

TESE DE DOUTORADO

HELDER MAGNO SILVA VALADARES

**ANÁLISES POPULACIONAIS EM *TRYPANOSOMA*
CRUZI BASEADAS EM MICROSSATÉLITES
POLIMÓRFICOS DE DNA**

**ORIENTADORA: ANDRÉA MARA MACEDO
CO-ORIENTADOR: SÉRGIO DANILO JUNHO PENA**



**UFMG, MINAS GERAIS, BRASIL
JULHO/2007**

HELDER MAGNO SILVA VALADARES

ANÁLISES POPULACIONAIS EM *TRYPANOSOMA*
CRUZI BASEADAS EM MICROSSATÉLITES
POLIMÓRFICOS DE DNA

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS,
COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA.

ORIENTADORA: PROFa. ANDREA M. MACEDO
CO-ORIENTADOR: PROF. SÉRGIO D. J. PENA

BELO HORIZONTE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/UFMG
JULHO/2007

043

Valadares, Helder Magno Silva.

Análises populacionais em *Trypanosoma cruzi* baseadas em microssatélites polimórficos de DNA [manuscrito] / Helder Magno Silva Valadares. – 2007.

178 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Andrea M. Macedo. Co-orientador: Sérgio D.J. Pena.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Bioquímica e Imunologia.


1. *Trypanosoma cruzi* – Teses. 2. Chagas, Doença de – Transmissão - Teses. 3. Variabilidade genética. 4. Marcadores moleculares. 5. Microssatélites (Genética) – Teses. 6. Células únicas. 7. Bioquímica – Teses. I. Macedo, Andrea Mara. II. Pena, Sérgio Danilo Junho. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Bioquímica e Imunologia. IV. Título.

CDU: 577.1

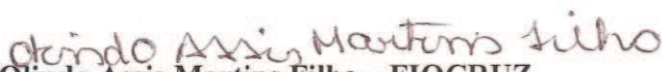


ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE HELDER MAGNO SILVA VALADARES. Aos quatorze dias do mês de agosto de 2007 às 10:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da tese de doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Análises populacionais em *Trypanosoma cruzi* baseadas em microsatélites polimórficos de DNA" requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão, Dra. Andréa Mara Macedo da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Eliane Lages Silva da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, aprovado; Dr. José Franco da Silveira Filho da Universidade Federal de São Paulo, aprovado; Dr. Olindo Assis Martins Filho do Centro de Pesquisas René Rachou-Fundação Oswaldo Cruz, aprovado; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Sérgio Danilo Junho Pena, co-orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dra. Andréa Mara Macedo, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 14 de agosto de 2007.

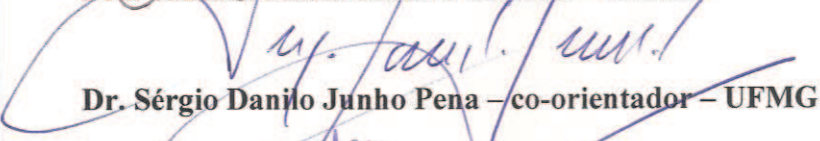

Dra. Eliane Lages da Silva - UFTM


Prof. Andréa Mara Macedo
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em
Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

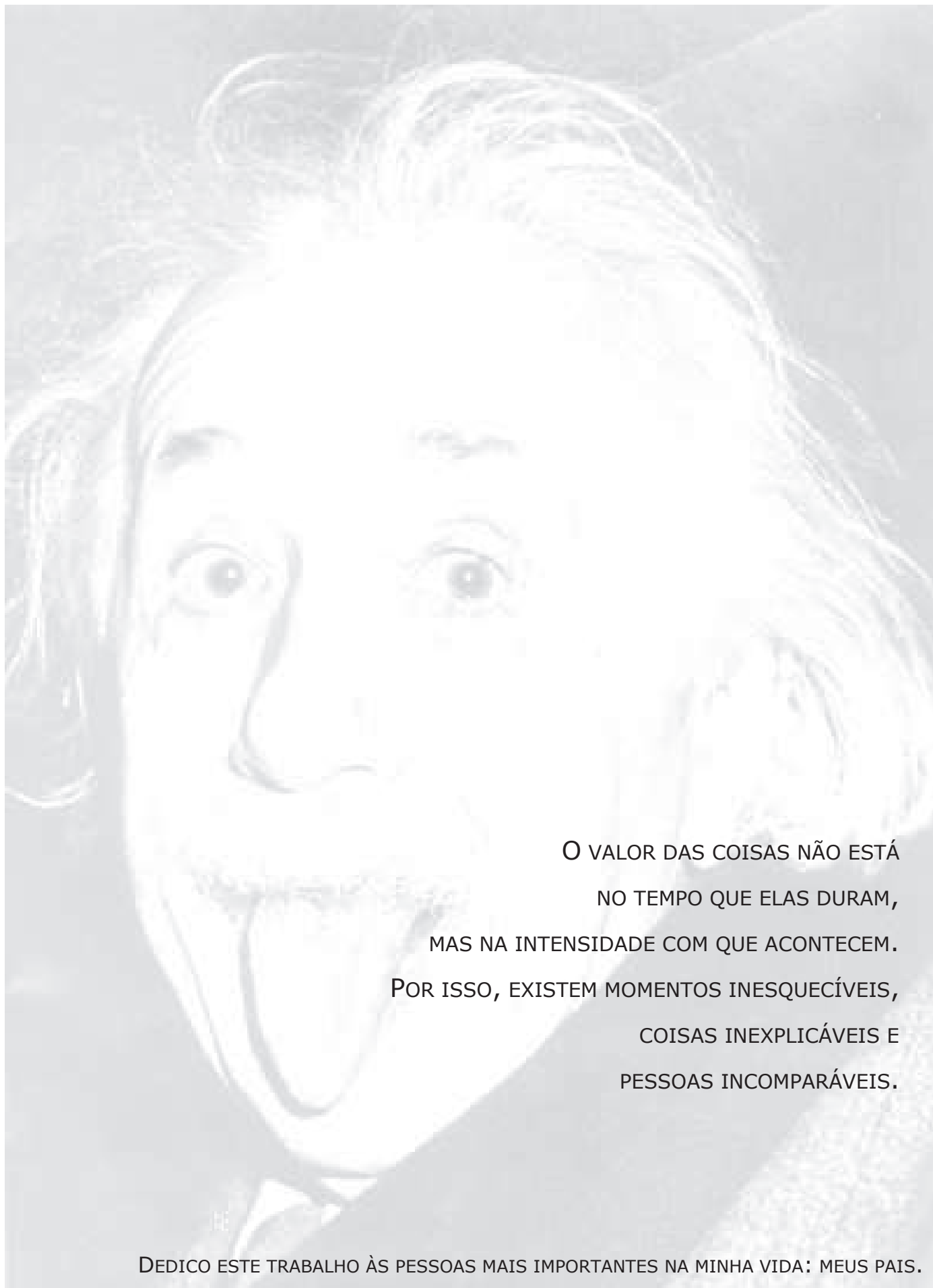

Dr. José Franco da Silveira Filho - UNIFESP


Dr. Olindo Assis Martins Filho - FIOCRUZ


Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - UFMG


Dr. Sérgio Danilo Junho Pena - co-orientador - UFMG


Dra. Andréa Mara Macedo - orientadora - UFMG



O VALOR DAS COISAS NÃO ESTÁ
NO TEMPO QUE ELAS DURAM,
MAS NA INTENSIDADE COM QUE ACONTECEM.
POR ISSO, EXISTEM MOMENTOS INESQUECÍVEIS,
COISAS INEXPLICÁVEIS E
PESSOAS INCOMPARÁVEIS.

DEDICO ESTE TRABALHO ÀS PESSOAS MAIS IMPORTANTES NA MINHA VIDA: MEUS PAIS.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. **ANDRÉA MARA MACEDO** pela amizade, compreensão e paciência durante os anos de doutorado, pela orientação sensata e objetiva indispensável para a minha formação.

Aos Profs. **SÉRGIO DANILO PENA**, **CARLOS RENATO** e **GLÓRIA FRANCO** pelas idéias, sugestões que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. **RIVA DE PAULA OLIVEIRA**, minha orientadora de mestrado, que me passou os primeiros ensinamentos em Biologia Molecular os quais despertaram em mim o gosto pela pesquisa.

À Dra. **JULIANA RAMOS PIMENTA** que me deixou esta herança e sempre esteve pronta a ajudar.

Aos colaboradores deste trabalho Dr. **EGLER CHIARI**, Dra. **MARIA LÚCIA GALVÃO**, Dra. **DANIELLA BARTHOLOMEU**, Dra. **ELIANE GONTIJO**, Dra. **ELIANE LAGES**, Dra. **BIANCA ZINGALES**, Dr. **OCTÁVIO FERNANDES**, Dra. **MARTA DE LANA**, Dra. **MARIA THEREZINHA BAHIA**, Dra. **MÔNICA GOMES**, Dr. **ALEJANDRO SCHJIMAN** pelas amostras biológicas, idéias e informações.

Às agências financiadoras **WHO**, **CAPES**, **CNPq**.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia, em especial ao Prof. **KENNETH GOLLOB** pelos ensinamentos no FACS *Cell Sorter* e Profa. **SANTUZA TEIXEIRA** pelas facilidades oferecidas em seu laboratório e pelo uso do microscópio de fluorescência.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, sem os quais nenhuma tese seria possível: o **CÁSSIO**, que me apresentou ao FACS, por sua paciência e disponibilidade em realizar os experimentos e à **CELISE**, que “quebra todos os galhos”.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia **AFONSO** e **ORLANDO** que sempre estavam prontos a colaborar nos experimentos de culturas de parasitos.

À **NEUZINHA** pela amizade e carinho, sempre disponível e interessada em ajudar os alunos do laboratório em quaisquer dificuldades.

À **KATITA** pela amizade e pelo carinho de mãe, por ter me aturado estes quatro anos, pelo seu trabalho sem o qual essa tese não teria sido possível.

À **MIROCA e RÚBIA** pela amizade e pelo trabalho de manter o laboratório sempre organizado.

Às amigas **HELEN MARTINS, VANJA VELOSO e DANIELA D'ÁVILA** pela amizade e colaboração nos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Genética-Bioquímica: **GRUPO DO CRUZI** (Claudiney e Guilherme) **GRUPO DO REPARO DE DNA** (Carol, Débora Aline, Alice, Michelle, Bruno, Danielle, Matheus, João Pedro e Carlos Eduardo), **GRUPO DO SHISTO** (Débora Santos, Pedro, Marina, Magui, Marcella, Érika, Michell, Chico Lobo, Daiane, Priscila, Alessandra Campos e Heron) e **GRUPO DOS HUMANOS** (Vanessa, Simone Santos, Fernanda, Luciana Bastos, Clarice e Higgor) pela amizade, pelos momentos alegres e tristes, por terem aturado as minhas piadas sem graça e mesmo assim rindo delas, pelo companheirismo, pela discussão e ajuda na execução de experimentos, enfim, por terem feito parte da minha vida. Só terei lembranças boas de vocês...

Aos **AMIGOS** que já passaram pelo laboratório de Genética-Bioquímica: Kadu, Alessandra Clarizia, Flávia Parra, Patrícia Pellegrini, Luis, Cláudia, Luciana Werneck, Isabella, Paula, Heloísa.

Aos demais **AMIGOS DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO** pelo companheirismo e cooperação na prática de experimentos.

A **SIMONE PIRES** pela amizade, ajuda nos experimentos de cultura de parasitos e pelas inestimáveis colaborações com a taxa de bancada.

Ao **CARLOS GUSTAVO**, amigo psicólogo de todas as horas, inclusive sábados, domingos e feriados. Sempre com a sua destreza mental sabia dar uma direção no sentido de ultrapassar as dificuldades. Obrigado por tudo...

