aritmética não ponderada-UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*) utilizando-se o programa *Treecon* for Windows. Para a construção dos fenogramas a matriz de 0 e 1, gerada pelo FACTOR, foi reformatada para o reconhecimento do programa *Treecon* (VAN DE PEER & WACHTER, 1994). Os dados foram submetidos ao modo RFLP/AFLP/RAPD utilizando o algoritmo de Nei & Li (1979). O grau de reprodutibilidade e confiabilidade dos agrupamentos e as relações taxonômicas obtidas nos fenogramas foram testadas pelo *Bootstrap*, com 1000 re-amostragens (FELSENSTEIN, 1985). A árvore foi construída seguindo a opção *clustering* pelo método UPGMA e visualizada na interface do próprio programa.



## 5. RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

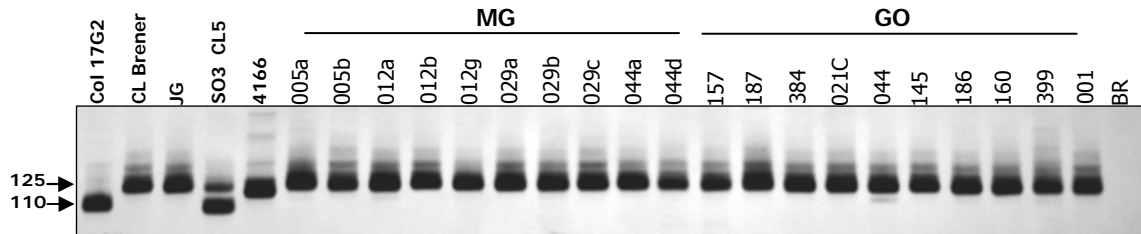
### 5.1 Caracterização genética dos isolados do *Trypanosoma cruzi*

As 102 amostras do *T. cruzi* foram obtidas a partir de hemocultura positiva de 44 pacientes chagásicos crônicos de ambos os sexos e procedentes de diferentes regiões endêmicas dos estados de MG e GO. Destes, 27 pacientes (61%) apresentam a forma assintomática ou indeterminada da doença de Chagas (FI) e 17 (39%) apresentam manifestações cardíacas (FC). Em todos os pacientes foi realizado mais de um isolamento do parasito em diferentes períodos de tempo. A origem geográfica dos pacientes foi considerada o local onde os indivíduos viveram a infância ou a primeira região endêmica onde residiram por longo período de tempo (TAB. 1, ANEXO).

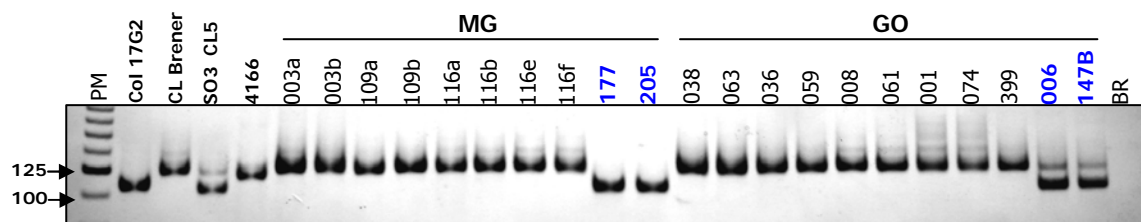
Todas as amostras do *T. cruzi* (102) foram submetidas a PCRs independentes, para a tipagem do gene rDNA 24S $\alpha$  e mitocondrial COII.

#### 5.1.1 Amplificação dos genes rDNA 24 S $\alpha$ e citocromo oxidase subunidade II (COII)

A análise do perfil genético entre os isolados de um mesmo paciente, em diferentes períodos de tempo, identificou uma perfeita correlação entre eles. Os dados relacionados aos marcadores rDNA 24S $\alpha$  e COII mostraram uma forte evidência da associação das amostras isoladas dos pacientes em ambos os estados com a linhagem *T. cruzi* II, uma vez que a maior parte dos isolados mostrou perfil correspondente ao grupo rDNA tipo 1 (FIG. 2A e B) e haplogrupo mitocondrial C, com os produtos amplificados na região de 125pb (rDNA tipo 1) e 82/212pb haplogrupo mitocondrial C (FIG. 3A). Entretanto, os isolados de dois pacientes, um do estado de MG (177 e 205) e outro de GO (006 e 147B), os resultados foram divergentes. Em relação ao rDNA, apresentaram fragmento amplificado de ~110pb (rDNA 2) e de ~110 e 125pb (rDNA 1/2), respectivamente (FIG. 2B). Em relação à tipagem do gene COII, esses isolados correspondem ao haplogrupo mitocondrial B (FIG. 3B), mostrando tratar-se de isolados da linhagem *T. cruzi* III ou populações híbridas.

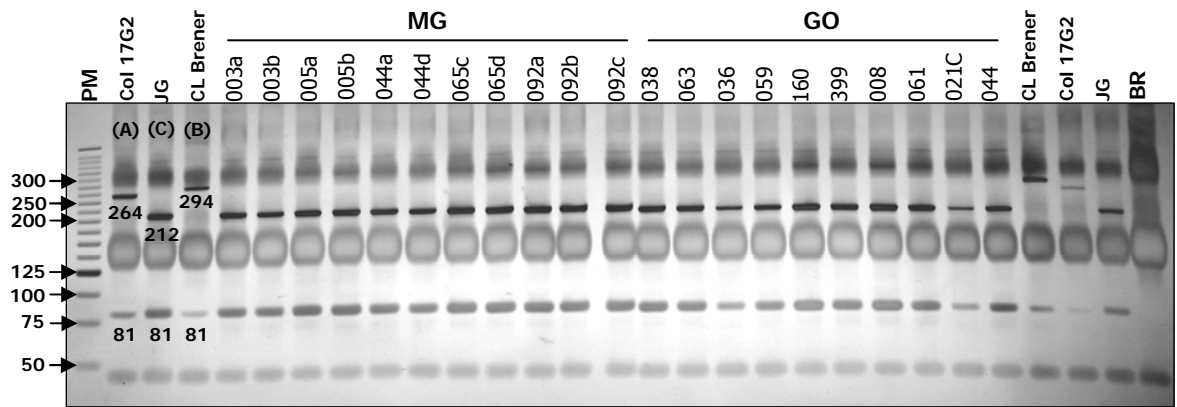


(A)

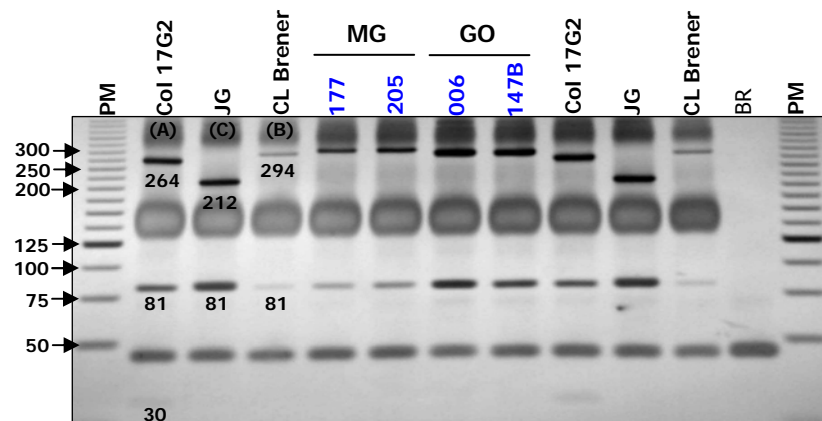


(B)

FIGURA 2 **A** e **B** - Eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% representativos da amplificação do gene rDNA 24S $\alpha$  nas amostras do *T. cruzi*, isoladas de pacientes chagásicos crônicos. PM: marcador de peso molecular de 25 pares de base (pb). Controles: DNA do clone Col1.7G2 (fragmentos de ~110pb, rDNA 2, *T. cruzi* I); clone CL Brener (~125pb, rDNA 1, híbrido) ou cepa JG (~125pb, rDNA 1, *T. cruzi* II); clone SO3 cl5 (~125 e 110pb, rDNA 1/2, híbrido); e a cepa 4166 (~117/119pb, associada a populações pertencentes ao zimodema 3 ou *T. cruzi* III). Na última canaleta o controle negativo da reação (Branco-BR). **(A)** e **(B)** Isolados do *T. cruzi* pertencentes aos grupos rDNA1, 2 e 1/2.



(A)



(B)

FIGURA 3 – Eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% representativos da análise dos fragmentos do gene mitocondrial COII, após digestão com a enzima AluI (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism). PM: marcador de peso molecular de 25pb. Controles: DNA do clone Col1.7G2 (fragmentos de 264, 81 e 30 pares de base-pb, haplótipo mitocondrial A, *T. cruzi* I); cepa JG (fragmentos de 212 e 81pb, haplótipo mitocondrial C, *T. cruzi* II); e o clone CL Brener (fragmentos de 294 e 81 pb, haplótipo mitocondrial B, *T. cruzi* III ou híbrido). Controle negativo da reação (Branco-BR). (A) Isolados do *T. cruzi* relacionados ao haplogrupo C, e (B) Isolados do *T. cruzi* pertencentes ao haplogrupo B. Não foram observados isolados haplogrupo mitocondrial A.

### 5.1.2 Genotipagem do gene SL-IR do *Trypanosoma cruzi*

A amplificação do espaçador intergênico dos genes de mini-exon do *T. cruzi* possibilita diferenciar as cepas da linhagem *T. cruzi* III do grupo de cepas híbridas. Os isolados do *T. cruzi* procedentes do paciente de MG (177 e 205) foram associados à linhagem *T. cruzi* III devido à amplificação de um fragmento de, ~ 200pb enquanto que, os isolados do paciente de GO (006 e 147B) amplificaram fragmentos de ~ 150-157pb e relacionados ao grupo de cepas híbridas (FIG. 4).

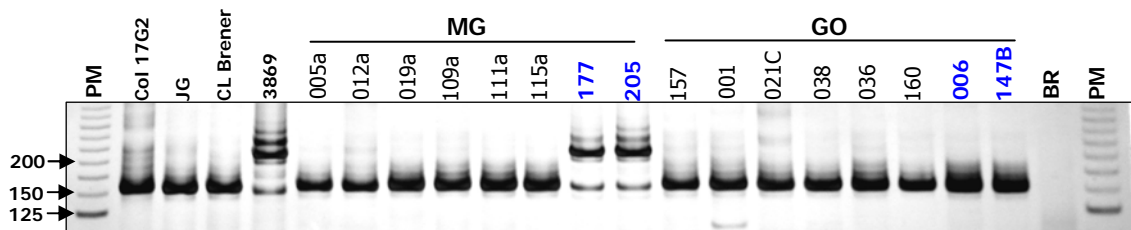


FIGURA 4- Eletroforese em gel de poli-acrilamida a 6% representativo da amplificação do espaçador intergênico dos genes de mini-exon nas amostras do *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos. PM: marcador de peso molecular de 25 pares de base (pb). Controles: DNA do clone Col1.7G2 (fragmento de ~ 150-157pb, *T. cruzi* I); cepa JG (~ 150-157pb, *T. cruzi* II); clone CL Brener (150-157pb, híbrido); e a cepa 3869 (fragmento de ~ 200pb, *T. cruzi* III). Na penúltima canaleta o controle negativo da reação (Branco-BR).

### 5.2 Análises do polimorfismo de microssatélites

O polimorfismo de tamanho dos nove *loci* de microssatélites compostos por repetições de dinucleotídeos (SCLE10, SCLE11, MCLF10, MCLG10, MCL01), trinucleotídeos (TcATT14, TcAAT8, TcTAT20) e um *locus* composto por repetições de tetranucleotídeos (TcAAAT6) foi avaliado por reações de PCR com DNA de 77 amostras do *T. cruzi* (procedentes de 32 pacientes) totalizando 75% das amostras. Dos nove *loci* de microssatélites analisados, apenas o *locus* TcAAAT6 não foi capaz de amplificar todas as amostras do *T. cruzi*. Duas amostras isoladas de um mesmo paciente (177 e 205) não amplificaram para esse *locus*, mesmo após diversas tentativas. A TAB. 3 resume algumas características importantes para os diferentes *loci*, tais como tamanho e número de repetições.

TABELA 3

Características dos nove *loci* de microssatélites analisados

<i>LOCI</i>	TAMANHO dos alelos (pares de base) Clone CL Brener	REPETIÇÃO
SCLE10	237-275	(GT) <sub>2</sub> (TG) <sub>10</sub>
SCLE11	153-153	(AC) <sub>9</sub>
MCLF10	182-194	(CA) <sub>2</sub> A(CA) <sub>14</sub>
MCLG10	177-177	(CA) <sub>8</sub>
MCLE01	130-130	(CA) <sub>9</sub>
TcTAT20	181-223	20
TcAAT8	247-292	8
TcATT14	265-271	14
TcAAAT6	263-263	6

Os produtos de amplificação utilizando um dos iniciadores marcados com fluoresceína na extremidade 5' foram analisados no seqüenciador automático A.L.F e comparados com uma escala alélica para determinação do tamanho do alelos. Setenta e duas amostras (93,5%) do *T. cruzi* apresentaram apenas um ou dois alelos para cada um dos *locus* de microssatélites. As TAB. 4 e 5 mostram os valores dos alelos dos nove *loci* analisados para cada uma das amostras procedentes dos estados de MG e GO. Considerando o *T. cruzi* um organismo diplóide, esses resultados foram interpretados como reflexo de populações homogêneas ou monoclonais homozigotas (perfil com um pico) ou heterozigotas (dois picos) para cada *locus* (FIG. 5). Cinco dessas amostras (6,5%) amplificaram simultaneamente três fragmentos de tamanhos diferentes para o *locus* de microssatélite TcAAAT6 (FIG. 6). Esses dados sugerem uma constituição policlonal para as subpopulações presentes nesses pacientes ou, ainda, podem ser interpretados como resultantes de aneuploidias para esse *locus*.

**TABELA 4**Tamanho (pb) dos alelos observados para nove *loci* de microssatélites analisados em 58 amostras do *T. cruzi* procedentes de MG.

(Continua)

<i>Loci</i>	MCLF10	SCLE10	SCLE11	MCLG10	MCLE01	TcAAT8	TcTAT20	TcATT14	TcAAAT6
<b>Controles: cepas* e clones** de referência do <i>T. cruzi</i></b>									
** CL Brener	182/194	237/175	153/153	177/177	130/130	247/292	181/223	265/271	263/263
** COL1. 7G2	184/186	255/257	139/139	157/157	136/136	229/229	181/181	253/253	255/255
* JG	182/182	173/175	177/177	177/177	134/136	262/262	190/217	262/262	271/275
** SO3 cl5	182/188	257/291	149/149	175/175	130/130	250/250	220/220	265/265	263/271
*3869	186/192	247/247	153/161	175/179	134/134	295/295	181/181	256/256	267/267
<b>Isolados de <i>T. cruzi</i></b>									
003 a (AT)	182/182	271/275	153/157	175/183	126/134	262/277	193/214	262/262	271/275
003 b (PT)	182/182	271/275	153/157	175/183	126/134	262/277	193/214	262/262	271/275
012 a (AT)	182/182	273/273	151/155	181/181	126/128	262/262	190/205	262/262	271/275
012 b (PT)	182/182	273/273	151/155	181/181	126/128	262/262	190/205	262/262	271/275
012 g (PT)	182/182	273/273	151/155	181/181	126/128	262/262	190/205	262/262	271/275
013 a	182/182	271/275	151/151	181/181	132/150	253/259	193/208	265/265	263/275
013 c	182/182	271/275	151/151	181/181	132/150	253/259	193/208	265/265	263/275
013 e	182/182	271/175	151/151	181/181	132/150	253/259	193/208	265/265	263/275
019 a (AT)	182/182	273/291	149/157	177/177	126/138	259/277	190/193	265/265	271/275
019 c (PT)	182/182	273/291	149/157	177/177	126/138	259/277	190/193	265/265	271/275
019 e (PT)	182/182	273/291	149/157	177/177	126/138	259/277	190/193	265/265	271/275
029 a	182/182	271/275	145/149	175/175	138/138	274/274	208/217	265/265	275/275
029 b	182/182	271/275	145/149	175/175	138/138	274/274	208/217	265/265	275/275
029 c	182/182	271/175	145/149	175/175	138/138	274/274	208/217	265/265	275/275
044 a	182/182	273/291	149/149	177/183	136/146	238/238	196/214	262/262	271/275
044 d	182/182	273/291	149/149	177/183	136/146	238/238	196/214	262/262	271/275
050 b (AT)	184/184	267/267	155/155	177/185	134/138	262/274	193/217	265/265	271/275
050 f (PT)	184/184	267/267	155/155	177/185	134/138	262/274	193/217	265/265	271/275
050 h (PT)	184/184	267/267	155/155	177/185	134/138	262/274	193/217	265/265	271/275
053 a	184/184	269/269	145/149	175/175	130/136	253/262	214/217	265/265	271/271
053 d	184/184	269/269	145/149	175/175	130/136	253/262	214/217	265/265	271/271
053 e	184/184	269/269	145/149	175/175	130/136	253/262	214/217	265/265	271/271
065 b	182/182	271/275	151/155	177/181	134/150	250/259	190/205	265/265	259/275
065 c	182/182	271/275	151/155	177/181	134/150	250/259	190/205	265/265	259/275
065 d	182/182	271/275	151/155	177/181	134/150	250/259	190/205	265/265	259/275
079 a	182/182	267/267	149/153	179/179	138/148	277/277	202/208	262/262	271/271
079 d	182/182	267/267	149/153	179/179	138/148	277/277	202/208	262/262	271/271

**TABELA 4**

Tamanho (pb) dos alelos observados para nove *loci* de microssatélites analisados em 58 amostras do *T. cruzi* procedentes de MG.  
(Conclusão)

<i>Loci</i>	<b>MCLF10</b>	<b>SCLE10</b>	<b>SCLE11</b>	<b>MCLG10</b>	<b>MCLE01</b>	<b>TcAAT8</b>	<b>TcTAT20</b>	<b>TcATT14</b>	<b>TcAAAT6</b>
083 a	182/182	271/271	147/153	177/187	130/130	253/262	193/217	262/262	271/271
083 c	182/182	271/271	147/153	177/187	130/130	253/262	193/217	262/262	271/271
092 a	182/182	271/271	145/145	177/177	134/138	250/250	205/205	265/265	259/275
092 b	182/182	271/271	145/145	177/177	134/138	250/250	205/205	265/265	259/275
092 c	182/182	271/271	145/145	177/177	134/138	250/250	205/205	265/265	259/275
103 a	182/182	271/275	143/149	171/185	130/148	259/259	217/217	262/262	271/271
103 c	182/182	271/275	143/149	171/185	130/148	259/259	217/217	262/262	271/271
105 a	182/182	275/283	151/155	177/177	134/152	250/259	190/190	262/262	275/275
105 b	182/182	275/283	151/155	177/177	134/152	250/259	190/190	262/262	275/275
105 d	182/182	275/283	151/155	177/177	134/152	250/259	190/190	262/262	275/275
109 a	182/182	269/275	<b>155/155</b>	175/175	134/138	259/259	208/217	262/262	271/275
109 b	182/182	269/275	<b>149/155</b>	175/175	134/138	259/259	208/217	262/262	271/275
111 a	182/182	273/273	147/147	177/185	134/138	265/265	193/208	262/262	<b>263/267/271</b>
111 c	182/182	273/273	147/147	177/185	134/138	265/265	193/208	262/262	<b>263/267/271</b>
111 d	182/182	273/273	147/147	177/185	134/138	265/265	193/208	262/262	<b>263/267/271</b>
115 b	182/182	275/275	143/149	177/177	112/134	262/262	196/217	262/262	<b>263/267/275</b>
115 c	182/182	275/275	143/149	177/177	112/134	262/262	196/217	262/262	<b>263/267/275</b>
116 a (AT)	182/184	271/291	<b>145/149</b>	175/185	126/130	253/262	193/214	265/265	271/271
116 b (AT)	182/184	271/291	<b>145/145</b>	175/185	126/130	253/262	193/214	265/265	271/271
116 e (AT)	182/184	271/291	<b>145/149</b>	175/185	126/130	253/262	193/214	265/265	271/271
116 f (PT)	182/184	271/291	<b>145/149</b>	175/185	126/130	253/262	193/214	265/265	271/271
132 a	182/182	273/273	147/149	173/175	130/152	277/277	181/193	262/262	271/275
132 d	182/182	273/273	147/149	173/175	130/152	277/277	181/193	262/262	271/275
138 a	182/182	269/271	151/153	173/177	134/134	289/289	199/226	262/262	271/271
138 c	182/182	269/271	151/153	173/177	134/134	289/289	199/226	262/262	271/271
154 a	182/184	275/275	147/161	171/171	150/154	253/253	181/199	262/262	275/275
154 c	182/184	275/275	147/161	171/171	150/154	253/253	181/199	262/262	275/275
010	182/182	269/271	155/155	175/177	130/134	256/259	190/205	265/265	271/275
079	182/182	269/271	155/155	175/177	130/134	256/259	190/205	265/265	271/275
177	182/182	255/255	155/155	175/175	128/130	295/298	178/181	256/265	n.a*
205	182/182	255/255	155/155	175/175	128/130	295/298	178/181	256/265	n.a*

AT-Antes tratamento; PT-Após tratamento; n.a\*-Não amplificado

TABELA 5

Tamanho (pb) dos alelos observados para nove *loci* de microssatélites analisados em 19 amostras do *T. cruzi* procedentes de GO.

<i>Loci</i>	MCLF10	SCLE10	SCLE11	MCLG10	MCLE01	TcAAT8	TcTAT20	TcATT14	TcAAAT6
<b>Controles: cepas* e clones** de referência do <i>T. cruzi</i></b>									
** CL Brener	182/194	237/175	153/153	177/177	130/130	247/292	181/223	265/271	263/263
** COL 1. 7G2	184/186	255/257	139/139	157/157	136/136	229/229	181/181	253/253	255/255
* JG	182/182	173/175	177/177	177/177	134/136	262/262	190/217	262/262	271/275
** SO3 cl5	182/188	257/291	149/149	175/175	130/130	250/250	220/220	265/265	263/271
* 3869	186/192	247/247	153/161	175/179	134/134	295/295	181/181	256/256	267/267
<b>Isolados de <i>T. cruzi</i></b>									
006	182/190	255/291	149/149	177/177	128/130	250/292	184/223	265/274	259/271
147B	182/190	255/291	149/149	177/177	128/130	250/292	184/223	265/274	259/271
038	182/182	275/281	151/153	177/177	152/152	250/298	214/238	262/265	271/175
063	182/182	275/281	151/153	177/177	152/152	250/298	214/238	262/265	271/275
036	182/182	267/267	151/151	177/185	126/148	268/268	205/214	262/262	271/175
059	182/182	267/267	151/151	177/185	126/148	268/268	205/214	262/262	271/275
001	182/182	273/273	153/157	175/183	134/154	268/268	190/205	262/262	275/275
074	182/182	273/273	153/157	175/183	134/154	268/268	190/205	262/262	275/275
021C	182/182	273/275	149/151	177/177	130/152	298/298	214/238	262/262	271/271
044	182/182	273/275	149/151	177/177	130/152	298/298	214/238	262/262	271/271
157	182/182	273/273	153/153	175/183	134/148	259/259	190/190	265/265	271/271
187	182/182	273/273	153/153	175/183	134/148	259/259	190/190	265/265	271/271
384	182/182	273/273	153/153	175/183	134/148	259/259	190/190	265/265	271/271
160 (AT)	182/182	275/281	149/151	177/177	148/148	241/259	190/193	265/265	275/275
399 (PT)	182/182	275/281	149/151	177/177	148/148	241/259	190/193	265/265	275/275
008	182/184	275/291	149/157	175/175	134/148	253/262	190/223	256/265	259/275
061	182/184	275/291	149/157	175/175	134/148	253/262	190/223	256/265	259/275
145	182/182	271/275	151/155	177/181	134/150	253/259	190/205	265/265	263/275
186	182/182	271/275	151/155	177/181	134/150	253/259	190/205	265/265	263/275

AT-Antes tratamento; PT-Após tratamento

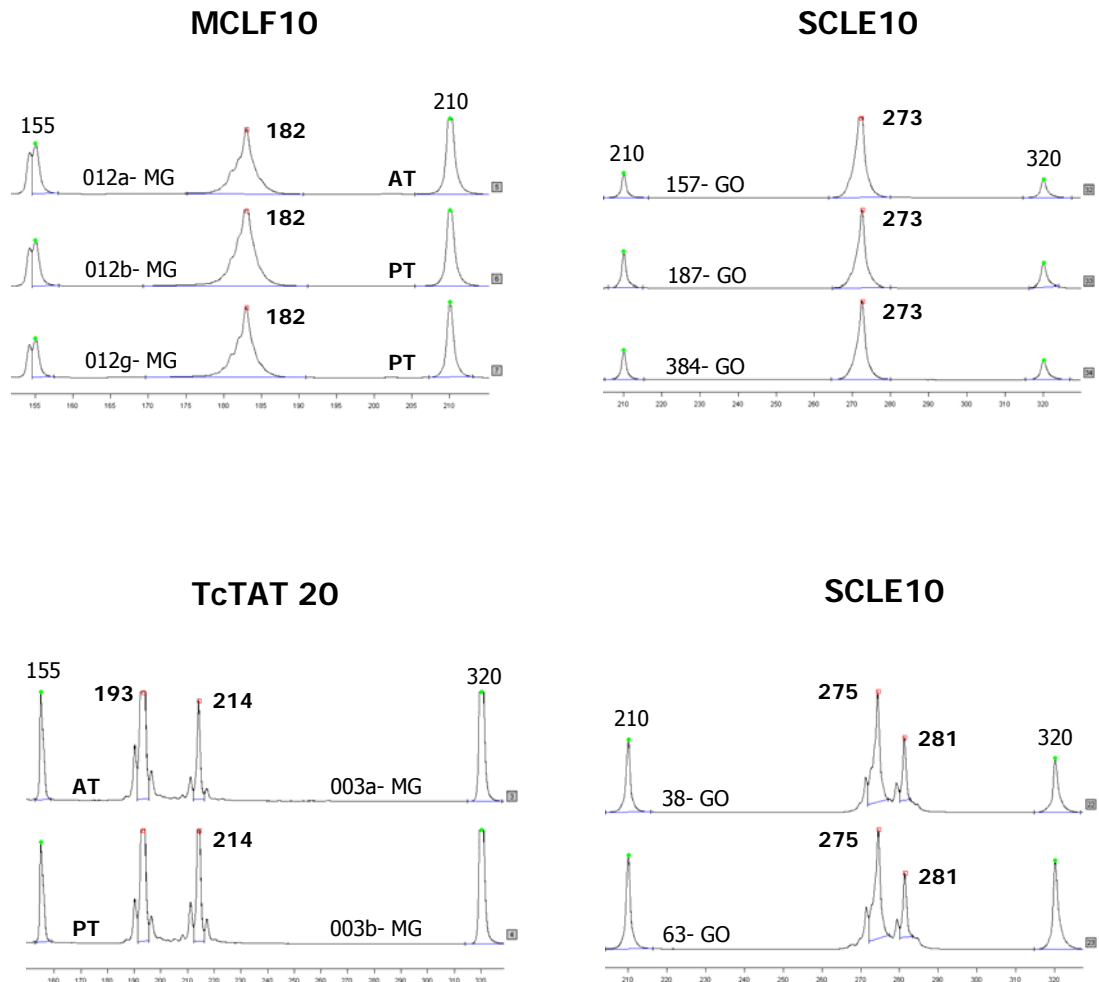


FIGURA 5- Perfis de eletrofluorogramas obtidos pelo seqüenciador automático de DNA A.L.F. (*Automatic Laser Fluorescent Sequencer*) dos fragmentos amplificados pela PCR dos *loci* de microssatélites MCLF10, SCLE10, e TcTAT20. Isolados monoclonais homocigotos (1 pico) e heterocigotos (2 picos). Os números correspondem ao tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb). Os picos das extremidades correspondem aos marcadores internos de 155, 210, e 320pb. AT-antes tratamento, PT-após tratamento específico.

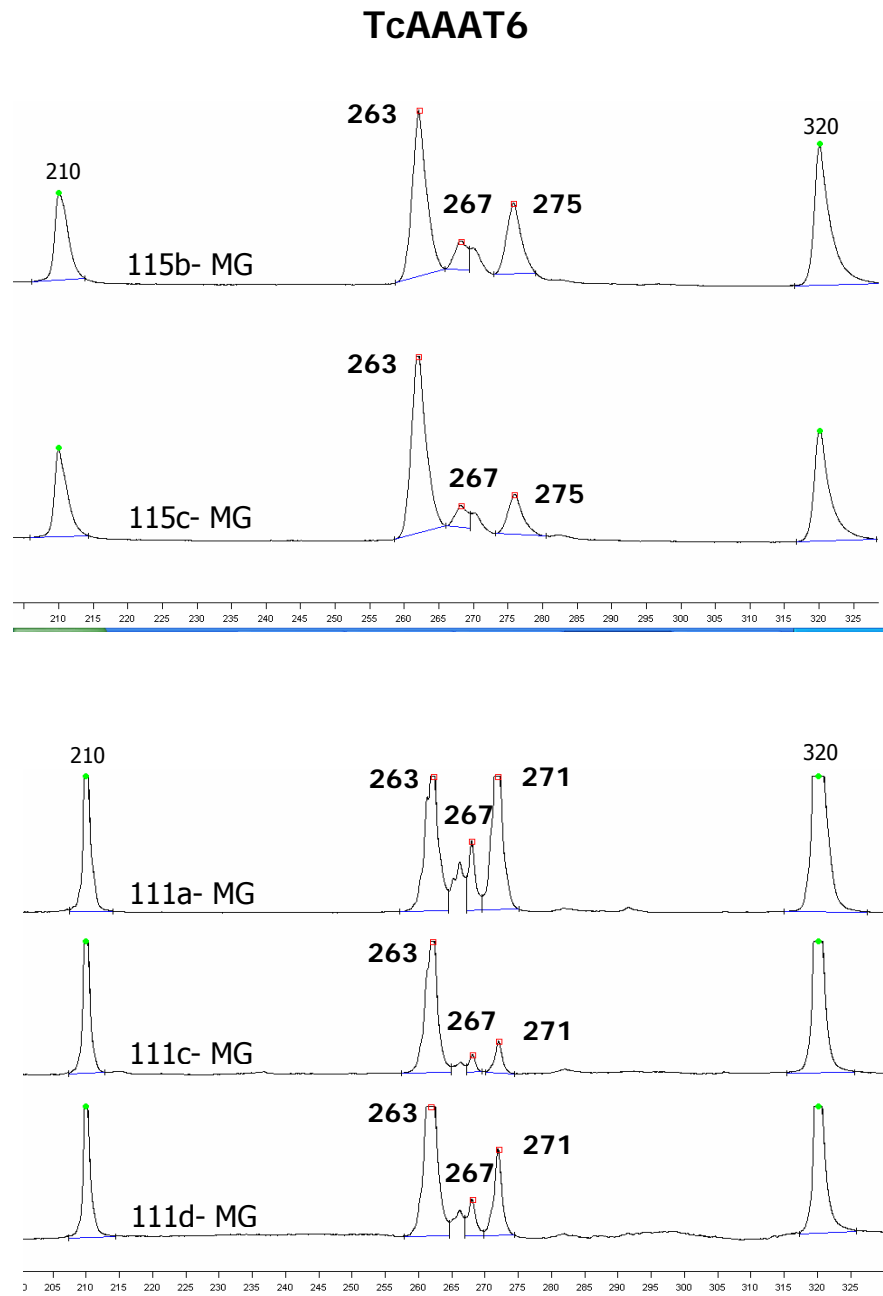


FIGURA 6- Perfis de eletrofluorogramas obtidos a partir de análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F. dos fragmentos amplificados pela técnica de PCR para o *locus* TcAAAT6 de amostras do *T. cruzi* isoladas de um mesmo paciente, mostrando perfis de microssatélites com mais de dois picos característicos de amostras policlonais ou aneuplóides para esse *locus*. Os picos das extremidades correspondem aos marcadores internos de 210 e 320 pares de base (pb). AT-antes tratamento, PT-após tratamento específico.

A natureza policlonal do *T. cruzi* também pode ser demonstrada em duas amostras procedentes de um mesmo paciente de MG (109a, 109b) e isoladas nas seguintes datas: 16/04/99 e 27/05/03. Esses dois isolados mostraram perfis de microssatélites diferentes para o *locus* SCLE11 (FIG. 7). A mesma característica foi observada em quatro amostras do paciente 116 (a, b, e, f) procedente de MG e isoladas em: 23/04/99, 14/06/00, 15/12/03, antes do tratamento, e 11/04/06, após o tratamento, respectivamente. O tamanho dos alelos para os isolados 116a, 116e, 116f foram idênticos (145/149pb, monoclonal heterozigoto) para o *locus* SCLE11. Contudo, o isolado 116b apresentou apenas o alelo de 145bp. Esses resultados sugerem que pelo menos duas populações homozigotas do parasito estariam circulando no sangue dos pacientes 109 e 116 (FIG. 7).

As TAB. 6 e 7 resumem características importantes para os diferentes *loci* de microssatélites analisados. Os *loci* TcAAT8 e TcTAT20 foram os mais variáveis, com elevado número de alelos (15 alelos de tamanhos diferentes) e com variação de tamanhos entre 238pb-298pb (TcAAT8) e de 178-238pb (TcTAT20), confirmando a existência de polimorfismos. O *locus* MCLE01 apresentou 12 alelos (112-154pb); seguido por SCLE10, SCLE11 e MCLG10 (9 alelos entre 255-291pb, 143-161pb e 171-187pb, respectivamente). Os *loci* menos variáveis foram o MCLF10 com três alelos, variando entre 182pb e 190pb, seguido por TcATT14 (quatro alelos entre 256-274pb) e TcAAAT6 (cinco alelos de 259 a 275pb). É interessante observar que o *locus* de microssatélite TcAAAT6 foi o único capaz de identificar amostras com características policlonais ou aneuplóides, embora sendo um daqueles com baixo número de alelos. O *locus* SCLE11 foi o único capaz de discriminar diferenças sutis entre amostras de *T. cruzi* isoladas de um mesmo paciente (FIG. 7).

A maioria das populações do parasito, isoladas de um mesmo paciente, demonstraram perfis de microssatélites geneticamente idênticos e monoclonais (TAB. 4 e 5). Nossos dados evidenciaram que a maior parte dos *loci* de microssatélites destacam um elevado percentual de genótipo heterozigoto, ou seja, dois alelos de tamanhos diferentes para cada um dos *locus* de microssatélites (TAB. 6 e 7).

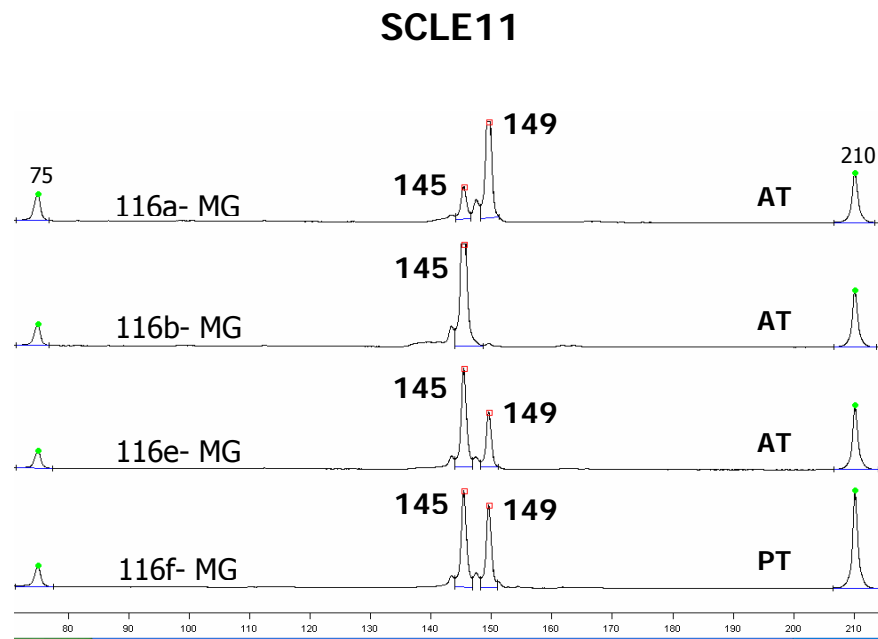
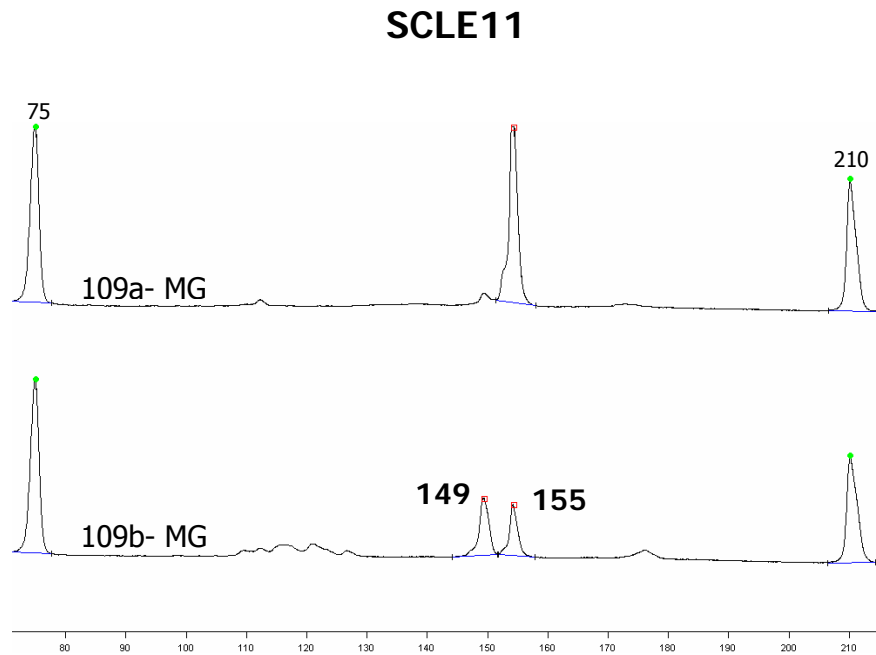


FIGURA 7- Perfis de eletrofluorogramas obtidos a partir de análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F. dos fragmentos amplificados pela técnica de PCR para o *locus* SCLE11 de amostras do *T. cruzi* isoladas de um mesmo paciente, mostrando tamanhos de alelos diferentes sugestivos de população policlonal. Os picos das extremidades correspondem aos marcadores internos de 75 e 210 pares de base (pb).