Aos amigos **CHARLES, JORGE, ERIC, ÂNGELO, GERALDO e MARCOS AURÉLIO** pelo companheirismo e amizade sincera.

A **MINHA QUERIDA FAMÍLIA** que sempre esteve e sempre estará ao meu lado onde quer que eu esteja.

A **DEUS**, por tudo que fez acontecer em minha vida.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
JUSTIFICATIVA	24
OBJETIVOS	27
MATERIAIS E MÉTODOS	29
RESULTADOS	57
DISCUSSÃO	121
CONCLUSÕES	147
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
ANEXOS	174

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático da estratégia de <i>full nested</i> PCR	43
Figura 2	Padrões típicos de RFLP obtidos para o gene COII	48
Figura 3	Esquema da separação de células no FACS <i>Cell Sorter</i>	51
Figura 4	Gráfico de autofluorescência de <i>T. cruzi</i> no FACS <i>Cell Sorter</i>	52
Figura 5	Mapa da separação das células no FACS <i>Cell Sorter</i> em placas de 96 poços	54
Figura 6	Mapa da separação das esferas fluorescentes no FACS <i>Cell Sorter</i>	55
Figura 7	Gráfico dos microssatélites de di, tri e tetranucleotídeos	61
Figura 8	Gráfico dos microssatélites de dinucleotídeos	62
Figura 9	Gráfico dos microssatélites de trinucleotídeos	63
Figura 10	Gráfico dos microssatélites de tetranucleotídeos	64
Figura 11	Gráfico da variação no número de repetições dos microssatélites de dinucleotídeos	65
Figura 12	Gráfico da variação no número de repetições dos microssatélites de trinucleotídeos	66
Figura 13	Gráfico da variação no número de repetições dos microssatélites de tetranucleotídeos	67
Figura 14	Seqüências dos novos <i>loci</i> de microssatélites	70
Figura 15	Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata para o <i>locus</i> TcGAG10 empregando ou não o protocolo de <i>full nested</i> PCR	74
Figura 16	Mapeamento dos <i>loci</i> de microssatélites nos <i>contigs</i> do cromossomo III de <i>T. cruzi</i>	76
Figura 17	Alinhamento das seqüências de DNA dos <i>loci</i> de microssatélites TcTAC15 e TcTAT20	78
Figura 18	Alinhamento das seqüências de DNA do <i>locus</i> de microssatélite TcCAA10	79
Figura 19	Eletrofluorogramas dos tecidos de camundongos	82
Figura 20	Eletrofluorogramas dos tecidos de pacientes chagásicos	84
Figura 21	PCR multiplex de microssatélites em células únicas	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 22	Fotografias das esferas fluorescentes	88
Figura 23	Amplificação do gene rDNA24S α empregando células únicas	90
Figura 24	Eletrofluorogramas do <i>locus</i> TcTAT20 para as diferentes passagens da cepa Be-78 em camundongos	96
Figura 25	Amplificação do gene rDNA24S α para as diferentes passagens da cepa Be-78 em camundongos	97
Figura 26	Padrões de RFLP do gene COII para as diferentes passagens da cepa Berenice-78 em camundongos	98
Figura 27	Amplificação do espaçador intergênico dos genes mini-exon para as diferentes passagens da cepa Be-78 em camundongos	100
Figura 28	Eletrofluorogramas para o <i>locus</i> TcTAC15 nas células únicas de Be-78 25B	101
Figura 29	Eletrofluorogramas para o <i>locus</i> TcTAT20 nas células únicas de Be-78 25B	102
Figura 30	Eletrofluorogramas para o <i>locus</i> TcAAT8 nas células únicas de Be-78 25B	103
Figura 31	Eletrofluorogramas para o <i>locus</i> TcAAAT6 nas células únicas de Be-78 25B	104
Figura 32	Padrões de RFLP do gene COII nas células únicas da cepa A316A R7	108
Figura 33	Eletrofluorogramas do gene rDNA24S α nas células únicas da cepa A316A R7	109
Figura 34	Amplificação do kDNA para o caso de transmissão congênita em gravidez múltipla em Minas Gerais	115
Figura 35	Amplificação do espaçador intergênico dos genes mini-exon do <i>T. cruzi</i> para os casos congênitos no Rio Grande do Sul	118

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Cepas e clones de <i>Trypanosoma cruzi</i> analisados neste trabalho	31
Tabela 2	Amostras isoladas de pacientes envolvidos nos casos de transmissão congênita da doença de Chagas	34
Tabela 3	Seqüências de DNA depositadas no <i>GenBank</i> e submetidas ao programa <i>Tandem Repeats Finder</i>	39
Tabela 4	Seqüências dos iniciadores utilizados neste trabalho	40
Tabela 5	Freqüência das repetições de di, tri e tetranucleotídeos no genoma anotado do clone CL Brener	60
Tabela 6	Tamanho dos alelos para os sete novos <i>loci</i> de microssatélites em diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	71
Tabela 7A	Valores de heterozigosidade esperada e observada para os sete novos <i>loci</i> de microssatélites	73
Tabela 7B	Desequilíbrio de ligação entre os sete novos <i>loci</i> de microssatélites	73
Tabela 8	Tamanhos dos alelos para seis <i>loci</i> de microssatélites em amostras clínicas de tecidos humanos infectados com <i>T. cruzi</i>	85
Tabela 9	Tamanhos dos alelos para quatro <i>loci</i> de microssatélites para cepas de <i>T. cruzi</i>	93
Tabela 10	Tamanhos dos alelos para quatro <i>loci</i> de microssatélites utilizando as células únicas de Be-78 25B	106
Tabela 11	Tamanhos dos alelos os quatro <i>loci</i> de microssatélites e rDNA 24S α para as células únicas de A316A R7	111
Tabela 12	Resultados obtidos para rDNA24S α , COII e microssatélites para os casos congênitos no estado de Minas Gerais	114
Tabela 13	Resultados obtidos para rDNA24S α , COII e microssatélites para os casos congênitos no estado do Rio Grande do Sul	116
Tabela 14	Resultados obtidos para rDNA24S α , COII e microssatélites para o caso congênito na Argentina	120

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, apresenta diferentes manifestações clínicas, resultantes de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais, tanto do hospedeiro quanto do parasito. Com relação aos fatores genéticos do parasito, uma variedade de estudos biológicos e moleculares revelou uma substancial variabilidade genética entre as cepas de *T. cruzi*. A análise de perfis de microssatélites é uma técnica poderosa para acessar a variabilidade genética em eucariotos e pode ser utilizada para distinguir os indivíduos ou populações de diferentes espécies. Estudos anteriores, usando oito *loci* de microssatélites compostos de dinucleotídeos, trouxeram informações valiosas sobre a estrutura das populações de *T. cruzi*. Entretanto, devido à metodologia empregada no isolamento desses *loci*, o tamanho das seqüências flanqueadoras das repetições é muito reduzido, o que dificulta o desenho de novos iniciadores que permitam bons níveis de amplificação por PCR. Além disso, *loci* de dinucleotídeos, em geral, são mais susceptíveis ao fenômeno da derrapagem da DNA polimerase, o que certamente dificulta as análises. No presente trabalho, nós descrevemos novos *loci* de microssatélites adequados para a caracterização de *T. cruzi* em amostras biológicas que usualmente apresentam quantidades limitantes do DNA do parasito. Para isto, e aproveitando os dados obtidos do projeto genoma de *T. cruzi*, nós avaliamos a abundância, composição e distribuição de microssatélites perfeitos constituídos por motivos de di, tri e tetranucleotídeos no genoma de *T. cruzi*. Em geral, os *loci* de microssatélites foram cerca de 12 vezes menos freqüentes em regiões codificantes quando comparados com as regiões não codificantes do genoma de *T. cruzi*, onde as repetições de dinucleotídeos foram mais abundantes (47,6%). Entretanto, as repetições de trinucleotídeos foram os microssatélites mais comuns dentro das regiões codificantes. Usando o programa *Tandem Repeats Finder*, foi possível identificar e caracterizar inicialmente sete novos *loci* de microssatélites – seis compostos por repetições de trinucleotídeos (TcTAC15, TcTAT20, TcAAT8, TcATT14, TcGAG10 e TcCAA10) e um composto por repetições de tetranucleotídeos (TcAAAT6). Todos eles, exceto o *locus* TcCAA10, foram fisicamente mapeados em distintas regiões intergênicas do cromossomo III de CL Brener. Constatando, o *locus* TcCAA10 foi localizado dentro de uma região codificante para uma proteína hipotética no genoma de *T. cruzi*. Todos estes *loci* de microssatélites foram polimórficos e, portanto, úteis para estudos de variabilidade genética de *T. cruzi*. Resultados notáveis foram obtidos com as análises dos

tamanhos dos alelos amplificados para o *locus* TcTAC15. Com a utilização deste *locus* foi possível separar as cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* I daquelas pertencentes às linhagens *T. cruzi* II, *T. cruzi* III e híbridos. Para estabelecer um ensaio de PCR mais sensível, nós desenhamos pares extras de iniciadores para cada *locus*, de forma a permitir o uso de protocolos de *full nested* PCR. Demonstramos que, utilizando esse tipo de estratégia, foi possível detectar e diferenciar cepas presentes em tecidos humanos e de camundongos infectados. Além disso, foi possível também amplificar DNA do parasito diretamente em células únicas separadas através do FACS *Cell Sorter*. Para realizar isto, o procedimento para a separação de células únicas pelo FACS *Cell Sorter* foi otimizado e uma PCR multiplex foi desenvolvida. Até o momento, duas populações artificialmente (JG+Col1.7G2 e Silvio X10 cl1+Esmeraldo cl3) e duas naturalmente (Berenice-78 25B e A316A R7) mistas foram analisadas após a separação em células únicas. Em todos os casos, nós pudemos separar e identificar as subpopulações presentes nas populações policlonais. O isolado Be-78 25B mostrou-se constituído por no mínimo dois clones: um similar à cepa Berenice-62 e pertencente à linhagem *T. cruzi* II (DTU IIb) e o outro pertencente ao grupo das cepas híbridas (DTU IIId). O isolado A316A R7 foi também constituído por dois clones: um pertencente à linhagem *T. cruzi* I (DTU I) e o outro pertencente à linhagem *T. cruzi* II (DTU IIb). Finalmente, no presente trabalho, nós analisamos também casos de transmissão congênita da doença de Chagas de três regiões endêmicas distintas (Minas Gerais e Rio Grande do Sul, Brasil, e Buenos Aires, Argentina). As análises dos perfis de microssatélites mostraram uma perfeita identidade genotípica entre os pares mães-filhos analisados, corroborando com o diagnóstico de infecção congênita para estes casos. As análises de microssatélites associadas a outros marcadores evolutivamente mais conservados em *T. cruzi* (rDNA 24S α , COII e mini-exon) mostraram que no estado de Minas Gerais, os parasitos isolados de todos os casos congênitos pertencem à linhagem *T. cruzi* II (DTU IIb), enquanto que os parasitos isolados dos casos congênitos do estado do Rio Grande do Sul e Argentina pertencem ao grupo das cepas híbridas (DTU IIId). É interessante que a prevalência de casos congênitos da doença de Chagas na parte sul do Brasil e Argentina parece ser muito mais elevada do que em Minas Gerais. Então, nós pressupomos que a alta freqüência de casos congênitos da doença de Chagas numa área endêmica está associada com uma maior predominância de populações híbridas de *T. cruzi* (especialmente do DTU IIId) circulantes nesta região.