TABELA 6

Número, tamanho dos alelos (pb), percentual de amostras com genótipos heterozigotos e homozigotos, encontrados para os *loci* de microssatélites compostos por repetições de dinucleotídeos.

<i>Loci</i>	MCLF10	SCLE10	SCLE11	MCLG10	MCLE01
Número de alelos	03	09	09	09	12
Tamanho de alelos (pb)	182, 184, 190	255, 267 269, 271 273, 275 281, 283 291	143, 145 147, 149 151, 153 155, 157 161	171, 173 175, 177 179, 181 183, 185 187	112, 126 128, 130 134, 136 138, 146 148, 150 152, 154
Nº e % de genótipos heterozigotos	10 (13%)	43 (56%)	48 (62%)	36 (47%)	66 (86%)
Nº e % de genótipos homozigotos	67 (87%)	34 (44%)	29 (38%)	41 (53%)	11 (14%)

Nº-Número; %-Percentual

TABELA 7

Número, tamanho dos alelos (pb), percentual de amostras com genótipos heterozigotos e homozigotos encontrados para os *loci* de microssatélites compostos por repetições de trinucleotídeos e tetranucleotídeos.

<i>Loci</i>	TcAAT8	TcTAT20	TcATT14	TcAAAT6
Número de alelos	15	15	04	05
Tamanho de alelos (pb)	238, 241, 250 253, 256, 259 262, 265, 268 274, 277, 289 292, 295, 298	178, 181, 184 190, 193, 196 199, 202, 205 208, 214, 217 223, 226, 238	256, 262 265, 274	259, 263 267, 271 275
Nº e % de genótipos heterozigotos	40 (52%)	64 (83%)	08 (10%)	38 (49%)
Nº e % de genótipos homozigotos	37 (48%)	13 (17%)	69 (90%)	39 (51%)

Nº-Número; %-Percentual

### 5.3 Análises filogenéticas dos isolados do *Trypanosoma cruzi*

Dos 77 isolados tipados com nove *loci* de microssatélites (MCLF10, SCLE10, SCLE11, MCLG10, MCLE01, TcAAT8, TcTAT20, TcATT14, TcAAAT6), os dados de 32 populações monoclonais do *T. cruzi* (um isolado de cada paciente) foram analisados filogeneticamente pelos métodos de máxima parcimônia e UPGMA. Apenas duas amostras dos pacientes 109 (a, b) e 116 (a, b) fizeram parte dessa análise, já que foram detectadas diferenças sutis para o *locus* SCLE11. Os clones de referência SO3 cl5, COL1.7G2, CL Brener e as cepas JG e 3869 foram adicionados às análises para comparações. Inicialmente, os tamanhos dos alelos (TAB. 4 e 5) para cada uma das amostras foram convertidos em números de repetições. Isso foi possível, por comparação com os números de repetições presentes em cada *locus* no clone de referência do projeto genoma de *T. cruzi* (CL Brener). A TAB. 8 mostra as 32 amostras analisadas filogeneticamente e, o número de repetições para nove *loci* de microssatélites.

Para as análises filogenéticas, as amostras dos pacientes 111 (a, c, d) e 115 (b, c), identificadas como policlonais ou aneuplóides (FIG. 6) foram excluídas da análise para construção das árvores. Teoricamente, tais amostras são formadas por uma mistura de populações do parasito que são geneticamente distintas. Nesse contexto, a amplificação de microssatélites fornece os tamanhos dos alelos presentes na população multiclonal, os quais, entretanto, não são capazes de separar os alelos pertencentes aos diferentes clones. Assim, o modelo de mutação de um passo, assumido em nossas análises, não pode ser aplicado para o cálculo da distância genética dessas amostras.

A FIG. 8 representa a topologia de uma das árvores mais parcimoniosas encontradas pelo programa PHYLIP. Como esperado, os genótipos obtidos com a análise dos nove *loci* polimórficos de microssatélites permitiu separar os isolados do *T. cruzi*. Nessa árvore identificamos um grupo principal, que reuniu as amostras que apresentaram rDNA do tipo 1 e haplogrupo mitocondrial C, característicos da linhagem *T. cruzi* II, destacando uma estreita correlação entre amostras do parasito isoladas de pacientes chagásicos crônicos. Entretanto, o isolado 006 (híbrido) foi agrupado num braço discreto, juntamente com cepas de referência (clone CL Brener e SO3 cl5) também com características híbridas. O isolado 177 identificado como pertencente à linhagem *T. cruzi* III, permaneceu agrupado com a cepa de referência 3869, sabidamente *T. cruzi* III. Curiosamente, as amostras do paciente 116 (a, b) ficaram agrupadas num braço discreto nessa árvore, ou seja, encontram-se afastadas das demais amostras pertencentes à linhagem *T. cruzi* II.

As mesmas amostras foram analisadas pelo método UPGMA (FIG. 9), e a topologia da árvore resultante foi semelhante àquela obtida pelo método de máxima parcimônia. Da mesma

forma que na rede de Wagner, na árvore construída por UPGMA podemos observar um grupo geneticamente bem correlacionado de amostras pertencentes à linhagem *T. cruzi* II, além de um segundo ramo discreto, contendo amostras com características híbridas. A amostra 177 e a cepa de referência 3869, ambas associadas à linhagem *T. cruzi* III ficaram agrupadas separadamente, assim como, o clone COL1. 7G2 (representativo da linhagem *T. cruzi* I). Por outro lado, nessa árvore, observamos que as amostras do paciente 116 (a, b), ficaram agrupadas no mesmo ramo que as demais amostras pertencentes à linhagem *T. cruzi* II.

A topologia das árvores pela análise de nove *loci* de microssatélites em 32 amostras monoclonais do *T. cruzi* indicou que não há associação entre as formas clínicas (FIG. 10), sexo, idade do paciente, número de tubos positivos na hemocultura e distribuição geográfica com os fatores genéticos do parasito.

TABELA 8  
Número de repetições identificadas para cada *locus* de microssatélite em 37 isolados do *T. cruzi*

<i>Loci</i>	MCLF10	SCLE10	SCLE11	MCLG10	MCLE01	TcAAT8	TcTAT20	TcATT14	TcAAAT6
<b>Controles: cepa* e clones** de referência do <i>T. cruzi</i></b>									
**CL Brener	08/14	09/28	15/15	08/08	09/09	08/23	07/21	12/14	06/06
**COL1. 7G2	09/10	18/19	08/08	01/01	12/12	02/02	07/07	08/08	04/04
**SO3 cl5	08/11	19/36	13/13	07/07	09/09	09/09	20/20	12/12	06/08
*JG	08/08	27/28	11/13	08/08	11/12	13/13	10/19	11/11	08/09
*3869	10/13	14/14	15/19	07/09	11/11	24/24	07/07	09/09	07/07
<b>Isolados de <i>T. cruzi</i></b>									
003 a/ MG	08/08	26/28	15/17	07/11	07/11	13/18	11/18	11/11	08/09
012 a/ MG	08/08	27/27	14/16	10/10	07/08	13/13	10/15	11/11	08/09
013 a/ MG	08/08	26/28	14/14	10/10	10/19	10/12	11/16	12/12	06/09
019 a/ MG	08/08	27/36	13/17	08/08	07/13	12/18	10/11	12/12	08/09
029 a/ MG	08/08	26/28	11/13	07/07	13/13	17/17	16/19	12/12	09/09
044 a/ MG	08/08	27/36	13/13	08/11	12/17	05/05	12/18	11/11	08/09
050 b/ MG	09/09	24/24	16/16	08/12	11/13	13/17	11/19	12/12	08/09
053 a/ MG	09/09	25/25	11/13	07/07	09/12	10/13	18/19	12/12	08/08
065 b/ MG	08/08	26/28	14/16	08/10	11/19	09/12	10/15	12/12	05/09
079 a/ MG	08/08	24/24	13/15	09/09	13/18	18/18	14/16	11/11	08/08
083 a/ MG	08/08	26/26	12/15	08/13	09/09	10/13	11/19	11/11	08/08
092 a/ MG	08/08	26/26	11/11	08/08	11/13	09/09	15/15	12/12	05/09
103 a/ MG	08/08	26/28	10/13	05/12	09/18	12/12	19/19	11/11	08/08
105 a/ MG	08/08	28/32	14/16	08/08	11/20	09/12	10/10	11/11	09/09
<b>109 a/ MG</b>	08/08	25/28	<b>16/16</b>	07/07	11/13	12/12	16/19	11/11	08/09
<b>109 b/ MG</b>	08/08	25/28	<b>13/16</b>	07/07	11/13	12/12	16/19	11/11	08/09
<b>116 a/ MG</b>	08/09	26/36	<b>11/13</b>	07/12	07/09	10/13	11/18	12/12	08/08
<b>116 b/ MG</b>	08/09	26/36	<b>11/11</b>	07/12	07/09	10/13	11/18	12/12	08/08
132 a/ MG	08/08	27/27	12/13	06/07	09/20	18/18	07/11	11/11	08/09
138 a/ MG	08/08	25/26	14/15	06/08	11/11	22/22	13/22	11/11	08/08
154 a/ MG	08/09	28/28	12/19	05/05	19/21	10/10	07/13	11/11	09/09
010/ MG	08/08	25/26	16/16	07/08	09/11	11/12	10/15	12/12	08/09
177/ MG	08/08	18/18	16/16	07/07	08/09	24/25	06/07	09/12	<b>n.a*</b>
157/ GO	08/08	27/27	15/15	07/11	11/18	12/12	10/10	12/12	08/08
038/ GO	08/08	28/31	14/15	08/08	20/20	09/25	18/26	11/20	08/09
001/ GO	08/08	27/27	15/17	07/11	11/21	15/15	10/15	11/11	09/09
021C/ GO	08/08	27/28	13/14	08/08	09/20	25/25	18/26	11/11	08/08
008/ GO	08/09	28/36	13/17	07/07	11/18	10/13	10/21	09/12	05/09
006/ GO	08/12	18/36	13/13	08/08	08/09	09/23	08/21	10/15	05/08
036/ GO	08/08	24/24	14/14	08/12	07/18	15/15	15/18	11/11	08/09
145/ GO	08/08	26/28	14/16	08/10	11/19	10/12	10/15	12/12	06/09
160/ GO	08/08	28/31	13/14	08/08	18/18	06/12	10/11	12/12	09/09

**n.a\***- Não amplificou na PCR

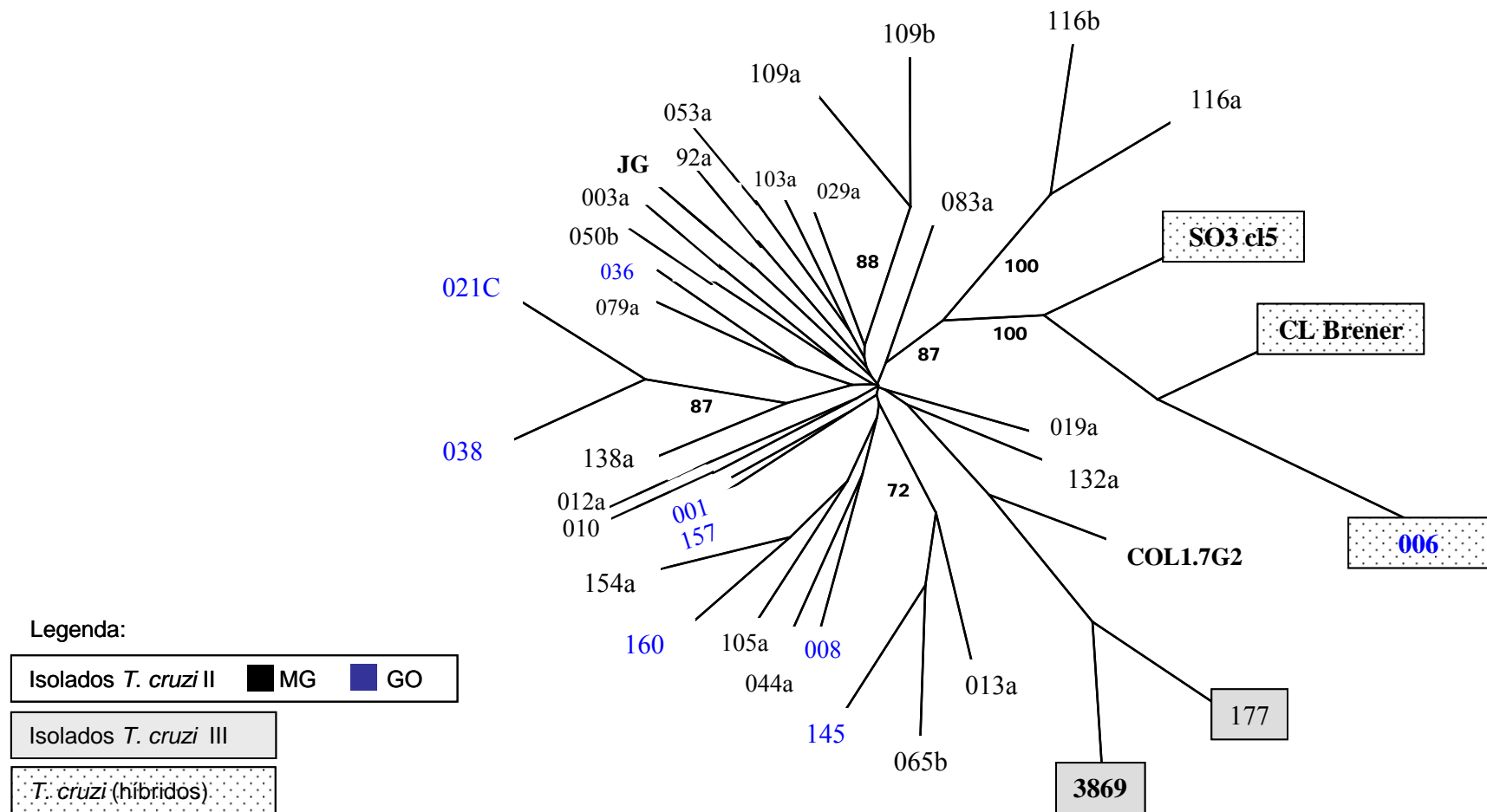
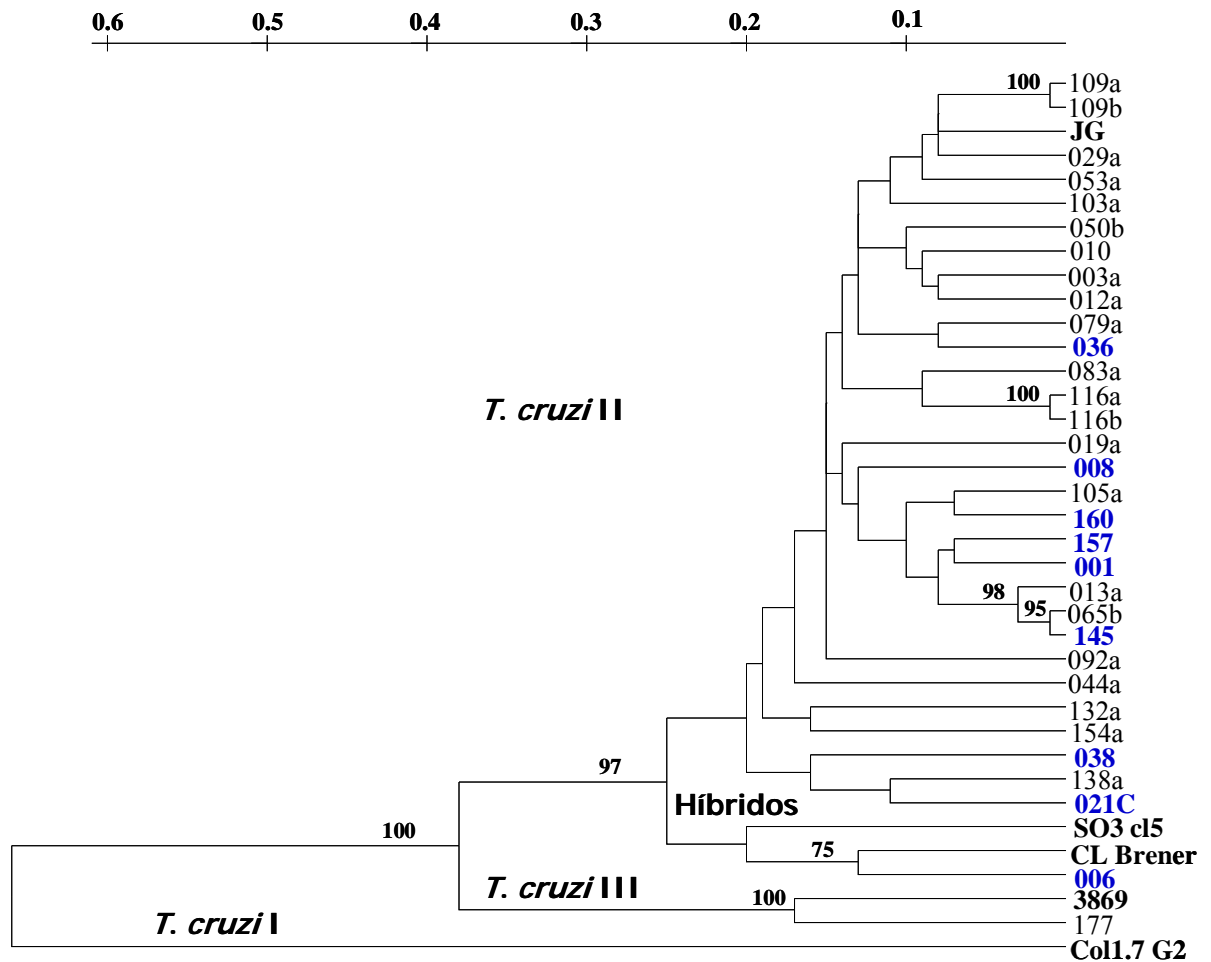


FIGURA 8- Rede de Wagner construída pelo método de máxima parcimônia, a partir dos dados da análise de nove *loci* de microssatélites (SCLE10, MCLF10, SCLE11, MCLG10, MCLE01, TcAAT8, TcTAT20, TcATT14, TcAAAT6) em 37 populações monoclonais do *T. cruzi*. Os valores de *bootstrap* acima de 70% estão destacados na árvore.



Legenda:

Isolados <i>T. cruzi</i> II	■ MG	■ GO
-----------------------------	------	------

FIGURA 9- Árvore filogenética construída por UPGMA a partir dos dados da análise de nove *loci* de microssatélites (SCLE10, MCLF10, SCLE11, MCLG10, MCLE01, TcAAT8, TcTAT20, TcATT14, TcAAAT6) em 37 populações monoclonais do *Trypanosoma cruzi*. Os valores de *bootstrap* acima de 70% estão destacados na árvore.

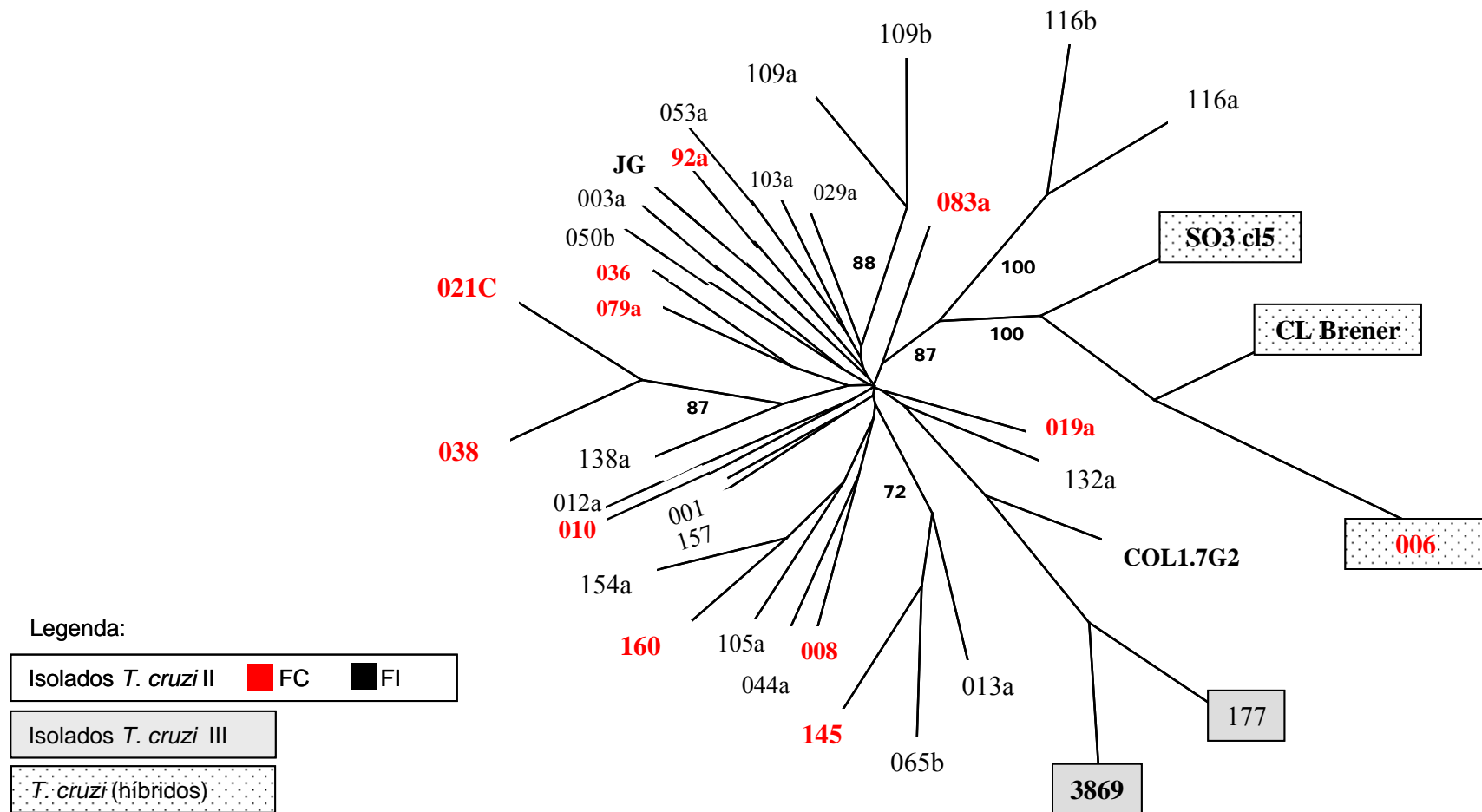


FIGURA 10- Rede de Wagner construída pelo método de máxima parcimônia, a partir dos dados da análise de nove *loci* de microssatélites (SCLE10, MCLF10, SCLE11, MCLG10, MCLE01, TcAAT8, TcTAT20, TcATT14, TcAAAT6) em 37 populações monoclonais do *T. cruzi*. Em destaque, os isolados procedentes de pacientes com a forma cardíaca (FC) e aqueles procedentes de pacientes com a forma indeterminada (FI) da doença de Chagas. Os valores de *bootstrap* acima de 70% estão destacados na árvore.

Em nosso trabalho não foram analisadas amostras do parasito representativas da linhagem *T. cruzi* I, que são preferencialmente associadas ao ciclo silvestre de transmissão do parasito. Para avaliar se a presença de outras amostras representantes das linhagens *T. cruzi* I, II, III e cepas híbridas poderiam interferir na posição dos nossos agrupamentos, duas novas árvores foram construídas pelos métodos de máxima parcimônia e UPGMA. Para essas análises, utilizamos os dados de cinco *loci* de microssatélites (SCLE10, SCLE11, MCLF10, MCLG10, MCLE01) em 33 amostras do *T. cruzi* representantes de cada uma das linhagens do *T. cruzi* (FREITAS *et al.*, 2006) em conjunto com as 32 amostras por nós analisadas, totalizando 69 amostras monoclonais do parasito.

De uma maneira geral, a topologia das árvores resultantes (FIG. 11 e 12) foram similares àquelas obtidas com a análise filogenética das 32 amostras do nosso trabalho (FIG. 8 e 9), sendo que estas permaneceram agrupadas em um único ramo principal (*T. cruzi* II). A FIG. 11 representa a topologia da rede de Wagner, em que foram identificados cinco ramos principais. O primeiro grupo reuniu populações diferentes, associadas ao ciclo silvestre de transmissão (haplogrupo mitocondrial A, rDNA 2, *T. cruzi* I, DTU I). Outro grupo reuniu as amostras pertencentes à linhagem *T. cruzi* II (haplogrupo mitocondrial C, rDNA 1, DTU IIb). As amostras associadas à linhagem *T. cruzi* III (haplogrupo mitocondrial B, DTU IIa/c) ficaram agrupadas separadamente. Entretanto, as amostras híbridas foram distribuídas em dois ramos discretos, DTU IIc e IIe.

A análise das mesmas amostras pelo método UPGMA (FIG. 12) mostrou grande semelhança na topologia da árvore quando comparada à rede de Wagner. Nessa árvore observamos quatro ramos principais associados às linhagens *T. cruzi* I (DTU I), II (DTU IIb), III (DTU IIa/c) e, outro que reuniu as amostras com características híbridas DTU IIc e IIe dentro de dois ramos discretos.

Para avaliar a confiabilidade dos agrupamentos, em todas as análises usamos o teste de *bootstrap* com 1000 re-amostragens. Os valores acima de 70% são mostrados nas árvores filogenéticas (FIG. 8, 9, 10, 11 e 12).

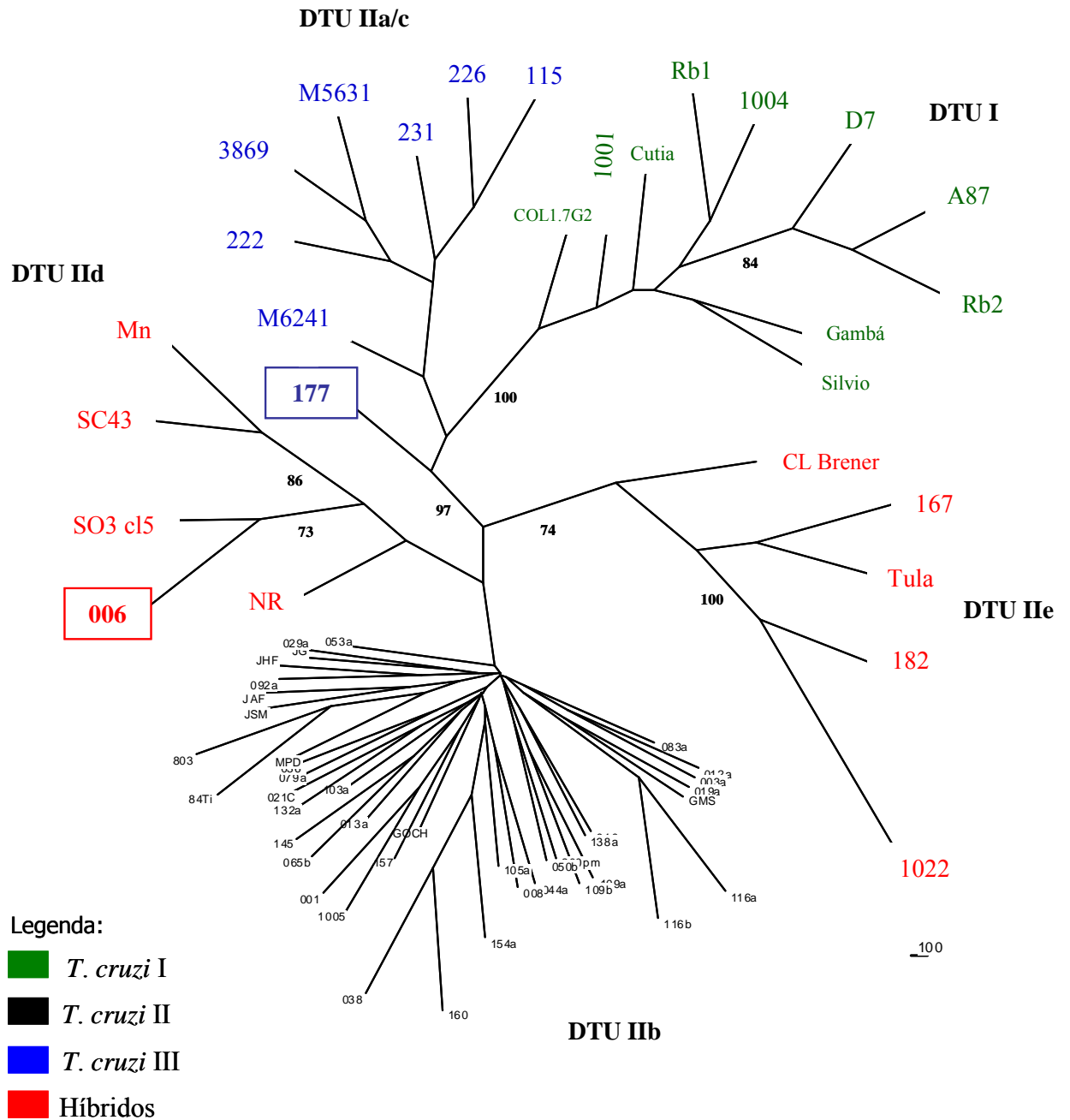


FIGURA 11- Rede de Wagner construída pelo método de máxima parcimônia a partir dos dados das análises de cinco *loci* de microssatélites (SCLE10, MCLF10, SCLE11, MCLG10, MCLE01), em 69 populações monoclonais do *Trypanosoma cruzi*. Os valores de *bootstrap* acima de 70% estão destacados na árvore.

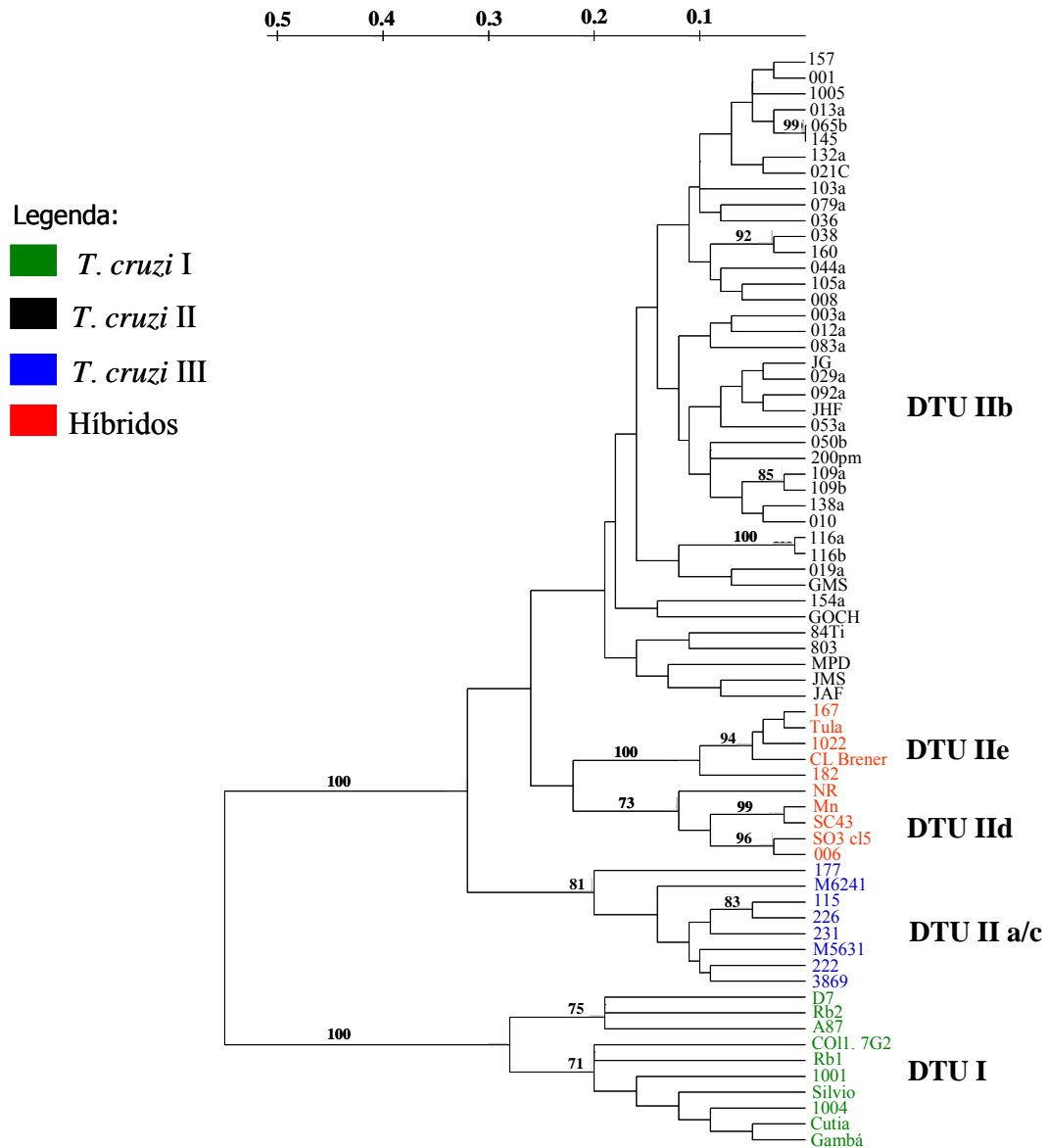


FIGURA 12- Árvore filogenética construída por UPGMA a partir dos dados obtidos das análises de cinco *loci* de microssatélites (SCLE10, MCLF10, SCLE11, MCLG10, MCLE01) em 69 populações monoclonais do *Trypanosoma cruzi*. Os valores de *bootstrap* acima de 70% estão destacados na árvore.



## 6. DISCUSSÃO

## 6. DISCUSSÃO

O *T. cruzi* é constituído por populações heterogêneas representadas por um elevado número de cepas naturais circulando nos ciclos de transmissão doméstico e silvestre, entre reservatórios, vetores e seres humanos (TIBAYRENC *et al.*, 1986). A heterogeneidade entre cepas do *T. cruzi* tem sido comprovada por caracterização biológica, bioquímica, imunológica e pela variabilidade genética entre as populações isoladas de diferentes hospedeiros e vetores (BRENER & CHIARI, 1963; CHAGAS, 1909; MACEDO *et al.*, 1992; MOREL *et al.*, 1980; STEINDEL *et al.*, 1993; TIBAYRENC & AYALA, 1988). Essa variabilidade pode estar relacionada ao seu modo de reprodução predominantemente clonal que, por sua vez, faz com que as mutações adquiridas se acumulem independentemente, aumentando a distância genética entre as populações do *T. cruzi* e determinando a diversidade observada dentro de cada uma das grandes linhagens (TIBAYRENC *et al.*, 1986).

Desde 1999, uma clara divisão do *T. cruzi* em pelo menos duas linhagens principais (que apresentam elevada divergência filogenética e características distintas epidemiológicas) tem sido reconhecida, e as linhagens foram denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANONYMOUS, 1999). No entanto, algumas cepas não puderam ser classificadas em nenhuma das duas linhagens, e outras subdivisões foram propostas utilizando marcadores moleculares com diferentes taxas evolutivas (AUGUSTO-PINTO *et al.*, 2003; BRISSE *et al.*, 2000; FREITAS *et al.*, 2006; MACHADO & AYALA, 2001). Recentemente, foram descritos novos aspectos da estrutura populacional do *T. cruzi*. Freitas *et al.* (2006) propuseram a existência de três linhagens ancestrais em *T. cruzi*, denominadas *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e *T. cruzi* III. Além disso, as cepas híbridas do *T. cruzi*, as quais não foram incluídas na nomenclatura *T. cruzi* I e II proposta em 1999, tiveram uma posição definida dentro das análises, formando, claramente, um quarto grupo de cepas.

Anteriormente, nosso grupo analisou a variabilidade genética de 61 isolados do *T. cruzi* obtidos de 47 pacientes chagásicos crônicos de diferentes áreas endêmicas do estado de Minas Gerais pela técnica de RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*), utilizando os iniciadores M13-40,  $\lambda$ gt11-F e L15996. Embora o RAPD tenha sido descrito como estratégia poderosa para a identificação de marcadores moleculares importantes em *T. cruzi*, nossos resultados mostraram agrupamentos discretos em relação aos perfis de RAPD e não puderam ser agrupados de acordo com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Entretanto, a análise comparativa dos perfis de RAPD das populações do *T. cruzi* procedentes de pacientes com dois isolados em diferentes períodos de tempo apresentaram padrões genéticos variados e sugestivos de populações monoclonais e/ou policlonais (D'ÁVILA *et al.*, 2006). Sendo assim,

nossa primeira abordagem neste trabalho foi a de ampliar o emprego de marcadores moleculares nucleares (rDNA 24S $\alpha$ , SL-IR e microssatélites) e mitocondrial COII (kDNA), além do número de isolados do *T. cruzi*. Essas duas abordagens visaram principalmente a um melhor entendimento da estrutura e dinâmica populacional do *T. cruzi* durante a fase crônica da doença de Chagas. A importância de ampliarmos o número de amostras está relacionada à confiabilidade dos resultados, uma vez que algumas características presentes em apenas alguns isolados poderiam passar despercebidas nas análises com poucas amostras.

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que, muitas vezes, a caracterização genética com apenas um marcador molecular não é suficiente para classificar as amostras do *T. cruzi* dentro das linhagens principais (*T. cruzi* I, II ou III). Em nosso trabalho, os isolados de dois pacientes, um do estado de MG e outro de Goiás, apresentaram produtos de PCR com 110pb (rDNA 2) e 110/125pb (rDNA 1/2), supostamente associado às linhagem *T. cruzi* I e a cepas híbridas, respectivamente. Em relação à tipagem do gene COII, esses isolados correspondem ao haplogrupo mitocondrial B associados à linhagem *T. cruzi* III ou a populações híbridas. Finalmente, a tipagem dos genes SL-IR revelou que os isolados do *T. cruzi* procedentes do paciente de MG foram associados à linhagem *T. cruzi* III, enquanto os isolados do paciente de GO estão relacionados ao grupo de cepas híbridas.