ABSTRACT

Chagas disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* exhibits distinct clinical manifestations resulting from complex interactions among environmental and genetic factors from both host and parasite. Concerning the parasite genetic factors, a broad range of biological and molecular studies has revealed substantial genetic variability among *T. cruzi* strains. Microsatellite profiles analysis is a powerful technique to access genetic variability in eukaryotes, and can be used to distinguish individuals or populations of different species. Previous studies using eight dinucleotide microsatellite loci have provided valuable information about the structure of *T. cruzi* populations. However, because of the methodology used to isolate these loci, the sequences flanking of the repeats are very short, which makes the design of adequate primers to achieve good amplifications by PCR a difficult task. In addition, dinucleotide loci are especially susceptible to DNA polymerase slippages, which complicate the amplicon analyses. In the present work, we describe new microsatellite loci suitable to *T. cruzi* characterization directly in biological samples that usually present very little parasite DNA. For that, and taking advantages from the *T. cruzi* genome sequencing project, we evaluate the abundance, composition and distribution of perfect microsatellites constituted of di, tri and tetranucleotide motifs in the *T. cruzi* genome. In general, the microsatellite loci were 12 times less frequently in coding regions compared to non-coding regions of the *T. cruzi* genome, where the dinucleotide repeats were the most abundant (47,6%). However, the trinucleotide repeats were the most common microsatellite within the coding regions. Using the software Tandem Repeats Finder it was possible to identify and characterize seven new microsatellite loci – six composed by trinucleotide (TcTAC15, TcTAT20, TcAAT8, TcATT14, TcGAG10 and TcCAA10) and one composed by tetranucleotide motifs (TcAAAT6). All, except the TcCAA10 locus, were physically mapped on distinct intergenic regions of the chromosome III of the CL Brener. Contrasting, the TcCAA10 locus was localized within a hypothetical protein gene in *T. cruzi* genome. All microsatellites were polymorphic and useful for *T. cruzi* genetic variability studies. Remarkable results were obtained by analyzing the allele sizes of the amplicons for the TcTAC15 locus. By using this locus it was possible to separate the strains belonging to *T. cruzi* I lineage from those belonging to *T. cruzi* II, *T. cruzi* III and hybrid group. To establish a more sensitive PCR assay, we designed extra pairs of primers for each microsatellite locus and used them in Full Nested PCR protocols.

By using this strategy we could detect and differentiate *T. cruzi* strains directly in human and animal infected tissues. Besides, it was also possible to amplify the parasite DNA directly in single cells separated by FACS *Cell Sorter*. To achieve that, the current procedure for single cells separation by FACS *Cell Sorter* was optimized and a multiplex PCR assay was described. Up to now two artificially (JG+Col1.7G2 and SilvioX10 cl1+Esmeraldo cl3) and two naturally (Berenice-78 25B and A316A R7) mixed populations were analyzed after single cell sorting. In all cases we could separate and identify the subpopulations present in the polyclonal populations. The Be-78 25B isolate was composed by at least two clones: one similar to the Berenice-62 strain and belonging to *T. cruzi* II major lineage (DTU IId) and another belonging to the hybrid group (DTU IId). The isolate A316A R7 was also constituted by two clones: one belonging to *T. cruzi* I (DTU I) and another belonging to *T. cruzi* II lineage (DTU IId). Finally, in the present work, we analyzed cases of congenital Chagas disease from three distinct endemic regions (Minas Gerais and Rio Grande do Sul, Brazil, and Buenos Aires, Argentina). The microsatellite profiles showed a perfect genotypic identity between the mothers-offspring pairs analyzed, in agreement with the diagnose of congenital infection for these cases. The microsatellite analyses associated to other markers evolutionarily more conserved in *T. cruzi* (rDNA 24S α , COII and mini-exon) showed that in the Minas Gerais state the isolated parasites of all congenital cases belong to *T. cruzi* II lineage (DTU IId), whereas the isolated parasites from congenital cases from the Rio Grande do Sul state and Argentina belong to hybrid strains group (DTU IId). It is interesting that the prevalence of congenital cases of Chagas disease in south part of Brazil and Argentina seems to be much higher than in Minas Gerais. Thus, we hypothesized that the high frequency of congenital cases of Chagas disease in an endemic area is associated with the higher predominance of *T. cruzi* hybrid populations (especially from the DTU IId) circulating in this region.



INTRODUÇÃO

1) *TRYPANOSOMA CRUZI* E DOENÇA DE CHAGAS

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, foi descoberta pelo pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em Lassance, RJ, em 1909. A maneira pela qual o jovem Carlos Chagas descobriu a causa, a epidemiologia, a patologia e as manifestações clínicas desta doença foi excepcionalmente brilhante. As descobertas científicas feitas desde o descobrimento da doença de Chagas têm se processado de uma maneira gradativa, fazendo-se ainda necessário, a elucidação de muitos processos envolvidos na transmissão e tratamento da doença, assim como, no entendimento das diferentes manifestações clínicas e na entrada do parasito nas células do hospedeiro vertebrado.

1.1) O PARASITO

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado, digenético, pertencente à ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae. Os membros desta ordem se caracterizam pela presença de uma mitocôndria única e alongada que alberga uma estrutura denominada de cinetoplasto. Em *T. cruzi*, o cinetoplasto apresenta-se volumoso e contém uma fonte de DNA extranuclear denominada de DNA do cinetoplasto ou kDNA (Myler, 1993). O tamanho e a forma do cinetoplasto são variáveis em diferentes estágios do desenvolvimento do parasito (Brener,1992).

1.2) O CICLO DE VIDA

O ciclo de vida do *T. cruzi* é bastante complexo e envolve muitos estágios morfológicamente distintos, um número de estágios maior do que em qualquer outra espécie descrita dentro da família Trypanosomatidae (Kollien e Schaub, 2000).

Para que seu ciclo de vida se complete o *T. cruzi* requer a participação de um hospedeiro invertebrado (triatomíneos da família Reduviidae) e um hospedeiro vertebrado (mamíferos de diferentes ordens). Nos triatomíneos, os parasitos se multiplicam ao longo do trato digestivo sob a forma epimastigota e se diferenciam para a forma infectante tripomastigota metacíclica quando chegam à ampola retal. Durante seu repasto sanguíneo nos hospedeiros vertebrados, os triatomíneos

infectados liberam junto com as fezes ou urina as formas tripomastigotas metacíclicas, que por meio de uma lesão na pele ou diretamente pela mucosa penetram no hospedeiro vertebrado, invadem um número variado de células e iniciam seus ciclos intracelulares. No citoplasma das células, os parasitos diferenciam-se em amastigotas, o estágio replicativo, que se multiplicam por divisões binárias sucessivas e diferenciam-se para a forma tripomastigota. A célula hospedeira se rompe e as formas tripomastigotas são liberadas na corrente sanguínea, podendo tanto infectar novas células quanto serem ingeridas pelo hospedeiro invertebrado, completando assim o seu ciclo de vida.

Na célula hospedeira, a interiorização do *T. cruzi* não é um fenômeno puramente aleatório. Um aspecto interessante da biologia celular deste parasito é a sua capacidade de produzir enzimas que participam do processo de infecção das células. Esses dados revelam que o ciclo evolutivo do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado se constitui num processo complexo de reconhecimento mútuo entre a célula hospedeira e o estágio infectante (De Souza, 1984; Schenkman *et al.*, 1991).

1.3) ASPECTOS CLÍNICOS

A doença de Chagas no homem apresenta um curso clínico bastante variado. Duas fases diferentes são consideradas ao longo do desenvolvimento da doença: a fase aguda e a fase crônica.

Na fase aguda da doença de Chagas o parasito é encontrado no sangue e fluido cérebro-espinhal dos pacientes. A característica mais importante nesta fase da doença e que deve ser observada, é a porta de entrada do parasito, que pode ser evidenciada pelo inchaço unilateral de ambas as pálpebras, descrito como sinal de Romaña, quando os parasitos penetram pela mucosa ocular. Outra possibilidade da pesquisa clínica é encontrar os possíveis locais de entrada do parasito em diversas regiões da pele, conhecidos como chagomas (Rassi, 1992; revisado por Teixeira *et al.*, 2006).

A maioria das pessoas nesta fase apresenta sintomas bem moderados. Entretanto, algumas crianças, e menos freqüentemente adultos, desenvolvem sintomas mais severos depois do período de incubação que abrange de 7 a 14 dias. As manifestações clínicas podem incluir febre, aumento do volume dos linfonodos, hepatomegalia, esplenomegalia, náuseas, vômitos, diarreia, anorexia e irritação das meninges (Tanowitz *et al.*, 1992). A parasitemia durante a fase aguda é

relativamente alta e a taxa de mortalidade nesta fase pode alcançar 10 – 15% em certas regiões (Schofield, 1994).

A fase crônica da doença de Chagas compreende todos os pacientes depois dos primeiros 1-2 meses da infecção aguda, onde se observa parasitemia sub-patente (Rassi, 1992). Seguindo um padrão de sintomas relacionados, esta fase pode ser subdividida em três formas clínicas principais: cardíaca, digestiva e indeterminada, podendo ainda existir a forma cárdio-digestiva.

Na forma cardíaca os pacientes podem apresentar arritmias, falhas cardíacas, ou tromboembolismo. Na cardiomiopatia chagásica, que caracteriza a forma crônica cardíaca da doença, o coração encontra-se muitas vezes dilatado e hipertrofiado, havendo aneurisma apical e uma miocardite progressiva e fibrosante. Microscopicamente, infiltrados inflamatórios podem ser encontrados em todas as partes do coração, sendo predominantemente compostos de pequenos linfócitos (Andrade e Andrade, 1979; Palacios-Pru *et al.*, 1989). Estudos feitos em pacientes chagásicos cardiopatas mostraram uma disfunção do sistema nervoso autônomo como uma consequência da destruição do sistema de condução no coração (Tanowitz *et al.*, 1992; revisado por Prata, 2001).

A forma digestiva é usualmente manifestada como megaesôfago e/ou megacólon. O cólon de pacientes chagásicos está freqüentemente comprometido, podendo haver dilatação de todo o órgão, embora, mais freqüentemente, apenas a dilatação sigmóide seja observada. A destruição neuronal entérica tem sido considerada como um evento primordial nos mecanismos patogénéticos do megacólon chagásico (da Silveira *et al.*, 2007a, 2007b). Além do cólon, também pode haver comprometimento esofágiano. Pacientes com megaesôfago podem apresentar um aumento exagerado do órgão correspondendo à cerca de 26 vezes o seu peso normal, podendo reter por volta de 2 litros de fluido (Koeberle, 1968; Adad *et al.*, 2001)

Na forma indeterminada, do ponto de vista clínico, não há envolvimento cardíaco ou digestivo. Pacientes portadores desta forma têm prognósticos melhores do que os pacientes sintomáticos, entretanto 2% a 5% dos pacientes com a forma indeterminada da doença convertem às formas cardíaca ou digestiva, por ano, por razões ainda não esclarecidas (revisado por Prata, 2001; Umezawa, 2001).

Embora ambas as formas cardíaca e digestiva apresentem aspectos patológicos similares, como inflamação e denervação, elas diferem quanto à prevalência e distribuição geográfica que variam entre países e, no interior de cada país, entre distintas áreas endêmicas (Dias, 1992). Em países como a Venezuela e

países da América Central, a prevalência da forma megaesofágica é extremamente baixa ou praticamente ausente (Brener, 1987). No Brasil, cerca de 50 a 60% dos pacientes chagásicos crônicos apresentam a forma indeterminada da doença, 20 a 30% apresentam a forma cardíaca, 8 a 10% apresentam a forma digestiva e menos de 2% apresentam as formas clínicas combinadas. Entretanto, a ocorrência da forma digestiva dentro do próprio Brasil é bastante desigual sendo predominante na região central (Luquetti *et al.*, 1986; Dias, 1992).