Souto *et al.* (1996) e Brisse *et al.* (2001) já haviam demonstrado que a caracterização das linhagens do *T. cruzi* baseadas na análise de um único marcador (por exemplo, mini-exon ou rDNA 24S $\alpha$ ) pode apresentar resoluções insuficientes e levar a re-interpretações errôneas no cenário evolucionário e epidemiológico do *T. cruzi* (BRIONES, *et al.*, 1999; ZINGALES, *et al.*; 1998). Outros autores acreditam que o maior problema relacionado aos estudos epidemiológicos pode estar relacionado à metodologia empregada para a caracterização molecular das amostras do *T. cruzi*, em que todas as metodologias genéticas aplicadas ao estudo de evolução apresentam vantagens e desvantagens. Para aumentar substancialmente o nível de resolução de uma hipótese a ser analisada, sobretudo no que se refere à tipagem de cepas e análise filogenética das mesmas, é necessário ampliar o número de marcadores genéticos que apresentem diferentes taxas evolutivas (TIBAYRENC & AYALA, 1999).

Atualmente, a metodologia baseada na amplificação do domínio D7 do gene rDNA 24S $\alpha$  tem sido amplamente utilizada para a caracterização do polimorfismo genético do *T. cruzi* com a finalidade de discriminar entre duas das linhagens principais desse parasito. Esse marcador é de fácil análise e apresenta boa correlação entre as linhagens *T. cruzi* I e II; no entanto, pode apresentar resultados inconclusivos ou interpretações equivocadas. Recentemente foi demonstrada a presença de produtos de PCR com tamanhos diferentes dos

alelos típicos de rDNA 1 (125pb) e rDNA 2 (110pb), como 117/119pb (PIMENTA, 2002) e 120/130pb (BRISSE *et al.*, 2001). Ainda explorando o marcador rDNA 24S $\alpha$ , vale ressaltar que a presença simultânea dos alelos rDNA 1 e 2 em uma mesma amostra do parasito não permite diferenciar com segurança uma cepa híbrida de uma mistura de populações que contenham os dois alelos. Apesar de os rDNA 1 e 2 estarem preferencialmente associados à linhagem *T. cruzi* II e I, respectivamente, em alguns momentos, os resultados podem ser de difícil interpretação, isso ocorre porque algumas cepas híbridas podem ser erroneamente classificadas dentro de uma dessas duas linhagens (SOUTO & ZINGALES, 1993; SOUTO *et al.*, 1996).

Outras metodologias utilizadas para a tipagem de isolados do *T. cruzi*, quando empregadas sozinhas, também podem apresentar resultados de difícil interpretação. Na tipagem dos genes de mini-exon, por exemplo, o alelo do tipo 2 (350pb) não necessariamente está ligado à linhagem *T. cruzi* I. Dessa maneira, parte dos parasitos isolados de humanos caracterizados na literatura como pertencentes à linhagem *T. cruzi* I podem não pertencer de fato a essa linhagem (SOUTO *et al.*, 1996). Um exemplo clássico é o clone CL Brener, que por muito tempo foi associado à linhagem *T. cruzi* II, por apresentar o alelo de rDNA 1, 125pb e mini-exon, 300pb e, devido à perda alélica, não mais apresenta ambos os amplicons, quando na realidade apresenta características de população híbrida (CANO *et al.*, 1995; EL-SAYED *et al.*, 2005). Existem ainda amostras do *T. cruzi* que apresentam discrepâncias entre as tipagens pelos diversos marcadores, parecendo corresponder às cepas naturalmente híbridas e que também estão passíveis de serem classificadas erroneamente como *T. cruzi* I ou *T. cruzi* II. Como exemplo, temos a cepa SC43, tipada como rDNA 2 (*T. cruzi* I, 110pb) e mini-exon tipo 1, 300pb, *T. cruzi* II (SOUTO *et al.*, 1996) e, posteriormente, associada à população de cepas híbridas (FREITAS *et al.*, 2006).

A análise do polimorfismo do gene citocromo oxidase subunidade II (COII) permite distinguir as linhagens *T. cruzi* I (haplótipo A) e II (haplótipo C); entretanto, esse marcador não diferencia as amostras da linhagem *T. cruzi* III das cepas híbridas, pois elas apresentam o mesmo perfil de restrição para o gene COII, haplótipo B (FREITAS *et al.*, 2006).

Outro aspecto importante em nosso trabalho foi a confirmação de que as cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* II estão associadas à infecção humana, pelo menos nas regiões endêmicas estudadas (MG e GO). De fato, Freitas *et al.* (2005), utilizando uma estratégia de *hemi-nested* PCR em tempo real, elaborada para a amplificação dos alelos do gene rDNA 24S $\alpha$  diretamente em tecidos de pacientes chagásicos (MG), demonstraram a predominância de alelos típicos de cepas *T. cruzi* II no coração, esôfago e cólon. Por outro

lado, não podemos descartar a possibilidade de outras linhagens serem infectantes e desencadear a doença no homem, devido ao encontro em nosso estudo da associação da linhagem *T. cruzi* III e de cepas híbridas com as manifestações clínicas da doença em amostras do *T. cruzi* isoladas de pacientes com a forma indeterminada e cardíaca, respectivamente. Alguns autores já haviam evidenciado a presença da linhagem *T. cruzi* III no ciclo doméstico de transmissão, associada a diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas humana (FREITAS *et al.*, 2006). A presença do tipo mitocondrial B e mini-exon (SL-IR fragmento de ~150-157pb), característico das cepas híbridas, também foi evidenciada em casos de transmissão congênita da doença na Argentina e no Rio Grande do Sul (BURGOS *et al.*, 2007; VALADARES, 2007). Dados anteriores sugeriram que cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* III (Z3 ou IIc) raramente estariam associadas à infecção humana, sendo geralmente encontradas no ambiente silvestre e, até o momento, exclusivamente na região amazônica. Essa linhagem apresenta uma diversidade clonal notavelmente maior do que aquelas isoladas de humanos (OLIVEIRA *et al.*, 1997; PIMENTA, 2002).

No Brasil e Argentina, a linhagem *T. cruzi* I é raramente isolada do sangue periférico de pacientes na fase crônica (ZINGALES *et al.*; 1998). Por outro lado, dados recentes mostraram parasitos caracterizados como linhagem *T. cruzi* I em um paciente brasileiro com cardiopatia chagásica crônica e em outro paciente com AIDS (BURGOS *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2006a). Embora a presença de cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* I em pacientes chagásicos crônicos seja rara no Brasil e na Argentina, Añez *et al.* (2004) mostraram que a maior parte das populações do *T. cruzi* isoladas do sangue periférico de pacientes venezuelanos com manifestações clínicas graves da doença de Chagas aguda foram tipadas como *T. cruzi* I. Essa linhagem também é predominante na região amazônica brasileira, onde a doença tem sido considerada emergente e relacionada, provavelmente, à contaminação oral. Dessa forma, tem sido admitido que as cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* I podem infectar humanos e causar a doença de Chagas, desde casos assintomáticos a fatais na fase aguda e, também, a doença cardíaca na fase crônica (COURA *et al.*, 2002). Recentemente, Zafra *et al.* (2008) evidenciaram, pela primeira vez, a presença da linhagem *T. cruzi* II diretamente do sangue de 9.9% pacientes chagásicos colombianos. Esse achado sugere que as duas linhagens, *T. cruzi* I e II, estão envolvidas na patogênese, morbidade e epidemiologia da doença de Chagas na Colômbia.

A existência de um tropismo tecidual do *T. cruzi* por diversos tipos celulares com localização preferencial em determinados órgãos ou tecidos do hospedeiro foi evidenciada por Melo & Brener (1978) e Andrade (1985). A explicação mais provável para o tropismo

tecidual seria por meio das interações moleculares entre a superfície celular dos clones invasores do parasito e dos tecidos do hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 1997). Portanto, Macedo & Pena (1998) propuseram o modelo histotrópico clonal, mediante a evidência já demonstrada de que o *T. cruzi* é um protozoário de estrutura e evolução clonal (TIBAYRENC & AYALA, 1988). Assim, após a penetração do *T. cruzi* nos tecidos humanos, algumas populações poderiam desaparecer, enquanto outras poderiam invadir diferentes tecidos, as quais seriam responsáveis pelas variadas manifestações clínicas na doença de Chagas. Experimentalmente tem sido demonstrada a distribuição diferencial de populações do *T. cruzi* geneticamente distintas em camundongos infectados com misturas de populações do parasito (cepa JG e clone Col1. 7G2). A cepa JG foi encontrada predominantemente no coração dos animais, enquanto o clone Col1. 7G2 foi detectado no reto, diafragma, esôfago, cérebro e sangue (ANDRADE *et al.*, 1999). Vago *et al.* (2000), usando a técnica LSSP-PCR, examinaram tecidos de 13 pacientes com cardiopatia chagásica e tecido esofágico de quatro pacientes com megaesôfago e demonstraram diferentes assinaturas gênicas para o kDNA, sugerindo que a variabilidade do parasito pode determinar diferentes tropismos e formas clínicas no homem.

Em face da confirmação de que cepas do *T. cruzi* possuem tropismo diferencial para os diferentes tecidos do hospedeiro humano, torna-se cada vez mais importante o entendimento das populações naturais do *T. cruzi* quanto à sua natureza monoclonal ou policlonal e a sua constituição de clones. Outro aspecto importante que precisa ser avaliado é a hipótese de que os parasitos obtidos do sangue e amplificados em meio de cultura acelular não representem as populações do *T. cruzi* presentes no hospedeiro, além das freqüentes infecções mistas encontradas nos seres humanos. Durante o processo de isolamento do *T. cruzi*, alguns clones podem ser selecionados por não se adaptarem ao novo ambiente, dificultando a correlação entre os aspectos genéticos do parasito e as características clínicas dos pacientes (BRENIÈRE *et al.*, 1989; DEANE *et al.*, 1984; LAURIA-PIRES *et al.*, 1996; MACEDO & PENA, 1998). Por isso, alguns pesquisadores enfatizam a necessidade da caracterização do parasito diretamente na lesão do tecido infectado; entretanto, devido às limitações técnicas e por questões éticas, o universo de amostras de tecidos infectados disponíveis para análises será sempre reduzido.

Em contrapartida, os perfis de assinaturas gênicas do *T. cruzi* gerados pela LSSP-PCR em diferentes tecidos, sangue, xenocultura e isolados pela hemocultura obtidos de pacientes chagásicos com megaesôfago foram bastante homogêneos. Em cinco pacientes (35.6%) foi encontrada uma identidade total das assinaturas gênicas, entre as populações presentes no

tecido, sangue e seus isolados. A caracterização genética de isolados do *T. cruzi* do sangue, líquido e isolados pela hemocultura de um paciente HIV positivo mostrou elevada homogeneidade genética sugestiva da presença de uma mesma população do parasito. Sendo assim, a caracterização genética do kDNA do *T. cruzi* diretamente do tecido ou isolados por hemocultura e/ou xenodiagnóstico não evidenciou padrões de assinaturas gênicas definidos que pudessem ser associados com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas humana, sugerindo que não houve seleção do parasito pelos métodos de isolamento; xenodiagnóstico e/ou hemocultura. Esses achados são muito importantes, pois em várias ocasiões o parasito só pode ser recuperado do sangue do paciente utilizando a técnica de hemocultura e/ou xenodiagnóstico (LAGES-SILVA, 2001).

De acordo com o exposto acima, torna-se cada vez mais importante analisar o parasito proveniente da corrente sangüínea e isolado pela técnica de hemocultura em diferentes períodos de tempo, o que aumenta a chance de recuperar diferentes subpopulações do parasito que podem estar presentes no paciente, possibilitando a análise da constituição populacional dos isolados, a comparação entre as populações isoladas no decorrer do tempo, além da importância desse parasito na patogênese da doença de Chagas. Na tentativa de evitar uma seleção de populações do parasito, por prolongada manutenção em meio de cultura acelular, os isolados do *T. cruzi* analisados neste trabalho foram submetidos a duas passagens sucessivas em meio LIT equivalentes a aproximadamente 60 dias de cultivo. A maior parte dos trabalhos realizados até o momento analisaram cepas mantidas por vários anos e até mesmo décadas em laboratório, com numerosos períodos alternados de passagens em meio de cultura acelular e criopreservados em nitrogênio líquido. Esse procedimento poderia contribuir para uma seleção indesejada de subpopulações do parasito, não representando as populações que circulam nos hospedeiros vertebrados e/ou vetores, e, provavelmente, explicaria, pelo menos em parte, o insucesso de estudos da associação parasito/formas clínicas, com a caracterização genética das diferentes populações do *T. cruzi* (OLIVEIRA *et al.*, 1997; STEINDEL *et al.*, 1993).

Adicionalmente, no presente trabalho, 75% dos isolados (77/102) do *T. cruzi* foram analisados para verificar a presença de polimorfismo em nove *loci* de microssatélites. As análises de microssatélites em diferentes cepas e clones do *T. cruzi* representam um teste simples para estimar se a população do parasito apresenta constituição monoclonal ou multiclonal (MACEDO *et al.* 2001; OLIVEIRA *et al.*, 1997, 1998, 1999). Além do mais, a utilização das análises de microssatélites em estudos de variabilidade genética em *T. cruzi* tem demonstrado que esses marcadores são ideais tanto para análise filogenética quanto para

identificação e caracterização das amostras. Os microssatélites são marcadores de evolução rápida, uma vez que as taxas de mutação nesses *loci* são significativamente maiores que a taxa de substituição de nucleotídeos. Dessa forma, são capazes de apontar diferenças sutis entre as cepas do *T. cruzi* que não são percebidas por outros marcadores de evolução lenta, tais como rDNA e o mini-exon. Sabe-se que os microssatélites estão localizados no genoma nuclear e, na maioria das vezes, não são expressos, o que os torna livres de pressões seletivas que podem ocorrer com diferentes marcadores (por exemplo, isoenzimas). Ao contrário de outros marcadores aleatórios como RAPD, os microssatélites são unilocais, isto é, estão presentes em apenas uma cópia por genoma haplóide; isso faz com que possamos determinar exatamente os alelos presentes em uma cepa, o que permite realizar inferências populacionais.

Dos nove *loci* de microssatélites analisados, aqueles constituídos por repetições de dinucleotídeos (SCLE10, SCLE11, MCLF10, MCLG10, MCLE01) foram descritos por Oliveira *et al.* (1998). Os trinucleotídeos (TcATT14, TcAAT8, TcTAT20) e o *locus* TcAAAT6 constituído por repetições de tetranucleotídeos foram descritos por Valadares *et al.* (2008). Para todos os *loci*, utilizando iniciadores que flanqueiam a repetição, as amostras do *T. cruzi* apresentaram produtos de amplificação de diferentes tamanhos, confirmando a presença de polimorfismos. Os *loci* TcAAT8 e TcTAT20 foram os mais polimórficos, ou seja, detectamos o maior número de alelos (15 alelos de tamanhos diferentes), o que ratifica os dados relatados por Valadares (2007). Por outro lado, para os *loci* MCLF10, TcATT14 e TcAAAT6 detectamos o menor número de alelos três, quatro e cinco, respectivamente. Entretanto, o grau de polimorfismo de um *locus* é determinado não só pela quantidade de alelos detectados, mas também pela frequência relativa de cada um deles.

A amplificação de microssatélites utilizando DNA extraído de um *pool* de parasitos, apresenta elevada sensibilidade (~100%), enquanto que a análise de DNA do *T. cruzi* diretamente em amostras de tecidos de animais e humanos infectados ou em células únicas do *T. cruzi* separadas por FACS *Cell Sorter*, essa sensibilidade varia de 30 a 40% (o que depende do *locus* analisado), devido a escassez do parasito durante a fase crônica da doença de Chagas e a quantidades de DNA tão pequenas (PIMENTA, 2002; VALADARES *et al.*, 2008; VALADARES, 2007). Em nosso trabalho, por exemplo, apenas o *locus* TcAAAT6 não foi capaz de amplificar todas as amostras do *T. cruzi*. Duas amostras isoladas de um mesmo paciente (177 e 205) não amplificaram para esse *locus*, mesmo após diversas tentativas. Uma das possibilidades é que os sítios de anelamento dos iniciadores desenhados para a amplificação do *locus* TcAAAT6 estejam localizados em regiões polimórficas do genoma do *T. cruzi*. Todos os iniciadores foram desenhados com base na seqüência obtida a partir de um

único clone do *T. cruzi*, o clone CL Brener e sendo assim, não podemos descartar a possibilidade de que em outros clones do parasito, a região de ligação dos iniciadores contenha mutações que impeçam o correto anelamento e, conseqüentemente, a amplificação dos *locus* de microssatélites.

A análise de um número elevado de *loci* de microssatélites aumenta a chance de detectarmos diferenças, mesmo que sutis, entre as amostras do *T. cruzi* isoladas de um mesmo paciente em diferentes períodos de tempo. Setenta e duas amostras do *T. cruzi* (93,5%) analisadas em nosso trabalho são formadas por populações homogêneas e monoclonais, ou seja, com dois alelos do mesmo tamanho (homozigota) ou dois alelos de tamanhos diferentes (heterozigota) para cada um dos *locus* de microssatélites. A maioria das populações do parasito isolada de um mesmo paciente demonstraram perfis de microssatélites geneticamente idênticos, isto é, a análise do DNA das amostras do *T. cruzi* por um conjunto de *loci* de microssatélites mostrou que o parasito isolado num primeiro momento é o mesmo quando comparado aos demais isolados de um mesmo paciente, incluindo as amostras isoladas de seis pacientes, das quais o parasito foi obtido antes e após tratamento específico. Esses dados sugerem que os pacientes tratados foram infectados com apenas uma população do parasito e que, nesse caso, mostraram-se resistentes à droga.

A maior parte dos *loci* de microssatélites detectou um elevado percentual de genótipo heterozigoto e, portanto, sem indicativo de multiclonalidade. Essa característica já foi observada por outros autores (MACEDO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 1997, 1998, 1999; PIMENTA, 2002; VALADARES *et al.*, 2008). Ressaltamos que, quando observamos um genótipo heterozigoto numa PCR convencional e assumimos que uma população é homogênea (monoclonal heterozigota), na verdade podemos estar mascarando uma mistura de dois genótipos homozigotos diferentes. A análise de populações artificialmente heterogêneas tem demonstrado que a separação de células do *T. cruzi* por meio do FACS é uma tecnologia poderosa e capaz de identificar os diferentes clones presentes em uma população mista. Dessa forma, o FACS surge como uma metodologia de grande utilidade nos estudos populacionais do *T. cruzi*, principalmente no que diz respeito ao estudo da composição clonal de isolados naturais do parasito constituídos por diferentes populações (MACEDO *et al.*, 2001; PIMENTA, 2002). De fato, a cepa A316A R7 isolada do *Triatoma infestans* mostrou genótipo heterozigoto com alelos de 251 e 275pb para o *locus* TcAAAT6 na PCR convencional; contudo, a análise da estrutura populacional pela amplificação de *loci* de microssatélites em células únicas separadas por FACS identificou a presença de duas populações homozigotas diferentes (VALADARES, 2007).

Dados da literatura mostram que algumas cepas do *T. cruzi* exibem mais de dois alelos para um determinado *locus* de microssatélite, o que tem sido interpretado como indicativo de policlonalidade ou aneuploidia (OLIVEIRA *et al.*, 1997, 1998, 1999; PIMENTA, 2002). A multiclonalidade ou aneuploidia parece ser mais freqüente na fase aguda do que na crônica e, ainda, relacionada com a procedência do isolado, sendo mais freqüente nos triatomíneos seguida de animais silvestres e humanos (OLIVEIRA *et al.* 1997, 1998, 1999; PIMENTA, 2002). Num indivíduo infectado com essas cepas, pode ocorrer, ao longo do tempo, uma seleção de subpopulações do parasito ou ainda uma distribuição tecidual diferente desses clones (VAGO *et al.*, 2000). É por essa razão que as amostras do *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos geralmente são mais homogêneas que aquelas isoladas de casos agudos ou silvestres (FERNANDES *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 1998b; MOREL *et al.*, 1980; OLIVEIRA *et al.*, 1998, 1999).

Em 6,5% (5/77) das amostras aqui analisadas, correspondentes a dois pacientes com a forma indeterminada, exibiram mais de dois picos para um único *locus* de microssatélites (TcAAAT6), sugerindo a presença de diferentes subpopulações do parasito, isto é, constituição policlonal. Todavia, não podemos descartar a possibilidade de aneuploidia para esse *locus*, a qual poderia ser confirmada pela análise de células únicas e posterior análise por PCR, uma vez que essa técnica é capaz de discriminar os diferentes clones que formam as cepas naturalmente policlonais do *T. cruzi* ou, ainda, a observação de mais de dois alelos numa única célula relacionada a aneuploidia.

É interessante salientar que, dos nove *loci* analisados, o *locus* TcAAAT6 foi o único capaz de identificar amostras com mais de dois alelos, embora sendo um daqueles menos polimórficos, mas com elevado poder discriminatório. Ao compararmos os resultados desse *locus* (TcAAAT6) com um dos mais polimórficos, o *locus* TcAAT8, verificamos que em ambos os *loci* o poder de discriminação de genótipo heterozigoto foi de 49% e 52%, respectivamente. Apesar de ter sido detectado um número relativamente pequeno de alelos, o *locus* TcAAAT6 possui elevado poder de discriminação dos alelos presentes numa amostra do *T. cruzi*, devido à elevada freqüência de seus alelos. Essa característica pode ter aumentado sua capacidade de detectar amostras aparentemente policlonais.

A natureza policlonal de amostras do *T. cruzi* também pode ser demonstrada comparando-se diferentes isolados obtidos de um mesmo paciente, como evidenciado nos casos 109 (a, b) e 116 (a, b, e, f), em que observamos uma alternância de correspondência entre os alelos para o *locus* SCLE11, com perfis de um único alelo (monoclonal homozigoto) em um isolado e de dois alelos (monoclonal heterozigoto) em outro isolado. Curiosamente, os

três primeiros isolados do paciente 116 (a, b, e) foram obtidos antes, e o isolado 116f após o tratamento específico. A diferença do perfil de microssatélite para o *locus* SCLE11 foi observado no isolado 116b, ou seja, antes do tratamento, sugerindo que esse não foi capaz de eliminar nenhuma das duas subpopulações, que acreditamos estar presente nesse paciente. Considerando a dinâmica de crescimento das diferentes subpopulações do *T. cruzi*, no momento do isolamento da amostra 116b, uma das subpopulações estaria presente numa menor quantidade, ocasionando uma flutuação das populações predominantes.

Vários estudos demonstraram que ensaios de PCR envolvendo a amplificação de *locus* dialélicos podem desencadear o fenômeno *drop-out*, no qual um dos alelos em *loci* heterozigotos não é detectável. Apesar de ambos alelos serem igualmente susceptíveis, esse fenômeno não ocorre em todas as amplificações (PIYAMONGKAL *et al.*, 2003; RAY *et al.*, 1994; RECHITSKY *et al.*, 1996). Embora o *drop-out* seja considerado um problema inerente às amplificações que envolvem quantidades limitantes de DNA, em nosso trabalho realizamos várias PCRs em momentos diferentes, para nos certificar se os resultados encontrados com as amostras dos pacientes 109 e 116 estavam relacionados à falha de amplificação. Encontramos em todas as análises o mesmo perfil de alelos para o *locus* SCLE11, sugerindo que pelo menos duas populações homozigotas do parasito estariam circulando no sangue desses pacientes, no qual, num determinado momento do isolamento, uma população é predominante sobre a outra, uma vez que no ciclo de vida do *T. cruzi* a liberação das formas tripomastigotas não ocorre de forma sincronizada (CASTRO & PRATA, 2000). Adicionalmente, se a presença da subpopulação menos freqüente for menor que 10% em relação a predominante, a sensibilidade da PCR de microssatélites pode variar de 1 a 5%, o que depende do *locus* analisado.

Várias hipóteses podem ser propostas para explicar esses resultados. A primeira delas está relacionada ao fato de que esses pacientes podem ter sido infectados por várias subpopulações do parasito. É fácil imaginar que tanto nos ciclos silvestre quanto no doméstico de transmissão do *T. cruzi*, os triatomíneos estão em contato com diferentes hospedeiros vertebrados, em que um mesmo triatomíneo pode realizar seu repasto sanguíneo em diferentes animais, e um mesmo animal pode ser infectado por vários triatomíneos. Esses diferentes eventos favorecem a circulação de populações multiclonais entre hospedeiros e vetores, as quais poderiam predominar no ambiente silvestre em consequência de um número maior de vetores e reservatórios em relação ao ciclo doméstico no qual os mamíferos atuam como um filtro biológico, selecionando parte da diversidade existente. O crescimento do parasito em cultura acelular é outro fator que pode induzir à seleção de subpopulações do

parasito com perda de clones com incapacidade de adaptação ao novo ambiente (DEANE *et al.*, 1984; GOMES *et al.*, 1998b; OLIVEIRA *et al.*, 1999). Ainda assim, a observação de multiclonalidade em amostras do parasito isoladas de pacientes chagásicos crônicos demonstra que a heterogeneidade genética persiste mesmo após o estabelecimento da doença, e está de acordo com o modelo histotrópico clonal (MACEDO & PENA, 1998).

A segunda hipótese está associada ao modelo evolucionário do *T. cruzi*. Considerando que a evolução desse parasito é predominantemente clonal, em um determinado momento, seja no hospedeiro ou no vetor, pode ter ocorrido uma mutação resultando no ganho ou na perda de uma unidade repetitiva para o *locus* SCLE11. Essa mutação pode ter originado dois clones diferentes do parasito, que evoluíram de maneira independente um do outro. Alguns pesquisadores demonstraram que a variação no número de unidades repetitivas, que caracteriza o polimorfismo de microssatélites, é inversamente proporcional ao tamanho dessa unidade, ou seja, as repetições de mono e di são mais polimórficas do que aquelas correspondentes aos de tri, tetra, penta e hexanucleotídeos (CHAKRABORTY *et al.*, 1997; SCHÖTTERER & TAUTZ, 1992). Essa hipótese é corroborada pelos dados obtidos com a amplificação do *locus* SCLE11, que detectou alternância de alelos de tamanhos diferentes e é constituído de repetições do tipo dinucleotídeos, os quais são mais susceptíveis às mutações, ou *slippage* da DNA polimerase.

Nesse contexto, nossos dados demonstraram pela primeira vez a necessidade de estudar a estrutura populacional de amostras do *T. cruzi* isoladas de um mesmo paciente em diferentes períodos de tempo, para tentar compreender a dinâmica populacional desse parasito durante a fase crônica da doença, que é de evolução lenta e de longa duração. Sabe-se que no hospedeiro poderiam estar presentes diferentes clones do parasito e, num determinado momento, a dinâmica de crescimento dos mesmos ocasionaria uma flutuação das populações circulantes com predomínio de uma população sobre a outra. Desse modo, algumas populações não seriam detectáveis por diferentes marcadores genéticos como evidenciado no caso das duas populações do *T. cruzi* isoladas da primeira paciente de Carlos Chagas, Berenice-62 (Be-62) e Berenice-78 (Be-78). Foram observadas diferenças marcantes de seu comportamento fenotípico e genotípico em camundongos, cães e em cultura acelular sendo sugerida a multiclonalidade (LANA, 1981; LANA & CHIARI, 1986; SALGADO *et al.*, 1962; VELOSO *et al.*, 2005). Posteriormente, a análise da estrutura populacional da Be-78, realizada por meio de células únicas separadas por FACS e amplificação de *loci* de microssatélites, confirmou a natureza policlonal desse isolado pela presença de pelo menos duas populações distintas (VALADARES, 2007).

Os perfis de microssatélites do *T. cruzi* também têm sido utilizados para investigações filogenéticas, mostrando uma correlação entre esses e a amplificação do domínio D7 do gene 24Sa do rDNA ribossomal (MACEDO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*; 1998, 1999) e também com amplificação e clonagem de genes do DNA mitocondrial associado com os diferentes grupos e subgrupos do *T. cruzi* (FREITAS *et al.* 2006). Nossos resultados são concordantes com os de Freitas *et al.* (2006), em que os isolados analisados foram agrupados dentro das linhagens *T. cruzi* II, III e populações híbridas. Cabe ressaltar que não detectamos amostras do parasito representantes da linhagem *T. cruzi* I que são associadas preferencialmente ao ciclo silvestre de transmissão. Em nosso trabalho, observamos uma grande similaridade genética entre as amostras do *T. cruzi* isoladas de um mesmo paciente em diferentes períodos de tempo. Esses dados estão de acordo com aqueles encontrados na literatura, em que as análises de diferentes marcadores, tais como caracterização isoenzimática, RAPD e microssatélites já haviam observado uma redução na variabilidade genética das cepas do *T. cruzi* isoladas de pacientes crônicos se comparadas às cepas obtidas do ciclo silvestre de transmissão do parasito (CARRASCO *et al.* 1996; D'ÁVILA *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 1998b; LEWICKA *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1997, 1998, 1999).

Um resultado interessante do nosso trabalho foi obtido quando utilizamos os dados de cinco *loci* de microssatélites em 33 amostras do parasito representantes de cada uma das linhagens do *T. cruzi* (FREITAS *et al.*, 2006), em conjunto com as 32 amostras por nós analisadas. Nas árvores construídas por máxima parcimônia e UPGMA, ficou claro o agrupamento das amostras dentro das linhagens I, II, III. Porém, foi possível observar uma subdivisão do grupo de cepas com características híbridas, sendo que num ramo estão as cepas DTU IId (representado pelo clone SO3 cl5) e no outro as DTU Iie (representado pelo clone Cl Brener). Esses resultados corroboram os de Freitas *et al.* (2006), que propuseram pelo menos dois eventos de hibridização entre as linhagens *T. cruzi* II e III.

No presente trabalho, avaliamos um número significativo de amostras do *T. cruzi* isoladas de um mesmo paciente na fase crônica da doença de Chagas e com caracterização clínica bem definida, além da análise de vários *loci* de microssatélites. Entretanto, não encontramos qualquer associação entre as diferentes formas clínicas e distribuição geográfica com os fatores genéticos do parasito. A soma dos dados para cada *locus* torna as diferenças e semelhanças detectadas entre os isolados bem mais sólidas e pode definir a presença de populações monoclonais ou policlonais do *T. cruzi*. Um problema que existe na literatura é definir as populações monoclonais e policlonais do *T. cruzi*. Além do mais, qual seria a importância da existência das cepas policlonais na estrutura populacional do *T. cruzi*? A

multiclonalidade das cepas do *T. cruzi* resolveria alguns dos problemas normalmente relacionados a espécies com evolução clonal. Existe a expectativa de que a reprodução assexuada por longos períodos de tempo leve à extinção, já que não existe recombinação genética e que os organismos assexuais podem acumular mutações deletérias (BERNSTEIN *et al.*, 1985). A multiclonalidade pode levar ao estabelecimento de relações mutualísticas, ou seja, interação entre os clones de uma determinada população envolvendo, por exemplo, complementação metabólica de clones defeituosos, o que levaria a uma evolução clonal mais rápida, aumentando a diversidade genética do *T. cruzi*.

A importância da análise de pelo menos quatro *loci* de microssatélites para a inferência das relações filogenéticas existentes entre as populações do *T. cruzi* tem sido assinalada, embora os *loci* mais polimórficos capazes de evidenciar a presença de populações policlonais do parasito não foram relatados (MACEDO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*; 1998, 1999; PIMENTA, 2002). Em nosso trabalho, utilizamos nove *loci* de microssatélites, que demonstraram diferentes graus de polimorfismos entre as amostras de *T. cruzi* por nós analisadas. Esses dados confirmaram que a amplificação de microssatélites é uma ferramenta poderosa para estudos moleculares do *T. cruzi* e permitiram a análise da estrutura populacional do parasito e a comparação entre as populações isoladas de um mesmo indivíduo, uma vez que essa técnica foi capaz de detectar as semelhanças e diferenças entre elas. Apesar de a PCR de microssatélites ser considerada uma excelente técnica com a capacidade de fornecer informações sobre a diversidade genética de diferentes organismos, apresenta ainda alto custo. Diante disso e também de acordo com os nossos resultados, sugerimos a análise de cinco *loci* de microssatélites, os quais geraram perfis individuais e reprodutíveis, tais como os *loci* SCLE11 e MCLE01, constituídos por repetições de dinucleotídeos, os *loci* TcAAT8 e TcTAT20, constituídos por repetições de trinucleotídeos, e o *locus* TcAAAT6, tetranucleotídeo.

Em nosso estudo, além da obtenção dos agrupamentos que concordam com as classificações previamente estabelecidas com outros marcadores genéticos de diferentes taxas evolutivas, conseguimos, ainda, detectar diferenças sutis entre as diferentes populações do *T. cruzi* presentes na corrente sanguínea dos pacientes, no momento do isolamento, o que possibilitou a detecção de populações naturalmente policlonais na fase crônica da doença. Sendo assim, nossos resultados enfatizam a necessidade e relevância do estudo de diferentes amostras do *T. cruzi* isoladas de um mesmo paciente em diferentes períodos de tempo, incluindo amostras antes e após tratamento específico, para investigar a estrutura e a dinâmica populacional do *T. cruzi* durante a fase crônica da doença de Chagas.



## 7. CONCLUSÕES

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ A caracterização genética com apenas um marcador molecular não se mostrou suficiente para classificar as amostras do *Trypanosoma cruzi* dentro das linhagens principais *T. cruzi* I, II, e III, bem como cepas híbridas.
- ✓ Os marcadores genéticos SL-IR (nuclear) e mitocondrial COII (kDNA) foram suficientes para classificar as amostras do *Trypanosoma cruzi* dentro das linhagens principais *T. cruzi* I, II, e III, e as híbridas.
- ✓ A maior parte das populações do *Trypanosoma cruzi* (96%) estão associadas à linhagem *T. cruzi* II; entretanto, os isolados do parasito procedentes de dois pacientes, um de MG e outro de GO, correspondem à linhagem III (2%) e ao grupo de cepas híbridas (2%), respectivamente.
- ✓ Setenta e duas amostras do *Trypanosoma cruzi* (93,5%) são formadas por populações homogêneas e monoclonais, ou seja, com dois alelos do mesmo tamanho (homozigota) ou dois alelos de tamanhos diferentes (heterozigota) para cada um dos *locus* de microssatélites.
- ✓ A maioria das populações do parasito isolada de um mesmo paciente demonstraram perfis de microssatélites geneticamente idênticos, incluindo as amostras isoladas de seis pacientes, das quais o parasito foi obtido antes e após tratamento específico.
- ✓ Cinco amostras (6,5%) do *Trypanosoma cruzi* isoladas de dois pacientes portadores da forma indeterminada da doença de Chagas exibiram o perfil de três picos para o *locus* TcAAAT6, sugerindo constituição multiclonal ou aneuploidia para esse *locus*.
- ✓ Seis amostras (8%) do *Trypanosoma cruzi* isoladas de dois pacientes mostraram uma alternância de correspondência entre os alelos para o *locus* SCLE11, sugestivo de flutuação das populações predominantes, onde pelo menos duas populações homozigotas do parasito estariam circulando no sangue desses pacientes.
- ✓ Os *loci* de microssatélites SCLE11 e TcAAAT6 foram os que apresentaram maior poder discriminatório dos alelos presentes nas amostras do *Trypanosoma cruzi*.

✓ O perfil genético dos isolados do *Trypanosoma cruzi* procedentes de pacientes chagásicos crônicos de diferentes áreas endêmicas dos estados de Minas Gerais e Goiás não pode ser correlacionado com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, H. M.; MURTA, S. M. F.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; NIRDÉ, P.; ROMANHA, A. J. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benzimidazole. *Journal of proteome research*. v. 7, p. 2357-67, 2008.

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev. Patol. Trop.*, v. 3, p. 65-121, 1974.

ANDRADE, S. G. Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 18, p. 39-46, 1985.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 30, p. 27-53, 1997.

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R. S.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J.; MACEDO A. M. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 100, p. 163-172, 1999.

AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; DA SILVA, F.M.; ROJAS, A.; CARRASCO, H.; UMEZAWA, E. S.; STOLF, A. M.; RAMÍREZ, J. L.; TEIXEIRA, M. M. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop. Med. Int. Health*, v. 9 (12), p. 1319-26, 2004.

ANONYMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94 (Supl. II), p. 513 -517, 1999.

AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S. M. R.; PENA, S. D. J.; MACHADO, C. R. Single-nucleotide polymorphism of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. *Genetics*, v. 164, p. 117-126, 2003.

AVILA, H.; SIGMA, D. S.; COHEN, L. M.; MILLIKAN, R. C.; SIMPSON, L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 48, p. 211-222, 1991.

AYALA, F. J. *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. *Biol. Res.*, v. 26, p. 47-63, 1993.

BAPTISTA, C. S.; VÊNIO, R. Z. N.; ABDALA, S.; CARRANZA, J. C.; WESTENBERGER, S. J.; SILVA, M. N.; PEREIRA, C. A. B.; GALVÃO, L. M. C.; GONTIJO, E. D.; CHIARI, E.; ZINGALES, B. Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patients isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 150, p. 236-248, 2006.

BARNABÉ, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M. Population structure and genetic epidemiology of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chaga's disease: a multilocus enzyme approach. *Parasitology*, v. 120, p. 513-526, 2000.