A ocorrência de processos inflamatórios associados a uma aparente ausência de parasitos na fase crônica da doença levou a alguns autores sugerir que mecanismos autoimunes poderiam estar envolvidos, especialmente, na patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica (Leon e Engman, 2003; Tarleton, 2003; Cunha-Neto *et al.*, 2006; revisado por Teixeira, 2006). Porém, dados sobre a detecção do parasito por PCR em amostras de biópsia de coração, esôfago e cólon de indivíduos infectados, assim como, a demonstração da presença de antígenos de *T. cruzi* por imunohistoquímica nestes tecidos, mostraram que a persistência do parasito é a causa primária das lesões teciduais (Jones *et al.*, 1993; Umezawa, 2001; Vago *et al.*, 2003).

Ainda permanece inexplicável por que diferentes pacientes desenvolvem as formas clínicas cardíaca, digestiva, cárdio-digestiva ou indeterminada. Atualmente, acredita-se que uma das principais causas dessas diferentes manifestações clínicas está diretamente relacionada com a variação genética do *T. cruzi*, não podendo descartar, dentro deste panorama, um possível papel para os aspectos ambientais, nutricionais e imunológicos do hospedeiro (revisado por Macedo *et al.*, 2004).

A terapêutica da doença de Chagas continua parcialmente ineficaz, apesar dos grandes esforços que vêm sendo desenvolvidos por vários laboratórios e pesquisadores na procura de novas drogas. Atualmente na prática clínica, somente o Benzonidazol e o Nifurtimox têm sido usados como agentes quimioterápicos no tratamento da doença de Chagas. Estes medicamentos são especialmente indicados nos casos agudos que tenham ocorrido por transmissão vetorial, congênita, oral, transfusão sangüínea ou acidental (revisado por Prata, 2001; Luquetti *et al.*, 2005a).

1.1.4) EPIDEMIOLOGIA

A dispersão do *T. cruzi* é bastante ampla no continente Americano, especialmente o ciclo silvestre do parasito, que se estende desde a Carolina do

Norte e Maryland, EUA, até regiões meridionais do Chile e Argentina. Por sua vez, a doença de Chagas é mais restrita, limitando-se basicamente às áreas em que, por diferentes circunstâncias bioecológicas e sociais, ocorreu a domiciliação de seus vetores invertebrados: os triatomíneos. Dessa forma, a circulação original do *T. cruzi* compreende apenas a América, em especial a América Latina, e a distribuição geográfica da doença de Chagas se sobrepõe ao mapa dos triatomíneos domiciliados (Dias, 2000).

A incidência, prevalência e severidade da doença de Chagas tem sido alta na América Latina, principalmente nas áreas onde hemípteros da família Reduviidae, como *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, são os principais vetores. Apesar de haver mais de 100 espécies de triatomíneos, somente algumas espécies têm importância epidemiológica como origem regular de infecção humana (Schmuñis, 2000).

Durante o ciclo de vida do *T. cruzi* hospedeiros de diferentes espécies podem ser infectados caracterizando os ciclos doméstico e silvestre da doença de Chagas.

O ciclo silvestre do *T. cruzi* envolve a interação de vetores e hospedeiros silvestres em ecótopos naturais do continente americano. No âmbito silvestre, têm-se registrado mais de 100 espécies de pequenos mamíferos infectados naturalmente com *T. cruzi*, uma relação aparentemente muito antiga que proporciona um real equilíbrio entre hospede e hospedeiro, sem dano para nenhuma espécie (Barreto, 1979; Ryckman, 1986). Num plano mais prático, a maior importância é dada aos reservatórios capazes de aproximar-se dos seres humanos. Esses animais não só trazem o parasito para as cercanias do homem na procura de alimento e abrigo, como também ajudam na dispersão dos triatomíneos que freqüentemente carregam em suas pelagens. Os animais silvestres citados como reservatórios naturais para *T. cruzi* são os marsupiais (gambás), os edentados (tatus), os roedores (ratos e cobaias silvestres), os carnívoros (gatos, cachorros do mato, pequenas raposas, etc) e os primatas (várias espécies de macacos) (Dias, 2000).

O ciclo doméstico é considerado o de maior importância epidemiológica, já que perpetua a infecção em seres humanos (Schmuñis, 2000). Este ciclo é resultante do contato entre o homem e o vetor envolvendo a colonização de ecótopos artificiais pelos triatomíneos. Normalmente, essa colonização é resultante de modificações sociais e ecológicas no meio ambiente provocadas pelo homem (Dias, 1992). Os principais reservatórios do parasito neste ciclo são os seres humanos, cães e gatos (Schmuñis, 2000).

Existe ainda o ciclo peridoméstico, no qual intervêm animais domésticos que atuam como reservatórios de *T. cruzi* e triatomíneos silvestres atraídos às casas pela luz e pelo alimento. Este ciclo tem grande importância epidemiológica, pois serve de ligação entre os ciclos doméstico e silvestre (Schmuñis, 2000).

Os seres humanos são considerados como um hospedeiro recente para *T. cruzi*. Estima-se que o parasito emergiu como uma espécie cerca de 150 milhões de anos atrás, infectando originalmente mamíferos primitivos dispersos pelos grandes continentes, Laurasia e Gondwanaland, regiões que originaram a América do Norte e Sul, respectivamente (Briones, 1999). O primeiro contato com humanos provavelmente ocorreu mais recentemente, no Pleistoceno (30.000 a 15.000 anos atrás), quando os primeiros humanos povoaram as Américas (Pena e Santos, 2000).

Já foram descritas várias evidências que a doença de Chagas e seus vetores já eram conhecidos por certas civilizações andinas pré-colombianas. Foram detectadas, recentemente, seqüências de DNA específicas de *T. cruzi* em tecidos provenientes de múmias chilenas datadas de 9.000 anos atrás (Aufderheide *et al.*, 2003). Acredita-se que a expansão principal da doença humana tenha ocorrido no século XVII com as migrações dos colonizadores europeus para as regiões do interior da América Latina (Schofield, 1994). Estes deslocamentos demográficos propiciaram os contatos entre homens, vetores e reservatórios naturais que finalmente resultaram na ocorrência de enfermidades como a tripanossomíase, a malária, as leishmanioses e várias viroses (Dias, 2000).

A doença de Chagas continua sendo um problema de saúde prioritário na América Latina, acometendo endemicamente vários países e afetando cerca de 10 milhões de pessoas na América Latina (Schofield, 2006). No Brasil, o número de infectados pelo *T. cruzi* situa-se em torno de 3,5 milhões, destes, aproximadamente 600 mil no estado de Minas Gerais (Dias, 2001).

Apesar dos coeficientes específicos de mortalidade estarem sofrendo progressiva e consistente queda, a ocorrência de 5.355 óbitos de chagásicos, por ano, no Brasil, ainda representa a primeira causa de morte entre as doenças parasitárias. O custo social da doença também é expressivo. Cerca de 75.000 trabalhadores chagásicos apresentam cardiopatia grave, incapacitando-os para o trabalho e gerando absenteísmo de 2.250.000 dias de trabalho/ano. A doença de Chagas produz um impacto negativo significativo na vida desses brasileiros e da nação em geral, e, por isso, deve merecer atenção especial do governo e da população e ser tratada com determinação e objetividade (Dias, 2001).

As ações de controle, centradas no combate ao vetor domiciliado através do tratamento químico das habitações infestadas, alcançaram toda a área endêmica a partir de 1983. O impacto sobre a transmissão vetorial foi evidente, obtendo-se amplos e efetivos resultados no controle do vetor com a eliminação do *Triatoma infestans* das casas e do ambiente peridomiciliar em áreas endêmicas, o que levou a Comissão Intergovernamental dos Países do Cone Sul considerar livre da transmissão por essa espécie os estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo (Vinhaes, 2002).

Todavia, a transmissão da doença de Chagas está longe de ser considerada um problema do passado. Outros mecanismos de transmissão, como transplante de órgãos e acidentes de laboratório, são de menor relevância em termos de saúde pública, mas a via oral e, principalmente, a transmissão congênita vêm despontando como as principais responsáveis pela transmissão da endemia nos dias atuais. De fato, em países endêmicos, onde programas nacionais de controle vetorial e de seleção de doadores nos bancos de sangue foram desenvolvidos, a infecção congênita de *T. cruzi* tem evoluído como a principal via de transmissão não controlada do parasito de uma geração a outra e tornando um sério problema de saúde pública (Schenone *et al.*, 2001; Carlier e Torrico, 2003).

Desde a descrição da doença de Chagas congênita, por Carlos Chagas em 1911, inúmeros autores têm demonstrado a importância da forma de transmissão congênita, não só experimentalmente, mas principalmente no homem, sendo o primeiro caso humano descrito em 1949, na Venezuela (Nattan-Larrier, 1921; Dao, 1949).

A gestante pode transmitir a infecção ao feto em qualquer período da gestação, mas, via de regra, isto ocorre após o quinto mês de gestação, dependendo de instalação do parasito na placenta, mas pode acontecer também no final da gestação ou no parto, pela ingestão de líquido amniótico contaminado. Quando o feto é infectado intra-útero, podem ocorrer alterações importantes em seu crescimento que predisõem ao aborto, morte fetal, prematuridade e desnutrição fetal. Entretanto, estudos demonstraram que 90% das crianças infectadas nascem a termo, sem evidências de infecção no período neonatal (Moya, 2000). Assim, a doença de Chagas, na maioria das vezes, passa despercebida durante o pré-natal e freqüentemente também durante o período neonatal (Lorca, 2002).

A transmissão congênita depende da taxa de prevalência da infecção chagásica em gestantes, que varia segundo o grau de endemicidade da região e do risco da transmissão vertical, que também é diferente para as várias regiões: de 1% no Brasil

a 4-12% na Argentina, Bolívia, Chile e Paraguai. Além disso, a morbidade e mortalidade da infecção congênita, também variam de formas clínicas assintomáticas a formas severas e mortais da doença (Carlier e Torrico, 2003; Torrico *et al.*, 2004; Luquetti *et al.*, 2005b).

As causas exatas desta grande disparidade nos riscos de transmissão vertical entre as diferentes regiões são ainda pouco conhecidas. Fatores relacionados ao hospedeiro, tais como nível de defesa placentar e/ou capacidades fetal e maternal de desenvolverem uma resposta imune capaz de controlar a proliferação do parasito, podem estar envolvidos em tais diferenças (Hermann *et al.*, 2002, 2004). Outra possibilidade está relacionada ao polimorfismo genético do parasito, uma vez que *T. cruzi* apresenta uma estrutura populacional complexa, mostrando linhagens de parasitos com extensas diferenças em suas propriedades biológicas (Revollo *et al.*, 1998; Buscaglia e Di Nóia, 2003; revisado por Macedo *et al.*, 2004). Do mesmo modo, é possível que linhagens de *T. cruzi* de maior virulência ou parasitemias mais elevadas, possam ser transmitidas mais facilmente através da placenta e/ou ser mais patogênica para o feto, como sugerido por alguns estudos experimentais (Andrade *et al.*, 1982; Gonzalez *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 2003; Torrico *et al.*, 2005).

1.2) O GENOMA DO *T. CRUZI*

1.2.1) GENOMA MITOCONDRIAL

Nos tripanossomatídeos, a mitocôndria apresenta uma rede complexa de moléculas circulares de DNA denominada de cinetoplasto ou kDNA que codifica os RNAs ribossômicos e as enzimas envolvidas na respiração celular. O kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares denominadas de minicírculo e maxicírculo que diferem em tamanho e função (Silveira, 2000; Junqueira *et al.*, 2005).

Os minicírculos possuem cerca de 1.400 pares de base (pb) e estão presentes em torno de 10.000 a 20.000 cópias por célula. No cinetoplasto, os minicírculos aparecem entrelaçados entre si, tal como acontece entre os anéis de uma malha. Eles possuem 4 regiões de 120 a 160pb de seqüência bastante conservada entre si e que estão dispostas em ângulo de 90° uma em relação à outra. Essas regiões contêm a origem de replicação do DNA e são também conservadas entre diferentes isolados e cepas do *T. cruzi*. As regiões variáveis têm cerca de 280 a 320pb. Já foi demonstrado que essas seqüências variáveis são transcritas gerando pequenos

RNAs denominados RNAs guia (gRNAs). Estas moléculas de RNAs estão envolvidas no processo de editoração (adição ou deleção de uridinas) dos mRNAs das enzimas mitocondriais em *T. cruzi* (Stuart, 1995; Hajduk e Sabatini, 1996; Silveira, 2000; Junqueira *et al.*, 2005).

Devido ao seu alto número de cópias, os minicírculos do kDNA do *T. cruzi* têm sido utilizados como alvos preferenciais para a detecção do parasito através da PCR no sangue de animais experimentalmente infectados (Sturm *et al.*, 1989), no sangue de pacientes chagásicos (Avila *et al.*, 1991, 1993; Wincker *et al.*, 1994), nas fezes de triatomíneos (Brito *et al.*, 1995; Brenière *et al.*, 1995; Russomando *et al.*, 1996), no soro de pacientes chagásicos (Russomando *et al.*, 1992) e em tecidos cardíaco, esofágico e cólon de pacientes chagásicos crônicos (Vago *et al.*, 2000; 2003).

Os maxicírculos, por sua vez, possuem cerca de 20.000pb de tamanho e o número de cópias por célula varia de 20 a 50. Os genes das proteínas mitocondriais (citocromo oxidases, citocromo b, ATPases, NADH desidrogenase) e dos rRNAs mitocondriais estão localizados no maxicírculo. Portanto, pode-se considerar o maxicírculo como sendo análogo ao DNA mitocondrial dos demais eucariotos (Silveira *et al.*, 2000; Junqueira *et al.*, 2005). Uma característica importante do genoma dos maxicírculos, além da presença de vários genes, é a falta de alguns elementos-chave para a sua tradução, como códons de iniciação ou janelas abertas de leitura descontínuas, o que é resolvido através da adição e/ou remoção de uridinas feito pós-transcricionalmente (Simpson, 1987; Westenberger *et al.*, 2006).

Recentemente foram publicadas as seqüências de DNA de maxicírculos de duas cepas do *T. cruzi* (CL Brener e Esmeraldo). Foi demonstrado que as regiões codificantes dos maxicírculos das duas cepas apresentam pouca ou nenhuma variação de nucleotídeos, apesar de apresentar algumas inserções e/ou deleções cepa-específicas. Além das regiões codificantes, os maxicírculos de *T. cruzi* também apresentam regiões não codificantes variando de tamanho entre 4 a 6kb (quilobases), bem como a presença de um elemento apresentando seqüência conservada que pode servir como uma origem de replicação (Westenberger *et al.*, 2006).

Ainda explorando o genoma mitocondrial do *T. cruzi*, recentemente foi demonstrado um aumento da expressão do gene que codifica a subunidade 7 da NADH desidrogenase, em cepas isoladas de pacientes apresentando a forma cardíaca da doença de Chagas em relação às cepas isoladas de pacientes assintomáticos, sugerindo, então, que a análise de marcadores diferencialmente

expressos em *T. cruzi*, pode servir como uma via de diagnóstico e prognóstico, bem como, contribuir para uma maior compreensão da patogênese da doença de Chagas (Baptista *et al.*, 2006).

1.2.2) GENOMA NUCLEAR

O conteúdo de DNA total por célula em *T. cruzi* varia de 125 a 330fg (fentogramas) incluindo o DNA do cinetoplasto responsável por 16 a 30% do DNA total (McDaniel e Dvorak, 1993; Henriksson *et al.*, 1996). A existência de um intenso polimorfismo cromossômico tanto em número quanto em tamanho entre cepas e clones do *T. cruzi* pode ser responsável por essas variações de conteúdo de DNA (Wagner *et al.*, 1990; Dvorak, 1993; Henriksson *et al.*, 1996).

A organização da cromatina dos tripanossomas difere em vários aspectos daquela encontrada nos eucariotos superiores e mesmo em outros protistas. Os cromossomos não se condensam durante a divisão celular, dificultando sua análise pelos métodos convencionais de citogenética. Por muito tempo, acreditou-se que a falta de condensação cromossômica era devida à ausência de histonas nesses organismos. Mas, recentemente, foi demonstrada a presença dessas proteínas nos tripanossomas. No entanto, a histona H1 do *T. cruzi* difere em vários aspectos da proteína encontrada em eucariotos superiores e essas diferenças, possivelmente, podem impedir a estabilidade da estrutura da cromatina (Toro *et al.*, 1988; Aslund *et al.*, 1994). Além disso, a cromatina do *T. cruzi* apresenta-se pouco compactada quando comparada à cromatina de mamíferos, tornando-a frágil tanto física como enzimicamente (Solari, 1980; Toro *et al.*, 1988; Galanti *et al.*, 1998).

Somente através da técnica de PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), é que foi possível a identificação de 20 bandas cromossomais na faixa de 450Kb a 3.500Kb para o clone CL Brener, o organismo modelo utilizado no Projeto Genoma do *T. cruzi* (Santos *et al.*, 1997; Porcile *et al.*, 2003). Além disso, foi observado que a intensidade das bandas cromossômicas, coradas com brometo de etídeo, varia muito, indicando que algumas dessas bandas apresentam co-migração de mais de um cromossomo, podendo corresponder tanto a cromossomos homólogos quanto a cromossomos heterólogos de tamanhos equivalentes, indicando que o número de cromossomos pode ser possivelmente, muito maior do que 20. Estima-se que o número de cromossomos em *T. cruzi* pode variar de 64 a 80 cromossomos (Cano *et al.*, 1995; Henriksson *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 1997; Branche *et al.*, 2006).

Estudos envolvendo a ploidia em *T. cruzi* têm suportado a idéia de uma constituição predominantemente diplóide para o genoma deste parasito. Várias evidências apóiam esta idéia, tais como: medidas quantitativas de DNA por cinética de renaturação e microfluorimetria (Borst *et al.*, 1982), análises de polimorfismo de isoenzimas (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc, 1995) e hibridação de marcadores genéticos com duas bandas cromossômicas (Gibson e Miles, 1986; Henriksson *et al.*, 1990). No entanto, existem estudos que sugerem a ocorrência de poliploidias e/ou aneuploidias pelo menos em alguns cromossomos específicos do *T. cruzi* (Campetella *et al.*, 1992; Henriksson *et al.*, 1996).

O genoma nuclear completo do *T. cruzi*, representado pelo clone CL Brener, foi recentemente publicado. Estima-se que o tamanho do genoma diplóide seja entre 106,4 e 110,7Mb (megabases), sendo que pelo menos 50% do genoma é composto por seqüências repetitivas, consistindo principalmente por grandes famílias de genes que codificam para proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas. Cerca de 60% do genoma parece codificar proteínas, sendo preditos 22.570 produtos gênicos dos quais pouco mais da metade (12.570) representam cópias alélicas (El Sayed *et al.*, 2005). A comparação dos *contigs* de CL Brener com as *reads* provenientes do seqüenciamento do genoma do clone Esmeraldo, permitiu distinguir dois haplótipos diferentes em CL Brener, os quais foram chamados de haplótipos *Esmeraldo like* e *non-Esmeraldo like*. Estes dois haplótipos mostraram altos níveis de sintenia gênica, sendo que a maior parte das diferenças foi devida à inserções/deleções em regiões intergênicas e subteloméricas e/ou amplificação de seqüências repetitivas (El-Sayed *et al.*, 2005).

3) ESTUDOS DA VARIABILIDADE INTRA-ESPECÍFICA EM *T. CRUZI*

Vários estudos têm demonstrado que *T. cruzi* é um táxon muito heterogêneo (Macedo e Pena, 1998, Macedo *et al.*, 2001; Buscaglia e Di Nóia, 2003; Devera *et al.*, 2003). Devido a esta grande heterogeneidade e uma aparente ausência de reprodução sexuada em *T. cruzi*, conceitos básicos como espécie e cepa não são facilmente aplicáveis (Morel *et al.*, 1986; Tibayrenc *et al.*, 1986, 1990, 1991). O termo cepa tem sido utilizado para designar um isolado já estudado do parasito obtido a partir de um hospedeiro vertebrado ou invertebrado, constituindo-se, sobretudo, em um conceito operacional. Apesar disso, é um conceito útil para os pesquisadores, em vista da grande heterogeneidade observada entre os isolados do *T. cruzi*.

Dentre os estudos moleculares que demonstraram a diversidade genética do *T. cruzi* destaca-se, pioneiramente, a análise de variantes eletroforéticas de enzimas celulares (isoenzimas). Baseados na variabilidade de 6 isoenzimas, Miles *et al.* (1977, 1978, 1980) propuseram a existência de três grupos isoenzimáticos: Zimodemas Z1, Z2 e Z3 (zimodema é um grupo de cepas que tem o mesmo perfil de isoenzimas). Estudos epidemiológicos demonstraram que Z1 e Z3 estavam associados com o ciclo silvestre e Z2 com o ciclo doméstico de transmissão. Posteriormente, Mendonça *et al.* (2002) analisando a diversidade genética entre isolados pertencentes ao Z3 da região da Amazônia, através do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição para o RNA ribossomal, demonstraram uma dicotomia clara neste zimodema definindo dois subgrupos que foram chamados de Z3-A e Z3-B.

Trabalhos realizados por Romanha *et al.* (1979 e 1982), analisando um conjunto distinto de isoenzimas, identificaram quatro zimodemas (ZA, ZB, ZC e ZD). A comparação entre os zimodemas descritos por Miles e Romanha mostrou uma forte correlação entre os zimodemas Z2 e ZA.

Estudos subseqüentes usando 15 isoenzimas em 121 amostras do *T. cruzi* pertencentes tanto ao ciclo silvestre quanto ao ciclo doméstico e isoladas de diferentes regiões geográficas, mostraram um aumento no número de variantes de isoenzimas de 3 ou 4 grupos iniciais para 43 *clonets* diferentes (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc e Ayala, 1988).

Polimorfismos de fragmentos de restrição ou RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) do kDNA do *T. cruzi* constituíram os primeiros estudos de polimorfismo de DNA descritos neste parasito (Morel *et al.*, 1980). A restrição de kDNA foi capaz de gerar padrões complexos de bandas de forma específica para cada cepa, chamados de esquizodemas. Estudos posteriores, permitiram a avaliação da variabilidade genética do kDNA do *T. cruzi*, através da amplificação do fragmento de 330pb, proveniente das regiões variáveis dos minicírculos. A análise dessa região através do LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer - PCR*) produziu um padrão de bandas capaz de distinguir diferentes populações do parasito diretamente nos tecidos de animais e pacientes infectados (Pena *et al.*, 1994; Andrade *et al.*, 1999; Vago *et al.*, 1996, 2000; Lages-Silva *et al.*, 2006).

A avaliação do cariótipo do *T. cruzi* demonstrou que a organização cromossomal entre diferentes cepas é bem conservada, entretanto, o número e tamanho das bandas cromossômicas separadas por PFGE variam dramaticamente entre cepas e clones do *T. cruzi*, podendo ocorrer, inclusive, variações entre os

clones derivados de uma mesma cepa (Wagner *et al.*, 1990; McDaniel e Dvorak, 1993; Vargas *et al.*, 2004). Esta variabilidade no tamanho dos cromossomos entre os isolados do *T. cruzi*, pode ser atribuído principalmente a expansões/contrações de repetições teloméricas, as quais são responsáveis pelas variações de pequeno tamanho, ou a ampliações/deleções entre seqüências repetidas em *tandem*, as quais causam diferenças de tamanho maiores (Vargas *et al.*, 2004).