- BARRRET, T. V.; HOFF, R. H.; MOTT, K. E.; MILES, M. A.; GODFREY, D. G.; TEIXEIRA, R.; ALMEIDA, J. A.; SHERLOCK, I. A. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia state, Brasil. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.*, v. 74, p. 84-90, 1980.
- BERNSTEIN, H.; BYERLY, H. C.; HOPF, F. A.; MICHOD, R. E. The evolutionary role of recombinational repair and sex. *Int. Rev. Cytol.*, v. 96, p. 1-28, 1985.
- BOGLIOLO, A. R.; CHIARI, E.; SILVA-PEREIRA, R. O.; SIVA-PEREIRA, A. A. A. Comparative study of *Trypanosoma cruzi* enzyme polymorphism in South America. *Bras J Med. Biol. Res.*, v. 19, p. 673-683, 1986.
- BOGLIOLO, A. R.; LAURIA-PIRES, L.; GIBSON, W. C. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop.*, v. 61, p. 31-40, 1996.
- BORST, P.; VAN-DER-PLOEEM, M.; VAN-HOEK, J. F. On the DNA content and ploidy of trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 6, p. 13-23, 1982.
- BRANCHE, C.; OCHAYA, S.; ASLUND, L. E.; ANDERSON, B. Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 147, p. 30-8, 2006.
- BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 5, p. 220-224, 1963.
- BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 59, p. 19-26, 1965.
- BRENER, Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood stream of normal and immune mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 63, p. 215-220, 1969.
- BRENER, Z. Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *PAHO Scientific Public.*, v. 347, p. 11-21, 1977.
- BRENER, Z. Recent advances in the chemotherapy of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 79, p.149-155, 1984.
- BRENIÈRE, S. F.; CARRASCO, R.; REVOLLO, S.; APARICIO, G.; DESJEUX, P.; TIBAYRENC, M. Chagas' disease in Bolivia: clinical and epidemiological features and zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 41, p. 521-529, 1989.
- BRIONES, R. S. M.; SOUTO, R. P.; STOLF, B. S.; ZINGALES, B. 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 had implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Bioch. Pathog.*, v. 104, p. 219-232, 1999.
- BRISSE, S.; BARNABE, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineagens by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 35-40, 2000.

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterization of large of small subunit rRNA and mine-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J. Parasitol.*, v. 31, p. 1218-26, 2001.

BRISSE, S.; HENRIKSSON, J.; BARNABE, C.; DOUZER, E. J. P.; BERKVEN, D.; SERRANO, M.; DE CARVALHO, M. R.; BUCK, G. A.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Genet. Evol.*, v. 2 (3), p. 173-83, 2003.

BURGOS, J. M.; BEGHER, S.; SILVA, H. M.; BISIO, M.; DUFFY, T.; LEVIN, M. J.; MACEDO, A. M.; SCHIJMAN, A. G. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 78 (2), p. 294-7, 2008.

BURGOS, J. M.; ALTCHEH, J.; BISIO, M.; DUFFY, T.; VALADARES, H. M. S.; PICCINALI, R.; FREITAS, J. M.; LEVIN, M. J.; MACEDO, A. M.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, A. G. Direct molecular characterization of bloodstream parasite populations causing Congenital Chagas disease. *Int. J. Parasitol.*, v. 37 (12), p. 1319-27, 2007.

CAMPETELLA, O.; HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; FRASCH, A. C. C.; PETTERSSON, U. E.; CAZZULO, J. J. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 50, p. 225-234, 1992.

CANÇADO, J. R. Tratamento específico da doença de Chagas. In: CANÇADO, J.R. *Cardiopatia chagásica*, Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, p.327-355, 1985.

CANO, M. I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; CORTÉS, A.; LEVIN, M. J.; GONZÁLEZ, A.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; ZINGALES, B.; RAMIREZ, J. L.; ALONSO, C.; REQUENA, J. M.; SILVEIRA, J. F. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 71, (2), p. 273-8, 1995.

CARNEIRO, M.; CHIARI, E.; GONÇALVES, A. M.; SILVA PEREIRA, A. A.; MOREL, C. M.; ROMANHA, A. J. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop.*, v. 47, p. 35-45, 1990.

CARNEIRO, M.; ROMANHA, A. J.; CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 387-393, 1991.

CARRASCO, H. J.; FRAME, I. A.; VALENTE, S. A. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 54 (4), p. 418-24, 1996.

CASTRO, C.; PRATA, A. Absence of both circadian rhythm and *Trypanosoma cruzi* periodicity with xenodiagnosis in chronic chagasic individuals. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 33, p. 427-430, 2000.

CASTRO, C.; CRAIG, S. P.; CASTANEDA, M. Genomic organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 4, p. 273-282, 1981.

CASTRO, A. M.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; RASSI, G. G.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, v: 88, (10), p. 894-900, 2002.

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

CHAKRABORTY, R.; KIMMEL, M.; STIVERS, D. N.; DAVISON, L. J.; DEKA, R. Relative mutations rate at di-, tri- e tetranucleotide microsatellite loci. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 94, p. 1041-1046, 1997.

CHIARI, E.; DIAS, J. C. P.; LANA, M.; CHIARI, C. A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 22, p. 19-23, 1989.

CLARK, C. G.; PUNG, O. J. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 66, p. 175-179, 1994.

Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, suplemento III, p. 1-30, 2005.

COURA, J. R.; ANUNZIATO, N.; WILLCOX, H. P. F. Morbidade da doença de Chagas. I Estudo de casos procedentes de vários estados do Brasil, observados no Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 78, p. 363-372, 1983.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.; FERNANDES O.; VALENTE, A. S.; MILES, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.*, v. 18 (4), p. 171-176, 2002.

CRIBB, P.; TAPIA, E.; DIOSQUE, P.; SERRA, E. Spliced leader RNA gene promoter sequence heterogeneity in CL-Brener *Trypanosoma cruzi* reference strain. *Infect. Genet. Evol.*, v. 4, (2), p. 153-7, 2004.

CUNHA-NETO, E.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; KALIL, J. Estudo da doença de Chagas: abordagem molecular. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*, v. 5, p. 217-229, 1995.

D'ÁVILA, D. A.; GONTIJO, E. D.; LAGES-SILVA, E.; MEIRA, W. S. F.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C. Random amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* isolates from chagasic patients with different clinical forms. *Parasitology Research*, v. 98, p. 455-461, 2006.

DEANE, M. P.; SOUZA, M. A.; PEREIRA, N. M.; GONÇALVES, A. M.; MOMEN, H.; MOREL, C. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analysis. *J. Protozool.*, v. 31, p. 276-280, 1984.

DEGRAVE, W.; FRAGASO, S.; BRITTO, C. Peculiar sequence organization of kinetoplast minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 27, p. 63-70, 1988.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 1-12, 2003.

DIAS, J. C. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39(4), p. 370-375, 2006.

DVORAK, J. A.; HALL, T. E.; CRANE, M. S. J.; ENGEL, J. C.; MCDANIEL, J. P.; URIEGAS, R. *Trypanosoma cruzi*: Flow cytometric analysis. In: Analysis of total DNA/organism by means of mitramycin-induced fluorescence. *J. Protozool.*, v. 29, p. 430-437, 1982.

ELIAS, M. C.; VARGAS, N.; TOMAZI, L.; PEDROSO, A.; ZINGALES, B.; SCHENKMAN, S.; BRIONES, M. R. Comparative analysis of genomic sequences suggests that *Trypanosoma cruzi* CL Brener contains two sets of non-intercalated repeats of satellite DNA that correspond to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II types. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 140 (2), p. 221-7, 2005.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews*, v. 5, p.435-445, 2004.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, v. 39, p. 783-791, 1985.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v. 309, p. 409-415, 2005.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP: Phylogeny Inference Package. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, version 3.67c, 2007.

FERNANDES, C. D.; MURTA, S. M. F.; CERÁVOLO, I. P.; KRUG, L. P.; VIDIGAL, P. G.; STEINDEL, M.; NARDI, N.; ROMANHA, A. J. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 343-351, 1997.

FERREIRA, H. O. Treatment of undetermined form of Chagas disease with nifurtimox and benznidazole. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 23, p. 209-211, 1990.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, p.755-759, 1987.

FREITAS, J. M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int. J. Parasitol.*, v. 35, p. 411-417, 2005.

FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A. C. V.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D. J. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Pathogens*, v. 2, p. 226-235, 2006.

GAUNT, M. W.; YEO, M.; FRAME, L. A.; STOTHARD, J. R.; CARRASCOS, H. J.; TAYLOR, M. C.; MENA, S. S.; VEAZEY, P.; MILES, G. A. J.; ACOSTA, N.; ARLAS, A. R.; MILES, M. A. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, v. 421, p. 936-939, 2003.

GIBSON, W. C.; MILLES, M. A. The Karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.*, v. 5, p. 1299-1305, 1986.

GOLDSTEIN, D. B.; POLLOCK, D. D. Launching microsatellites: a review of mutation process and methods of phylogenetic inference. *J. Hered.*, v. 88, p. 335-342, 1997.

GOMES, M. L.; MACEDO, A. M.; VAGO, A. R.; PENA, S. D. J.; GALVÃO, L. M. C.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp. Parasitol.*, v. 88, p. 28-33, 1998a.

GOMES, M. L.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J.; CHIARI, E. Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. *Acta Tropica*, v. 69, p. 99-109, 1998b.

GUEVARA, J. F.; BLANDÓN, R.; JOHNSON, C. M.; SOUZA, O.; LEANDRO, I. Aspectos clínicos, anatomo-patológicos y terapêuticos de la enfermedad de Chagas em Panamá. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 30, p. 200-211, 1977.

HENDERSON, S. T.; PETES, T. D. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. and Cell Biol.*, v. 12, p.2749-2757, 1992.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; MACINA, R. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J.; FRASCH, A. C.; PETERSON, U. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 42, p. 213-224, 1990.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*. v. 12, p. 108-114, 1996.

HIGO, H.; YANAGI, T.; MATTA, V.; AGATSUMA, CRUZ-REYES. A.; UYEMA, N.; MONROY, C.; KANBARA, H.; TADA, I. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in american continents: special emphasis on sexual reproduction in Central America. *Parasitology*, v. 121, ( Pt 4), p. 403-8, 2000.

JENNI, L. Sexual stages in trypanosomes and implications. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 65 (Suppl. I), p. 19-21, 1990.

JUNQUEIRA, C. V.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. Minicircule organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends. Parasitol.*, v. 21(6), p. 270-2, 2005.

KNAPIK, E.W.; GOODMAN, A.; EKKER, M. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics*, v. 8, p. 338-343, 1998.

LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIREZ, L. E.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D.; CHIARI, E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.65 (5), p.435-441, 2001.

LAGES-SILVA, ELIANE. Caracterização do *Trypanosoma cruzi* nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas, com ênfase no megaesôfago e na reativação. 2001. 144f. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

LAGES-SILVA, E.; RAMÍREZ, L. E.; PEDROSA, A. L.; CREMA, E.; GALVÃO, L. M. C.; PENA, S. D. J. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J. Clinical Microbiology*, v. 44 (6), p. 2167-2171, 2006.

LAMBRECHT, F. L. Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 7, p.346-352, 1965.

LANA, MARTA DE. Caracterização do *Trypanosoma cruzi*, cepa Berenice, isolada da mesma paciente em diferentes períodos. 1981. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1981.

LANA, M.; CHIARI, C. A. Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice-62 e Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi* isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 81, p. 247-253, 1986.

LANA, M.; CHIARI, C. A.; CHIARI, E.; MOREL, C. M.; GONÇALVES, A. M.; ROMANHA, A. J. Characterization of two isolates of *Trypanosoma cruzi* obtained from the patient Berenice, the first human case of Chagas' disease described by Carlos Chagas in 1909. *Parasitol. Res.*, v. 82, p. 257-260, 1996.

LAURIA-PIRES, L.; BOGLIOLO, A. R.; TEIXEIRA, A. R. L. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients. II. Isoenzyme and RFLP characterizations. *Exp. Parasitol.*, v. 82, p. 182-190, 1996.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic. Acid. Res.*, v. 15, p. 5323-5338, 1987a.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequences evolution. *Mol. Biol. Evol.*, v. 4, p. 203-221, 1987b.

LEWICKA, K.; BRENIERE-CAMPANA, S. F.; BARNABE, C.; DEEDT, J. P.; TIBAYRENC, M. An isoenzyme survey of *Trypanosoma cruzi* genetic variability in sylvatic cycles from French Guiana. *Exp. Parasitol.*, v. 81, p. 20-28, 1995.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Gen.*, v. 44, p. 397-401, 1989.

MACEDO, A. M.; MARTINS, M. S.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 55, p. 147-154, 1992.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas' disease. *Parasitol. Today*, v. 14, p. 119-124, 1998.

MACEDO, A. M.; PIMENTA, J. R.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. I. R.; CHIARI, E.; ZINGALES, B.; PENA, S. D. J.; OLIVEIRA, R. P. Usefulness of microsatellite typing population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 407-413, 2001.

MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99 (1), p. 1-12, 2004.

MACHADO, C. A.; AYALA, F. J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 98, p. 7396-7401, 2001.

MCDANIEL, J. P.; DVORAK, J. A. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 57, p. 213-222, 1993.

MEIRA, W. S.; GALVÃO, L. M.; GONTIJO, E. D.; MACHADO-COELHO, G. L.; NORRIS, K. A.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40 (10), p. 3735-40, 2002.

MELO, R. C. & BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.*, v. 64, p. 475-482, 1978.

MENDONÇA, M. B. A.; NEHME, N. S.; SANTOS, S. S. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology*, v. 124, p. 177-84, 2002.

MIJARES, M. S. Contribuición al estudio de la patología de la miocarditi crónica chagásica en Venezuela, morfología relación anatomoclínica. Revisión de 130 autopsias. *Arch. Hosp. Vargas*, v. 7, p. 117-212, 1965.

MILES, M. A.; TOYE, P. J.; OSWALDO, S. C.; GODFREY, D. C. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 71, p. 217-225, 1977.

MILES, M. A.; SOUZA, A.; PÓVOA, M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYÉ, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature*, v. 272, p. 819-821, 1978.

MILES, M. A.; LANHAN, S. M.; DE SOUZA, A. A.; POVOA, D. G. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 74, p. 221-242, 1980.

MILES, M. A.; APT, W. B.; WIDMER, G.; PÓVOA, M. M.; SCHOFIELD, C. J. Isoenzyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks in Chile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 78, p. 526-535, 1984.

MINOPRIO, J. L. Transtornos esofágicos en la enfermedad de Chagas. *Prensa. Med. Argentina*, v. 53, p. 1791-1797, 1966.

MONCAYO, A. Progress Towards Interruption of Transmission of Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94 (Suppl.1), p. 401-404, 1999.

MONCAYO, A. Chagas Disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern cone Countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 557-591, 2003.

MOREL, C.; CHIARI, E.; PLESSMAN, C. E.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 77, p. 6810-6814, 1980.

MOREL, C. M.; DEANE, M. P.; GONÇALVES, A. M. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol. Today*, v. 2, p. 97-101, 1986.

MURTA, S. M. F.; NOGUEIRA, F. B.; DOS SANTOS, P. F.; CAMPOS, F. M. F.; VOLPE, C.; LIARTE, D. B.; NIRDÉ, P.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; ROMANHA, A. J. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta Trop.*, v. 107, p. 59-65, 2008.

MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitol.*, v. 116, p.165-171, 1998.

MURTHY, V. K.; DIBBERN, K. M.; CAMPBELL, D. A. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Mol. Cell. Probes.*, v. 6, p. 37-243, 1992.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 76, p.5269-5273, 1979.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, R. P.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. *Parasitol. Today*, v. 13 (5), p. 196-200, 1997.

OLIVEIRA, R. P.; BROUDE, N. E.; MACEDO, A. M.; CANTOR, C. R.; SMITH, C. L.; PENA, S. D. J. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 3776-3780, 1998.

OLIVEIRA, R. P.; MELO, A.I.R.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 65-70, 1999.

PAGE, R. D. M. Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.*, v. 12, p. 357-358, 2007.

PEDROSO, A.; CUPOLILLO, E.; ZINGALES, B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 129 (1), p. 79-90, 2003.

PENA, S. D. J.; BARRETO, G.; VAGO, A. R. Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 91, p. 1946-1994, 1994.

PIYAMONGKAL, W.; BERMÚDEZ, M. G.; HARPER, J. C.; WELLS, D. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Molecular Human Reproduction*, v. 9 (7), p. 411-420, 2003.

PIMENTA, JULIANA RAMOS. Análises Filogenéticas e Populacionais em *Trypanosoma cruzi* a partir de estudos de microssatélites polimórficos de DNA. 2002. 149 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

PORCILLE, P. E.; SANTOS, M. R.; SOUZA, R. T.; VERBISCK, N. V.; BRANDÃO, A.; URMENYI, T.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; LORENZI, H.; LEVIN, M. J.; DEGRAVE, W.; FRANCO DA SILVEIRA, J. A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. *Gene*, v. 308, p. 53-65, 2003.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet. Infect. Dis.*, v. 1, (2), p. 92-100, 2001.

RASSI, J. A.; RASSI, A. Cardiopatia chagásica crônica. In: PORTO, C.C. *Doenças do coração: Prevenção e tratamento*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.798-807, 1998.

RAY, P. F.; WINSTON, R. M. L.; HANDYSIDE, A. H. Single cells analysis for diagnosis of cystic fibrosis and Lesch Nyhan syndrome in human embryos before implantation. *Molecular Biology and Human Genetic Disease*, v. 5, p.46, 1994.

RECHITSKY, S.; FREIDINE, M.; VERLINSKY, Y.; STROM, C.M. Allele drop-out in sequential PCR and FISH analysis of single cell (cell recycling). *J. Assist. Reprodu. Genet.*, v. 13, p. 115-124, 1996.

ROMANHA, A. J.; PEREIRA, A. A. S.; CHIARI, E.; KILGOUR, V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 62, p. 139-142, 1979.

ROMANHA, A. J. Heterogeneidade enzimática em *Trypanosoma cruzi*. 1982. 110 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.

SALGADO, J. A.; GARCEZ, P. N.; OLIVEIRA, C. A.; GALIZZI, J. Revisão clínica atual do primeiro caso humano descrito de Doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 4, p. 330-337, 1962.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLIN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.*, v. 90, p. 655-656, 1993.

SANTOS, M. R.; CANO, M. I.; SCHIJMAN, A.; LORENZI, H.; VAZQUEZ, M.; LEVIN, M. J.; RAMIREZ, J. L.; BRANDÃO, A.; DEGRAVE, W. M.; DA SILVEIRA, J. F. The *Trypanosoma cruzi* genome project: nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brener. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 821-828, 1997.

SCHMUÑIS, G. A. Autoimmunity in Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 8, p. 287-310, 1987.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.*, v. 20, p. 211-215, 1992.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. v. 109, p. 365-371, 2000.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.*, v. 22, p. 583-8, 2006.

SHRIVER, M. D.; CHAKRABORTY, R.; *et al.* VNTR allele frequency distribution under the stepwise mutation model: a computer simulation approach. *Genetic.*, v. 134, p. 983-993, 1993.

SILVA, L. H. P. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 4, p. 16-28, 1959.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 41, p. 363-382, 1987.

SOUTO, R. P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 62, p. 45-52, 1993.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 83, p. 141-152, 1996.

STEINDEL, M.; DIAS-NETO, E.; MENEZES, C. L. P.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, A. J. G. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 60, p. 71-80, 1993.

STUART, K.; FEAGIN, J. E. Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int. Rev. Citol.*, v. 141, p. 65-68, 1992.

STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. 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.*, v. 33, p. 205-214, 1989.

STURM, N. R.; VARGAS, N. S.; WESTENBERGER, S. J.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.*, v. 33, (3), p. 269-79, 2003.

TAIT, A. Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature*, v. 287, p. 536-538, 1980.

TAIT, A. Sexual processes in the kinetoplastida. *Parasitol.*, v. 86, p. 29-57, 1983.

TARLETON, R. L. Parasite persistence in the a etiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.*, v. 31, p. 550-554, 2001.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid. Res.*, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TEIXEIRA, M. M. G.; DA SILVA, F. M.; MARCILI, A.; UMEZAWA, E. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CUNHA-NETO, E.; KALIL, J.; STOLF, N.; STOLF, A. M. Short communication: *Trypanosoma cruzi* lineage I in endomyocardial biopsy from a north-eastern Brazilian patient at end-stage chronic Chagasic cardiomyopathy. *Trop. Med. Int. Health*, v. 11(3), p. 294-8, 2006a.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease-A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 463-491, 2006b.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 83, p. 115-119, 1986.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetically, taxonomic and epidemiological significance. *Evolution*, v. 42, p. 277-292, 1988.

TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, v. 87, p. 2414-2418, 1990.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol. Today*, v. 7, p. 228-232, 1991.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.*, v. 18, p. 405-10, 2002.

TIBAYRENC, M.; NEUBAUER, K.; BARNABÉ, C. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Sci.*, v. 87, p. 2414-2118, 1993.

TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.*, v. 36, p. 47-115, 1995.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Evolutionary genetics of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Microbes Infection*, v. 1, p. 465-472, 1999.

TOYÉ, P. J. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 68, p. 147, 1974.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; REIS, D. A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet.*, v. 348, p. 891-892, 1996a.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; ANDRADE, L. O.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; SIMPSON, A. J. G.; TOSTES, S.; PENA, S. D. J. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.*, v. 149, p. 2153-2159, 1996b.

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; REIS, D. A.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; TOSTES, S.; MOREIRA, M. C. V.; FILHO, G. B.; PENA, S. D. J. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. *Am. J. Pathol.*, v. 156, p. 1805-1809, 2000.

VALADARES, HELDER MAGNO SILVA. Análises populacionais em *Trypanosoma cruzi* baseadas em microssatélites polimórficos de DNA. 2007. 179f. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

VALADARES, H. M.; PIMENTA, J. R.; DE FREITAS, J. M.; DUFFY, T.; BARTHOLOMEU, D. C.; DE PAULA, O. R.; CHIARI, E.; MOREIRA, M. D. A. C.; FILHO, G. B.; SCHIJMAN, A. G.; FRANCO, G. R.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int. J. Parasitol.*, v. 38 (7), p. 839-50, 2008.

VALDES, A. M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N. B. Allele Frequency at Microsatellite Loci: The Stepwise Mutation Model Revisited. *Genetics Society of America*, v. 133, p. 737-749, 1993.

VAN DE PEER, Y.; DE WACHTER, Y. Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the microsoft windows environment. *Comput. Applic. Biosci.*, v. 10, p. 569-570, 1994.

VELOSO, V. M.; ROMANHA, A. J.; LANA, M.; MURTA, S. M.; CARNEIRO, C. M.; ALVES, C. F.; BORGES, E. C.; TAFURI, W. L.; MACHADO-COELHO, G. L.; CHIARI, E.; BAHIA, M.T. Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. *Parasitol. Res.*, v. 96 (6), p. 382-9, 2005.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Gen.*, v. 44, p. 388-396, 1989.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, v. 7, p. 524-530, 1990.

WESTENBERGER, S. J.; BARNABE, C.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, v. 171, p. 527-43, 2005.

WESTENBERGER, S. J.; CERQUEIRA, G. C.; EL-SAYED, N. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and possess a conserved element in the non-coding region. *BMC Genomics*, v. 7, p. 60, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas' disease. *World Health Organization Tech. Rep. Ser.*, v. 811, p. 1-91, 1991.

WHO World Health Report, Making health research work for poor people. *Tropical Disease Research Progress 2003-2004*, p. 30-33, 2005. Site: <<http://www.who.int/tdr/disease/chagas>>.

ZAFRA, G.; MANTILLA, J. C.; VALADARES, H. M.; MACEDO, A. M.; GONZÁLES, C. I. Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombia chagasic patients. *Parasitol. Res.*, 2008.

ZELEDON, R.; RABINOVICH, J. E. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 26, p. 101-33, 1981.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int. J. Parasitol.*, v. 28, p. 105-12, 1998.

ZINGALES, B.; STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M. R. S. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94 (Suppl.1), p. 159-164, 1999.



## 9. ANEXOS

TABELA 1

Características dos 44 pacientes chagásicos crônicos procedentes dos estados de MG e GO: origem geográfica, idade, sexo, formas clínicas e seus respectivos isolados do *Trypanosoma cruzi*.

(continua)

Número isolados	Municípios de origem	Sexo	Idade	Data Hemocultura	Tubos Pos/Hemocultura	FC e estádios de evolução	Tratados Data
*003 a	Janaúba / MG	F	27	08/07/97	5/7	Indeterminada	20/09/97
**003 b			28	20/05/98	3/7		
005 a	Teófilo Otoni / MG	M	39	24/09/96	2/8	Indeterminada	01/07/98
005 b			41	25/03/98	2/8		
*012 a	Santana de Pirapama / MG	M	51	30/09/97	2/7	Indeterminada	04/04/98
**012 b			52	06/05/98	1/7		
**012 g			57	11/03/03	1/8		
013 a	Piranga / MG	F	38	29/10/97	3/7	Indeterminada	-/10/04
013 c			41	20/04/01	2/7		
013 e			44	24/11/03	6/7		
*019 a	Carbonita / MG	M	45	24/06/97	1/7	Cardíaca (A)	26/10/97
**019 c			50	21/11/01	5/7		
**019 e			54	20/09/05	5/7		
029 a	Itaipé / MG	F	33	12/03/99	6/7	Indeterminada	-
029 b			34	01/10/99	6/7		
029 c			36	07/12/01	6/8		
044 a	Turmalina / MG	M	33	17/09/96	2/8	Indeterminada	-
044 d			40	01/07/04	3/7		
045 a	Coração de Jesus / MG	F	27	17/06/98	2/7	Indeterminada	-
045 c			30	12/12/00	1/7		
*050 b	Claro de Poções / MG	F	39	01/04/98	4/7	Indeterminada	08/04/98
**050 f			44	19/02/03	2/7		
**050 h			46	28/04/05	4/7		
053 a	Januária / MG	M	25	17/06/97	3/8	Indeterminada	-
053 d			29	28/08/02	1/8		
053 e			33	02/12/04	1/7		
058 a	Novo Cruzeiro / MG	M	44	05/08/98	1/7	Cardíaca (B1)	-
058 c			50	02/09/04	5/7	Cardíaca (B2)	
058 d			51	13/07/05	1/7	Cardíaca (C)	
065 b	Felixlândia / MG	F	46	05/12/00	3/7	Indeterminada	-
065 c			47	17/04/02	4/7		
065 d			50	13/09/05	4/7		
079 a	Hematita / MG	F	54	24/06/97	1/7	Cardíaca (A)	-
079 d			59	08/05/02	1/7		
083 a	Ferros / MG	F	49	15/04/98	6/7	Cardíaca (A)	-
083 c			55	10/11/03	6/7		
090 a	Montes Claros / MG	F	54	22/04/98	6/7	Indeterminada	-
090 b			56	24/10/00	3/7		
092 a	Teófilo Otoni / MG	F	35	28/05/99	5/7	Cardíaca (A)	-
092 b			37	31/05/00	4/5		
092 c			38	23/11/01	6/7		
094 a	Alvorada de Minas / MG	F	31	25/06/99	2/7	Cardíaca (A)	-
094 b			32	19/04/01	2/8		
103 a	Santa Maria Suaçuá / MG	F	37	06/05/98	3/7	Indeterminada	-
103 c			41	29/04/03	5/7		
105 a	São Francisco / MG	F	26	12/11/97	4/7	Indeterminada	-
105 b			28	29/10/99	6/7		
105 d			31	10/07/02	1/6		
109 a	Novo Cruzeiro / MG	F	44	16/04/99	5/7	Indeterminada	-
109 b			48	27/05/03	5/7		
111 a	Araçuaí / MG	F	43	19/08/98	5/7	Indeterminada	-
111 c			47	06/05/03	6/7		
111 d			49	16/09/04	6/7		
115 b	Brasília de Minas / MG	F	33	12/04/00	1/7	Indeterminada	-
115 c			35	19/02/03	2/7		
*116 a	Joaquim Felício / MG	F	20	23/04/99	3/7	Indeterminada	03/03/04
*116 b			21	14/06/00	4/7		
*116 e			25	15/12/03	4/7		
**116 f			27	11/04/06	1/7		
120 a	Porteirinha / MG	M	30	15/04/98	6/7	Indeterminada	-
120 b			32	30/08/00	3/7		

TABELA 1

Características dos 44 pacientes chagásicos crônicos procedentes dos estados de MG e GO: origem geográfica, idade, sexo, formas clínicas e seus respectivos isolados de *Trypanosoma cruzi*.

(conclusão)

Número isolados	Municípios de origem	Sexo	Idade	Data Hemocultura	Tubos Pos/Hemocultura	FC e estádios de evolução	Tratados Data
132 a	Planalto de Minas / MG	M	42	24/06/97	3/7	Indeterminada	-
132 d			48	29/04/03	2/7		
138 a	Teófilo Otoni / MG	F	22	24/06/98	2/7	Indeterminada	-
138 c			29	09/09/04	3/7		
146 a	Itamarandiba / MG	M	30	01/10/96	3/8	Indeterminada	-
146 b			30	17/06/97	4/9		
154 a	Itaipé / MG	M	38	12/04/00	2/7	Indeterminada	-
154 c			42	27/10/03	1/8		
162 a	Congonhas do Norte / MG	F	35	04/10/00	1/7	Indeterminada	-
162 f			38	03/11/03	1/6		
038	Pains / MG	F	53	10/12/96	6/8	Indeterminada	-
045			53	22/04/97	2/7		
012B	Capelinha / MG	F	56	13/09/05	3/5	Cardíaca (B1)	-
012B <sub>2</sub>			57	12/09/06	4/6		
016B	Santana de Pirapama / MG	F	29	20/09/05	5/8	Cardíaca (A)	-
016B <sub>2</sub>			30	03/10/06	5/6		
024B	Carbonita / MG	M	49	04/10/05	1/7	Cardíaca (B1)	-
024B <sub>2</sub>			50	03/10/06	2/6		
010	Ubai / MG	F	33	14/09/98	1/7	Cardíaca (A)	-/09/99
079			33	14/12/98	1/7		
177	Matipó / MG	M	42	18/05/99	2/7	Indeterminada	-/11/99
205			42	27/07/99	3/7		
157	Cabeceiras / GO	F	40	29/03/99	4/7	Indeterminada	-
187			40	27/05/99	4/7		
384			42	07/06/01	4/7		
038	Fazenda Nova / GO	M	50	05/10/98	4/7	Cardíaca (III)	30/04/99
063			51	07/12/98	5/7		
001	Itumbiara / GO	M	75	09/09/98	2/7	Indeterminada	-
074			75	10/12/98	1/7		
021C	Formosa / GO	M	57	17/09/98	5/7	Cardíaca (II)	-/08/99
044			58	24/11/98	6/7		
008	Córrego do Ouro / GO	M	45	11/09/98	5/7	Cardíaca (III)	-/04/99
061			45	04/12/98	3/7		
006	Campestre de Goiás / GO	F	39	10/09/98	1/7	Cardíaca (II)	-/04/99
147B			40	22/03/99	3/7		
036	Anicuns / GO	F	50	01/10/98	5/7	Cardíaca (II)	-/10/00
059			50	03/12/98	2/7		
145	Itapuranga / GO	F	59	25/02/99	5/7	Cardíaca (II)	-/12/99
186			59	27/05/99	3/7		
*160	Nova Veneza / GO	M	25	31/03/99	1/7	Cardíaca (II)	-/01/00
**399			27	27/06/01	1/7		

MG- Minas Gerais, GO- Goiás, FC- Forma clínica, M- Masculino, F- Feminino, Pos- Positividade. Amostras do *T. cruzi* isoladas de um mesmo paciente antes (\*) e após (\*\*) tratamento específico. A avaliação clínica dos nove pacientes procedentes de GO foi realizada segundo Rassi & Rassi, 1998; enquanto que os pacientes de MG foram reavaliados e reclassificados de acordo com as normas estabelecidas pelo Consenso Brasileiro em doença de Chagas/2005.

**ARTIGOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO**

Artigo submetido ao periódico *Journal of Clinical Microbiology* no mês de Agosto 2008

**Probing the dynamics populational of the *Trypanosoma cruzi* during disease progression in the chronic phase**

Daniella Alchaar D'Ávila<sup>1</sup>; Andréa Mara Macedo<sup>2</sup>; Helder Magno Silva Valadares<sup>2</sup>; Eliane Dias Gontijo<sup>3</sup>; Ana Maria de Castro<sup>5</sup>; Carlos Renato Machado<sup>2</sup>; Egler Chiari<sup>1</sup>; Lúcia Maria da Cunha Galvão<sup>1,4</sup>.

**Current affiliations of authors:**

1. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.
2. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.
3. Departamento de Medicina Preventiva e Social, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.
4. Programas de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brazil.
5. Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Brazil.

*\*Address for Correspondence:*

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 Caixa Postal: 486, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Tel.: +55- 31-34992866

Fax: +55 -31- 34992970 - E-mail address: [galvao@icb.ufmg.br](mailto:galvao@icb.ufmg.br)

**Abstract**

We analyzed the genetic profile of 102 *Trypanosoma cruzi* isolates from 44 Chagas disease chronic patients from different regions of Minas Gerais (MG) and Goiás (GO) states from Brazil. At least two isolates were obtained from each patient at different times aiming to understand the parasite population dynamics during disease progression in the chronic phase. All *T. cruzi* DNA were characterized by three different PCR assays: (i) amplification of the D7 domain of the 24S $\alpha$  ribosomal RNA gene (rDNA24S $\alpha$ ); (ii) mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2 (COII) gene and (iii) amplification of the intergenic region of spliced leader genes (SL-IR). Moreover, 77 isolates, 58 from MG and 19 from GO were further analyzed for nine microsatellite loci. Data obtained with rDNA24S $\alpha$  and the COII mitochondrial gene characterization showed that isolates from almost all patients presented rDNA24S $\alpha$  type 1 profile and COII haplogroup C, corresponding to the *T. cruzi* II major lineage. On the other hand, isolates from one patient from MG and one from GO, showed rDNA type 2 and 1/2 suggestive at the first sight of *T. cruzi* I and hybrid strains, respectively. However, further analyses of COII and SL-IR genes confirmed that the GO stock belonged to the hybrid group, but demonstrated that MG one corresponds to the *T. cruzi* III strain. These results strengthened the risk for misclassifying *T. cruzi* isolates on basis in a single molecular marker analysis. The microsatellites profiles have shown that in general different isolates obtained from the same patients were genetically identical and monoclonal. Exceptions were observed for *T. cruzi* isolates from two patients that presented slight differences in the allele sizes detected for the SCLE11 locus and also for other two patients that showed the amplification of three peaks for one single microsatellite locus (TcAAAT6). These findings suggest that at least two populations of parasites were present in these patients, and no relationship was detected between the genetic profile and the different clinical forms presented by them.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, polymorphism genetics, populational dynamics.

Artigo submetido ao periódico *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* no mês de Maio 2008

**Benznidazole Clearance of *Trypanosoma cruzi* Human Infection does not Correlate with Parasite Drug Susceptibility: A 10-Year Prospective Study**

Margoth MORENO,<sup>1</sup> Daniella A. D'ÁVILA,<sup>2</sup> Marcelo N. SILVA,<sup>1</sup> Lúcia M. C. GALVÃO,<sup>2,3</sup> Andrea M. MACEDO,<sup>4</sup> Egler CHIARI,<sup>2</sup> Eliane D. GONTIJO,<sup>5</sup> and Bianca ZINGALES<sup>1\*</sup>

**Current affiliations of authors:**

- 1- Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brasil.
- 2- Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 3- Programas de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Ciências Farmacêuticas, CCS, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- 4- Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 5- Departamento de Medicina Preventiva e Social, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

**Running title:**

Benznidazole susceptibility of human *T. cruzi* strains

## ABSTRACT

The nitroheterocyclic compound benznidazole (BZ) is one of the two drugs used to treat Chagas disease, the most important parasitic infection in Latin America. Nevertheless, therapeutic failures were reported in many chronic patients, which were mostly attributed to different susceptibilities to BZ of *Trypanosoma cruzi* strains. To investigate this possibility, we standardized an *in vitro* test to quantify the drug activity. For twelve *T. cruzi* strains, the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) varied from 7 to 127 μM. In parasites sub-cultured during four months the IC<sub>50</sub> value showed minimal fluctuations. The test was then applied to isolates retrieved from seven chronic patients submitted to BZ therapy. The IC<sub>50</sub> of the pre-treatment isolates from three patients considered cured by several criteria varied from 19 to 35 μM. Similarly, pre-treatment isolates from four non-cured patients presented IC<sub>50</sub> values of 15.6 to 51 μM. We also analyzed BZ activity in parasites obtained after chemotherapy. The isolates from one patient maintained the IC<sub>50</sub> value, whereas in two patients a 2-fold decrease and in one patient a 3-fold increase in BZ susceptibility was observed. Possible selection of parasite sub-populations during or after treatment was investigated based on the profile of nine microsatellite *loci*. Our results show for the first time that the susceptibility to BZ of the infecting *T. cruzi* population is not predictive of cure and support the notion that in addition to the direct role in parasite clearance, the effect of BZ on the host immune response determines the chemotherapy efficacy.



## **Cytokines and IgG isotype production in sera have not correlation with the different clinical manifestations of Chagas' disease in patients**

Daniella Alchaar D'Ávila<sup>1</sup>; Paulo Marcos da Matta Guedes<sup>2</sup>; Eliane Dias Gontijo<sup>3</sup>; Ana Maria de Castro<sup>4</sup>; Egler Chiari<sup>1</sup>; Lúcia Maria da Cunha Galvão<sup>1,5</sup>.

Current affiliations of authors:

1- Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

2- Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

3- Departamento de Medicina Preventiva e Social, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

4- Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Brazil.

5- Programas de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brazil.

*\*Address for Correspondence:*

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 Caixa Postal: 486, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Tel.: +55- 31-34992866

Fax: +55 -31- 34992970 - E-mail address: [galvao@icb.ufmg.br](mailto:galvao@icb.ufmg.br)

**Abstract**

Immunological balance seems to be crucial for protection and lesion genesis of heart and digestive tract in chagasic patients. The cellular and humoral immune response has been widely report. Moreover, immunoglobulins and cytokines are important for parasitism control and are involved in lesions genesis. Here, we studied the cytokines and IgG isotype production in sera of chagasic patients with indeterminate (IND/n=27) and cardiac (CARD/n=16) form of disease, as well as from normal uninfected individuals (NI/n=30). Our results show there were no difference in IL-10 and IFN- $\gamma$  production in sera of IND, CARD and NI patients. We observed that sera from both IND and CARD have higher levels immunoglobulin G1 (IgG1) specific *T. cruzi* antibodies than sera from NI. However, not difference was observed in IgG2 levels production between NI, IND and CARD patients. These results suggest that there is no correlation among cytokines, IgG isotype production in sera and clinical manifestations of Chagas disease.

*Keywords:* *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, immunopathogenesis, cytokines, IgG isotype