Com a crescente evolução das técnicas empregadas em biologia molecular, diferentes metodologias baseadas na PCR utilizando marcadores multilocais surgiram e foram utilizadas para reforçar a variabilidade genética de *T. cruzi*. Entre estas técnicas destacam-se a Impressão digital de DNA (Macedo *et al.*, 1992), o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) (Tibayrenc *et al.*, 1993) e o SSR – PCR (*Simple Sequence Repeat – PCR*) (Oliveira *et al.*, 1997).

Algumas peculiaridades são encontradas no genoma do *T. cruzi*. Como por exemplo, os mRNAs produzidos por tripanosomatídeos são os únicos em carregar uma seqüência idêntica de 39pb na sua extremidade 5' chamada de *splice leader* (SL). Esta seqüência SL é codificada por genes denominados mini-exon que existem em centenas de cópias em *tandem* no genoma do parasito e é adicionada ao mRNA através de um mecanismo de *trans-splicing*. A função exata da SL não é conhecida, mas existem evidências de que a SL confere estabilidade ao mRNA, auxiliando também a interação do mRNA com os ribossomos (Walder *et al.*, 1986; Ullu *et al.*, 1996).

Em uma PCR multiplex desenvolvida por Souto *et al.* (1996), utilizando três iniciadores diferentes, dois deles específicos para cada grupo e o terceiro comum a ambos os grupos, para amplificação do espaçador não transcrito do gene de mini-exon, foi possível agrupar as cepas do *T. cruzi* em dois grupos distintos de acordo com os produtos de amplificação. Assim, cepas que apresentaram produtos de 300pb foram caracterizadas como pertencentes ao grupo 1 e as que apresentaram produtos de 350pb foram caracterizadas como pertencentes ao grupo 2 (Souto *et al.*, 1996).

Algumas cepas, no entanto, consistentemente não apresentavam produto de amplificação para o gene de mini-exon. Baseados neste fato, Fernandes *et al.* (1998) clonaram e seqüenciaram os genes de mini-exon de algumas dessas cepas e viram que eles apresentavam uma seqüência 68,9% homóloga à seqüência do gene de mini-exon do grupo 2, porém apresentando uma inserção de aproximadamente 50pb na posição -80 em relação ao sítio inicial de transcrição, além de uma deleção de mesmo tamanho imediatamente abaixo da região

transcrita. Essas cepas foram, então, classificadas como pertencentes ao grupo 2' (Fernandes *et al.*, 1998).

Uma outra característica singular dos tripanosomatídeos é a organização do rRNA. Tanto a subunidade maior e menor do rRNA são consideravelmente maiores do que as encontradas em rRNAs de outros organismos eucariotos (Hernandez *et al.*, 1990). Além disso, a subunidade maior do rRNA é dividida em dois RNAs de alto peso molecular (24S α e 24S β) e seis RNAs de baixo peso molecular (S₁ – S₆) (White *et al.*, 1986).

Análises de seqüências do gene rDNA 24S α do *T. cruzi* com outros tripanosomatídeos revelaram uma alta homologia entre as diferentes espécies avaliadas, exceto para uma região de aproximadamente 100pb na extremidade 3' do gene do *T. cruzi* (Região divergente D7). Iniciadores desenhados para esta região mostraram um dimorfismo de tamanho no produto de amplificação. A partir deste resultado, foi proposta a classificação das cepas de *T. cruzi* em dois grupos: grupo 1, que apresenta o fragmento de 125pb e o grupo 2, que apresenta o fragmento de 110 pb (Souto e Zingales, 1993). Com o aumento do número de amostras analisadas foi observada a existência de um terceiro grupo de cepas que apresentava os dois fragmentos, sendo denominado grupo 1/2 (Souto *et al.*, 1996).

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 duas linhagens principais foi reconhecida, tendo sido oficializada uma nomenclatura *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (*Recommendations from a Satellite Meeting*, 1999). Segundo documento de consenso construído neste encontro cepas *T. cruzi* I correspondem àquelas que simultaneamente são pertencentes ao grupo 2 do rDNA 24S α , mini-exon 2 e Zimodema 1; estão primariamente associadas com o ciclo silvestre da infecção e induzem baixo parasitismo em pacientes humanos chagásicos. Cepas *T. cruzi* II correspondem àquelas do grupo 1 do rDNA 24S α , mini-exon 1 e Zimodema 2; estão relacionadas ao ciclo doméstico e causam alta parasitemia em áreas endêmicas clássicas.

Estudos epidemiológicos posteriores demonstraram evidências da associação preferencial da linhagem *T. cruzi* II com a infecção humana pelo menos no Brasil e Argentina (Di Nóia, 2002; Freitas *et al.*, 2005). Poucos foram os casos de infecção humana por *T. cruzi* I já descritos nestes países, e menos ainda, casos com sintomas clínicos (Coura *et al.*, 2002, Buscaglia e Di Nóia, 2003; Teixeira *et al.*, 2006). Por outro lado, Añes *et al.* (2004) demonstraram a ocorrência de infecção

humana por cepas da linhagem *T. cruzi* I em pacientes venezuelanos com severas e fatais manifestações clínicas de doença de Chagas aguda.

É importante ressaltar que, por decisão do *Satellite Meeting* (1999), nem todas as cepas do *T. cruzi* puderam ser devidamente agrupadas nas duas linhagens principais. Estas cepas por apresentarem características híbridas ou incongruentes permaneceram designadas somente como *T. cruzi*. Ficou estabelecido que a nomenclatura para estas cepas como, por exemplo, as classificadas como grupo 1/2 tipado pelo rDNA 24S α (Souto *et al.*, 1996), genótipo 39 (Tibayrenc, 1995) e Zimodema Z3 (Miles *et al.*, 1978) deveria ser decidida após estudos adicionais (*Recommendations from a Satellite Meeting*, 1999).

Uma tentativa de acomodar as cepas não *T. cruzi* I e não *T. cruzi* II em uma destas duas linhagens principais, foi feita Brisse *et al.* (2000, 2001). Estes autores usando tipagens por isoenzimas e RAPD, propuseram que as cepas do *T. cruzi* poderiam ser fracionadas em seis linhagens filogenéticas discretas referidas como DTUs I, IIa, IIb, IIc, IId e IIe. O esquema DTU é definido como uma coleção de cepas que são geneticamente relacionadas e que são identificadas por marcadores moleculares comuns. As cepas *T. cruzi* I permaneceram como uma linhagem única (DTU I), enquanto as cepas *T. cruzi* II foram fracionadas em cinco sublinhagens filogenéticas (DTUs IIa-e). Cada uma destas sublinhagens é representada por uma cepa de referência: CanIII cl1 (IIa), Esmeraldo cl3 (IIb), M5631 cl5 (IIc), MN cl2 (IId) e CL Brener (IIe).

As cepas pertencentes ao DTU IIa e IIc são equivalentes ao Zimodema Z3 de Miles (1978) e sua respectiva subdivisão em A/B proposta por Mendonça *et al.* (2002). As cepas pertencentes a DTU IIb são as cepas classicamente tipadas como *T. cruzi* II e as cepas classificadas nas DTUs IId e IIe são aquelas pertencentes ao grupo 1/2 pelo rDNA 24S α (Souto *et al.*, 1996) e ao genótipo 39 (Tibayrenc, 1995).

Outros trabalhos, entretanto, foram realizados e propuseram formas distintas para a divisão das cepas do *T. cruzi*. Robello *et al.* (2000), utilizando a amplificação de um fragmento de 1.030 nucleotídeos compreendendo o gene *tcpgp2*, que codifica uma proteína ligadora de ATP, subdividiram a espécie *T. cruzi* em três grandes grupos. Por sua vez, Augusto-Pinto *et al.* (2003), analisando Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNPs) dentro do gene de reparo de DNA MSH2 do *T. cruzi*, demonstraram a existência de três grupos de seqüências diferentes, que denominaram MSH2a, MSH2b e MSH2c. Segundo os autores, a seqüência MSH2a foi encontrada em cepas da linhagem *T. cruzi* I, enquanto o MSH2b é típico de cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* II. O terceiro grupo de cepas apresentou

um tipo de seqüência diferente para este gene, MSH2c. Os autores sugeriram, então, a existência de três linhagens distintas na espécie *T. cruzi*.

Recentemente, foram descritos novos aspectos da estrutura populacional do *T. cruzi*, especialmente, no que diz respeito, a caracterização de uma terceira linhagem ancestral, chamada de *T. cruzi* III (Freitas *et al.*, 2006). Neste trabalho esta nova linhagem apresentou-se constituída por cepas pertencentes ao Zimodema Z3 (Miles *et al.*, 1978), as quais são correspondentes à sublinhagem IIC proposta por Brisse *et al.* (2000, 2001).

Ultimamente, um grande esforço tem sido dispensado no sentido de identificar as cepas parentais que originaram as cepas híbridas em *T. cruzi*. Entretanto, dependendo do marcador genético empregado, diferentes histórias evolucionárias têm sido propostas (Sturm *et al.*, 2003; Westenberger *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2006).

Freitas *et al.* (2006) através de uma cuidadosa dissecação da constituição genética de blocos de genes que são transmitidos estavelmente de geração a geração do parasito propuseram que, no mínimo, dois eventos de hibridação entre as linhagens parentais *T. cruzi* II e *T. cruzi* III surgiram e produziram progênes viáveis evolucionariamente, levando a formação das cepas híbridas. Em ambos os eventos o doador citoplasmático para a geração resultante foi *T. cruzi* III, incluindo o clone CL Brener, cujo genoma foi sequenciado. Neste estudo, não foi encontrada nenhuma cepa híbrida originada a partir de *T. cruzi* I. Um outro achado fascinante foi que todas as cepas híbridas estudadas apresentaram o mesmo DNA mitocondrial, o qual é semelhante ao das cepas *T. cruzi* III e bastante diferente do DNA mitocondrial das cepas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II.

4) OS MICROSSATÉLITES

Os microssatélites, também chamados STR (*Short Tandem Repeats*) são seqüências de DNA curtas, de 1 a 6pb repetidas em *tandem* encontradas no genoma dos organismos (Beckman e Weber, 1992; Schlötterer e Tautz, 1992).

As seqüências de microssatélites têm grande potencial em adotar conformações que modificam a geometria local do DNA (Sinden, 1994). A habilidade de seqüências de microssatélites serem capazes de formar estruturas como Z-DNA, *triplex* de DNA ou estrutura em forma de grampo tem um grande impacto sobre o metabolismo do DNA, incluindo os processos de replicação, reparo e recombinação (Baran *et al.*, 1991; Kang *et al.*, 1995). Um número considerável

de evidências indica que algumas seqüências de microssatélites servem como elementos funcionalmente codificantes e regulatórios nos genomas de eucariotos (Kashi e Soller, 1999; Li *et al.*, 2004).

Após pouco tempo de sua primeira descrição (Litt e Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber e May, 1989), os microssatélites já eram empregados em muitos campos da ciência. Devido a sua abundância, dispersão no genoma e alto grau de polimorfismo de tamanho, os microssatélites são considerados como poderosos marcadores genéticos sendo amplamente usados em análises de parentesco, construção de mapas genéticos de alta densidade, estudos filogenéticos e populacionais (Goldstein e Pollock, 1997; Oliveira *et al.*, 1998; Knapick *et al.*, 1998).

Os microssatélites são classificados quanto ao tamanho da sua repetição, sendo denominados mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos para repetições que vão de 1 a 6pb, respectivamente. Os microssatélites também foram 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 e Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber e 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} . A taxa de mutação de microssatélites *in vivo* tem sido calculada em 10^{-2} por *locus* por replicação em *E. coli* (Levinson e Gutman, 1987a) e cerca de 10^{-4} a 10^{-5} em levedura (Henderson e Petes, 1992).

O mecanismo gerador de mutação em microssatélites, mais aceito atualmente, leva em consideração o movimento da DNA polimerase ao longo do DNA durante a replicação. Neste modelo, durante o processo de replicação pode ocorrer um deslizamento (*slippage*) entre as fitas de DNA quando a DNA polimerase passa por regiões de microssatélites acarretando num acréscimo ou diminuição das unidades repetitivas (Levinson e Gutman, 1987b; revisado por Ellegren, 2004). Este fenômeno pode ser observado *in vitro* durante a amplificação por PCR de seqüências de DNA contendo microssatélites. A principal característica de tais amplificações é a presença de bandas chamadas de *stutters*, as quais são representadas por produtos amplificados em menor intensidade e que diferem em

tamanho do produto principal por múltiplos do comprimento da unidade repetitiva (revisado por Ellegren, 2004). Experimentos quantitativos em condições de laboratório mostraram que a razão de *slippage* da *Taq* polimerase aumenta com o número de unidades repetitivas e é inversamente correlacionado com o comprimento da unidade repetitiva (Shinde *et al.*, 2003).

4.1) MICROSSATÉLITES EM *T. CRUZI*

Em 1998, foram isolados os primeiros 8 *loci* de microssatélites polimórficos do *T. cruzi*, a partir de uma biblioteca de DNA genômico do clone CL Brener enriquecida para repetições do tipo (AC)_n (Oliveira *et al.*, 1998).

Para verificar o grau de polimorfismo dessas repetições em *T. cruzi*, cepas e clones diferentes foram analisados com os 8 sistemas de microssatélites escolhidos. Dentre os clones analisados, todos apresentaram um único pico indicando homozigose ou dois picos de tamanhos diferentes indicando heterozigose para todos os *loci*, corroborando para a organização diplóide do genoma do *T. cruzi* (Oliveira *et al.*, 1998). Em uma análise posterior, estes *loci* de microssatélites mostraram ser marcadores com um enorme poder de resolução, uma vez que não foi observada a repetição de um único genótipo multilocal com estes oito *loci* de microssatélites em um total de 131 amostras do *T. cruzi* (Pimenta, 2002).

Estes *loci* de microssatélites também foram utilizados como marcadores genéticos para a reconstrução filogenética do *T. cruzi*. Setenta e cinco cepas monoclonais foram analisadas através de uma abordagem de parcimônia, de acordo com o modelo de mutação passo a passo. Utilizando uma distância genética baseada no número de mutações necessário para uma cepa de transformar em outra, os autores construíram um gráfico de escala multidimensional, mostrando claramente o agrupamento das cepas de *T. cruzi* em quatro grupos bem definidos: MDS A (correspondente a cepas *T. cruzi* I), MDS C (cepas *T. cruzi* II), MDS B (cepas *T. cruzi* III) e MDS BH (cepas híbridas) (Freitas *et al.*, 2006).

Os microssatélites do *T. cruzi*, embora sejam hipervariáveis, apresentam estabilidade em condições de manutenção em laboratório. Os oito *loci* de microssatélites foram analisados e não apresentaram diferenças nos tamanhos dos fragmentos amplificados durante 70 gerações de cultura contínua do clone CL Brener (Macedo *et al.*, 2001, 2004).

Como citado anteriormente, os primeiros 8 *loci* de microssatélites constituídos por repetições (AC)_n isolados no genoma do *T. cruzi* têm tido grandes aplicações

nos estudos relacionados à estrutura populacional deste parasito. Entretanto, estes *loci* apresentam algumas limitações técnicas, tais como extremidades flanqueadoras curtas às repetições o que impossibilita a escolha de novos iniciadores para o seu uso em ensaios de PCR mais sensíveis como a *nested* PCR. Aliado a isso, tem-se o fato destes *loci* de microssatélites serem constituídos por motivos de dinucleotídeos, os quais são mais susceptíveis à derrapagem da DNA polimerase nos ensaios de PCR, o que gera fragmentos de diferentes tamanhos para um mesmo alelo dificultando a análise desses produtos no seqüenciador automático de DNA. Desta forma, tornou-se necessário o isolamento de novos *loci* de microssatélites em *T. cruzi* constituídos por motivos de tri e tetranucleotídeos e apresentando extremidades flanqueadoras mais longas.

Utilizando seqüências de DNA depositadas em bancos de dados pelo Projeto Genoma do *T. cruzi*, Pimenta (2002) identificou quatro novos *loci* de microssatélites. Estes *loci* são constituídos por motivos de tri e tetranucleotídeos, mostraram-se polimórficos nas diferentes cepas do *T. cruzi* e podem ser utilizados em ensaios de PCR sensíveis o suficiente para permitir a amplificação de pequenas quantidades de DNA do parasito presentes em amostras biológicas, tais como, tecidos de pacientes cronicamente infectados e células únicas do parasito isoladas por FACS *Cell Sorter* (Pimenta, 2002).

5) GENÉTICA DE POPULAÇÃO DO *T. CRUZI*

Como mencionado, existe uma grande heterogeneidade intra-específica em *T. cruzi*. Análises de genética de população, baseadas nestes polimorfismos, têm demonstrado que o número observado de genótipos em *T. cruzi* é bastante inferior ao das combinações teóricas esperadas para cada *locus*, caracterizando um grande desvio dos valores esperados para organismos se reproduzindo de maneira aleatória, ou seja, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Além disso, foi observado um forte desequilíbrio de ligação entre os *loci*. Estes achados levaram a proposição de um modelo de estrutura clonal para as populações do *T. cruzi*, no qual este organismo não apresenta níveis detectáveis de reprodução sexuada ou recombinação genética: *T. cruzi* reproduz predominantemente por fissão binária e conseqüentemente seu genótipo nuclear diplóide é transmitido *en bloc* para a progênie (Tibayrenc, 1986, 1988, 1993, 1995; Oliveira *et al.*, 1998; Brisse *et al.*, 2000; Macedo *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2006).

Todavia, o *T. cruzi* ainda é considerado como um paradigma para microorganismos patogênicos eucarióticos clonais: a ocorrência de cepas híbridas em populações naturais do *T. cruzi* prova que eventos sexuais definitivamente tiveram lugar no passado e contribuíram de forma significativa para a estrutura genética das atuais populações do *T. cruzi*. Ademais, a detecção de um excesso de homizogotos em detrimento dos heterozigotos, verificado nas diferentes populações deste parasito, contrasta com a expectativa esperada para populações assexuais. Geralmente, em organismos assexuais os dois alelos evoluem independentemente por acúmulo de mutações e tendem, portanto, a um aumento da proporção de indivíduos heterozigotos na população. Este efeito, conhecido como "Efeito Meselson", é o que ocorre, por exemplo, nos rotíferos assexuais (revisado por Macedo *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2005).

De forma interessante, Gaunt *et al.* (2003) demonstraram experimentalmente como isolados híbridos do *T. cruzi* são originados em laboratório de pesquisa. Trabalhando com duas populações do *T. cruzi* I apresentando diferentes marcadores resistentes a drogas, estes autores foram capazes de identificar clones duplamente resistentes. Através de muitas linhas de evidências, estes híbridos apresentaram eventos de fusão entre ambos os genótipos nucleares parentais diplóides levando à formação de um estado intermediário tetraplóide, que sofreu recombinação homóloga e perda de alelos, gerando um estado aneuplóide entre diplóide e tetraplóide. Este mecanismo de troca genética definido em laboratório, compartilha características com o ciclo parassexual de *Candida albicans*, no qual há fusão de isolados diplóides para produzir um estado intermediário poliplóide que passa por uma redução genômica formando uma progênie híbrida (Heitman, 2006). Se a meiose ocorre em *T. cruzi*, ainda não está claro, embora tenham sido encontrados seis genes suficientemente conservados no genoma deste parasito, os quais são unicamente expressos em organismos eucarióticos que apresentam meiose obrigatória (El-Sayed *et al.*, 2005).

5.1) ESTRUTURA POPULACIONAL MULTICLONAL DO *T. CRUZI*

As cepas do *T. cruzi* são usualmente obtidas pela cultura de parasitos isolados de vetores triatomíneos ou hospedeiros mamíferos. Pacientes em áreas endêmicas podem ser infectados por múltiplos contatos com diferentes triatomíneos e estes, por sua vez, podem se alimentar de diferentes indivíduos infectados. Esta promiscuidade propicia a formação de populações multiclonais em hospedeiros e

vetores, levando ocasionalmente ao isolamento de populações multiclonais quando crescidas em meio de cultura nos laboratórios (Macedo e Pena, 1998).

Vários estudos moleculares já demonstraram que algumas cepas do *T. cruzi* apresentam uma estrutura multiclonal, composta por uma população de diferentes clones (Morel *et al.*, 1980; Deane *et al.*, 1984; Tibayrenc *et al.*, 1986; Araújo e Chiari, 1988; Carneiro *et al.*, 1990; Macedo *et al.*, 1992).

O isolamento e a caracterização de microssatélites em *T. cruzi* permitiu que a constituição multiclonal de algumas cepas deste parasito fosse melhor investigada. Os microssatélites são marcadores unilocais, o que faz com que possamos determinar exatamente os alelos presentes em uma cepa, permitindo-nos fazer inferências populacionais muito mais precisas do que outros marcadores aleatórios, tais como RAPD e SSR-PCR (Oliveira, 1997).

Baseados em análises de microssatélites, Oliveira *et al.* (1997, 1998) e Pimenta (2002) demonstraram que algumas cepas do *T. cruzi* possuíam mais de dois alelos para um determinado *locus* de microssatélite, sugerindo que estas cepas seriam aneuplóides para esse *locus*, ou então, que elas seriam compostas de mais de uma subpopulação de parasitos apresentando alelos diferentes para esse *locus*. Curiosamente, as cepas que apresentaram mais de dois alelos foram, na sua grande maioria, aquelas isoladas de reservatórios e vetores silvestres, ou de alguns pacientes chagásicos na fase aguda da doença. Essas cepas correspondem, justamente, àquelas que apresentaram maior grau de variabilidade genética identificada através do RAPD e do SSR-PCR, indicando que o grau de variabilidade genética observado nessas amostras pode estar intimamente relacionado com uma possível constituição multiclonal de algumas cepas do *T. cruzi* (revisado por Macedo *et al.*, 2004).

Uma vez demonstrado que algumas cepas do *T. cruzi* são, na verdade, formadas por um conjunto de populações geneticamente distintas, os estudos populacionais neste parasito precisam ser modificados. As análises de genética de população realizadas até hoje levaram em consideração não indivíduos, mas grupos de parasitos. Em estudos populacionais com *T. cruzi*, o ideal seria que os indivíduos diferentes presentes nas cepas fossem individualizados ou clonados antes de serem analisados.

Alguns estudos em populações policlonais artificiais baseados em diluição limitante foram realizados na tentativa de isolar os diferentes clones do *T. cruzi* presentes (Dvorak, 1984; Postan *et al.*, 1984; Pinto *et al.*, 1998). Entretanto, esse tipo de abordagem tem suas limitações, uma vez que nem todos os clones são

capazes de se desenvolver bem em meio de cultura e não estão presentes na mesma proporção, fazendo com que alguns clones sejam sub-representados ou, muitas vezes, nem sejam isolados.

Através de análises de populações artificialmente heterogêneas, Pimenta (2002) demonstrou que a separação de células do *T. cruzi* através do FACS *Cell Sorter* é uma tecnologia poderosa e capaz de identificar, indubitavelmente, os diferentes clones presentes em uma população mista. Desta 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).



JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas, causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, acomete cerca de 13 milhões de pessoas nas Américas. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, 21.000 pessoas morrem anualmente em decorrência da doença e 200.000 novos casos são detectados todos os anos nas regiões afetadas (WHO, 2005).

Para caracterizar o *T. cruzi* diretamente em amostras biológicas contendo pequenas quantidades do DNA do parasito, é necessária a adoção de uma técnica sensível o suficiente para detectar e distinguir individualmente as cepas do *T. cruzi* presentes nestas amostras. Neste contexto, o advento do LSSP-PCR abriu novas possibilidades em estudos epidemiológicos da infecção do *T. cruzi*, porém esta técnica apresenta algumas limitações. A análise dos perfis de LSSP-PCR pode ser uma tarefa difícil, já que a técnica envolve uma etapa de amplificação aleatória, o que gera perfis bastante complexos. Dessa forma, é impossível associar bandas específicas do LSSP-PCR com *loci* específicos do kDNA. Tentando contornar estes problemas, recentemente foi descrita a aplicação de uma estratégia de *hemi-nested* PCR em tempo real para a amplificação do gene rDNA 24S α diretamente em tecidos humanos infectados. Embora de sucesso, esta técnica, não é eficaz para distinguir individualmente cepas e clones do parasito dentro das principais linhagens, uma vez que o alvo, o rDNA 24S α , é relativamente conservado entre parasitos dentro de uma mesma linhagem filogenética principal. Os microssatélites, sobre outra visão, são marcadores nucleares e geram perfis altamente individuais e reproduzíveis.

Uma vez que os *loci* de microssatélites do tipo (AC)_n descritos em *T. cruzi* não podem ser utilizados em ensaios de *full nested* PCR, por causa do tamanho reduzido das extremidades flanqueadoras entre as repetições, neste trabalho, utilizando os resultados obtidos do seqüenciamento do genoma do clone CL Brener, foram analisadas a abundância, composição e dispersão dos microssatélites no genoma deste parasito. Além disso, foram selecionados e caracterizados novos *loci* de microssatélites constituídos por motivos de tri e tetranucleotídeos com grandes regiões flanqueadoras e que podem ser utilizados em estratégias de *full nested* PCR diretamente em tecidos de pacientes chagásicos e em células únicas do parasito separadas por FACS *Cell Sorter*.

A estratégia de separação das diferentes subpopulações que formam as cepas policlonais do *T. cruzi* através do FACS *Cell Sorter* é uma poderosa ferramenta que nos permite responder diversas questões, tais como: quantos clones diferentes do parasito formam uma cepa policlonal? Estes clones são semelhantes geneticamente? Clones pertencentes a grupos filogenéticos diferentes podem coexistir dentro de uma única cepa? Qual o percentual de representatividade de

cada clone dentro da população original? E ainda, será que ao invés de assumirmos que algumas cepas são policlonais, poderemos afirmar que, na verdade, são cepas aneuplóides? A resposta a todas essas perguntas abre novas perspectivas para os estudos populacionais deste parasito, bem como, um melhor entendimento da dinâmica existente entre os ciclos silvestre e doméstico de transmissão da doença de Chagas.

Após o controle da transmissão vetorial da doença de Chagas outros mecanismos de transmissão, como a transmissão congênita vem despontando como uma das principais responsáveis pela transmissão da endemia nos dias atuais. Em relação à transmissão congênita da doença de Chagas, diversas questões precisam ser respondidas: Existem cepas do *T. cruzi* mais intimamente associadas aos casos de transmissão congênita? Elas pertencem a alguma linhagem filogenética específica? Há diversidade populacional de parasitos nas gestantes? Quantas populações diferentes podem ser detectadas em uma gestante? Há a transmissão para o feto da totalidade das subpopulações presentes na gestante? Em casos de doença de Chagas congênita de gravidez múltipla, todos os fetos são igualmente infectados? Pelas mesmas subpopulações de parasitos? A resposta a essas perguntas fará com que medidas de profilaxia e controle da doença de chagas congênita sejam melhor estabelecidas.

No presente trabalho pretende-se, então, desenvolver novos marcadores e ferramentas moleculares objetivando a resolução de várias destas questões.



OBJETIVOS



OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologias baseadas na análise de polimorfismos de microssatélites que permitam estudos mais refinados sobre a estrutura populacional e evolução da espécie *Trypanosoma cruzi* e aplicá-las a diferentes problemas biológicos e clínicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência, composição e dispersão de microssatélites constituídos por motivos de di, tri e tetranucleotídeos no genoma do *T. cruzi*.
- Identificar e caracterizar novos *loci* de microssatélites no genoma do *T. cruzi*.
- Mapear fisicamente os *loci* de microssatélites no genoma do *T. cruzi*.
- Aplicar a análise de polimorfismos de microssatélites em estudos de:
 - tecidos humanos e de camundongos infectados com *T. cruzi*;
 - células únicas de cepas multiclonais do *T. cruzi* separadas por FACS *Cell Sorter*;
 - casos de transmissão congênita da infecção pelo *T. cruzi*.



MATERIAIS E MÉTODOS

1) CEPAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

A Tabela 1 mostra a relação das cepas do *T. cruzi* utilizadas neste estudo, assim como o hospedeiro do qual elas foram isoladas, sua origem geográfica e sua classificação de acordo com Brisse *et al.* (2000, 2001) e Freitas *et al.* (2006), quando disponível. As amostras de DNA usadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Egler Chiari, Laboratório de Biologia do *T. cruzi*, Departamento de Parasitologia, UFMG. Pelo Dr. Octávio Fernandes e Dr. José Rodrigues Coura, Departamento de Medicina Tropical, Fiocruz, Rio de Janeiro. Pela Dra. Bianca Zingales, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo. Pela Dra. Maria Terezinha Bahia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Pela Dra. Mônica Lúcia Gomes, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná. Pelo Dr. Michael Tibayrenc, *Centre d'Etudes sur le Polymorphisme des Microorganismes*, Montpellier, França. E pelo Dr. Alejandro Schjiman, *Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)*, Buenos Aires, Argentina.

2) AMOSTRAS DE TECIDOS DE CAMUNDONGOS

Foram obtidas amostras de tecidos provenientes de coração e reto de 3 camundongos machos (BALB/c) infectados com 50 formas tripomastigotas da cepa JG + 50 formas tripomastigotas do clone Col.17G2 (clone obtido por diluição limitante da cepa Colombiana) e sacrificados após 6 meses de infecção. As amostras de tecidos foram processadas pelo protocolo de lise alcalina com 50mM NaOH, fervura por 10min, seguido pela neutralização com 130mM Tris-HCl pH 7,0 (Andrade *et al.*, 1999). Os lisados foram diluídos 10 vezes em água Milli-Q estéril e 3 μ L foram usados diretamente nos ensaios de PCR.

3) AMOSTRAS DE TECIDOS HUMANOS

Foram analisados fragmentos de tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) obtidos de dois pacientes brasileiros (JP e DF) apresentando cardiopatia chagásica crônica, sem megasíndromes digestivas, obtidos pela Dra. Maria da Consolação Vieira Moura, Faculdade de Medicina, UFMG. Os fragmentos de tecidos foram

Tabela 1 – Cepas e clones do *Trypanosoma cruzi* analisados neste trabalho.

Cepas/Clones	Hospedeiro/Vetor	Origem	DTU ¹	Linhagem ²
84	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
115	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	ND	<i>T. cruzi</i> III
138	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	ND	<i>T. cruzi</i> II
182	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	I Id/e	Híbrido
209	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
226	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	I Ic	<i>T. cruzi</i> III
231	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	I Ic	<i>T. cruzi</i> III
241	<i>Homo sapiens</i>	?	ND	ND
520/5	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	ND	ND
578	<i>Homo sapiens</i>	GO/Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
580	<i>Homo sapiens</i>	GO/Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
581	<i>Homo sapiens</i>	GO/Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
1009 ³	<i>Panstrongilus megistus</i>	MG/Brasil	ND	<i>T. cruzi</i> I
1014	<i>Panstrongilus megistus</i>	MG/Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
1023	<i>Triatoma infestans</i>	MG/Brasil	ND	ND
1030	<i>Triatoma infestans</i>	MG/Brasil	ND	ND
1043	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
3869 ⁴	<i>Homo sapiens</i>	AM/Brasil	I Ic	<i>T. cruzi</i> III
4166 ⁴	<i>Rhodnius brethesi</i>	AM/Brasil	ND	ND
4167 ⁴	<i>Rhodnius brethesi</i>	AM/Brasil	ND	ND
4181 ⁴	<i>Rhodnius brethesi</i>	AM/Brasil	ND	ND
4182 ⁴	<i>Rhodnius brethesi</i>	AM/Brasil	I Ic	<i>T. cruzi</i> III
200pm	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
A316A R7	<i>Triatoma infestans</i>	PA/Brasil	ND	ND
Bas	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
Berenice-62	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
Berenice-78 ³	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
Berenice-78 1A ⁵	<i>Canis familiaris</i>	MG/Brasil	ND	ND
Berenice-78 1B ⁵	<i>Canis familiaris</i>	MG/Brasil	ND	ND
Berenice-78 1C ⁵	<i>Canis familiaris</i>	MG/Brasil	ND	ND
Berenice-78 1D ⁵	<i>Canis familiaris</i>	MG/Brasil	ND	ND
Berenice-78 25A ⁶	<i>Mus musculus</i>	MG/Brasil	ND	ND
Berenice-78 25B ⁶	<i>Mus musculus</i>	MG/Brasil	ND	ND
Berenice-78 25C ⁶	<i>Mus musculus</i>	MG/Brasil	ND	ND
Berenice-78 25D ⁶	<i>Mus musculus</i>	MG/Brasil	ND	ND
CanIII cl1	<i>Homo sapiens</i>	PA/Brasil	IIa	Híbrido
CL Brener	<i>Triatoma infestans</i>	MG/Brasil	IIe	Híbrido
Col1.7G2	<i>Homo sapiens</i>	Colômbia	I	<i>T. cruzi</i> I
Col18/5 ³	<i>Homo sapiens</i>	Colômbia	I	<i>T. cruzi</i> I
ColRS ³	<i>Homo sapiens</i>	Colômbia	I	<i>T. cruzi</i> I
CPI11/94	<i>Homo sapiens</i>	PI/ Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
CPI94/95	<i>Homo sapiens</i>	PI/ Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
CPI103894 ³	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	I Ib	<i>T. cruzi</i> II
D7	<i>Didelphis marsupialis</i>	RJ/ Brasil	I	<i>T. cruzi</i> I

Tabela 1 – Cepas e clones do *Trypanosoma cruzi* analisados neste trabalho (continuação).

Cepa	Hospedeiro/Vetor	Origem	DTU ¹	Linhagem ²
Dm28c ³	<i>Didelphis marsupialis</i>	Venezuela	I	<i>T. cruzi</i> I
Esmeraldo cl3	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	IIb	<i>T. cruzi</i> II
G ³	?	?	ND	<i>T. cruzi</i> I
Gilmar ³	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	IIb	<i>T. cruzi</i> II
Gambá cl1	<i>Didelphis azarae</i>	SP/Brasil	I	<i>T. cruzi</i> I
GLT564	<i>Leonthopitecus rosalia</i>	RJ/ Brasil	IIb	<i>T. cruzi</i> II
GOCH	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	IIb	<i>T. cruzi</i> II
Ig200Ti	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	ND	ND
JG	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	IIb	<i>T. cruzi</i> II
JM	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	ND	ND
K98 ³	<i>Homo sapiens</i>	Argentina	I	<i>T. cruzi</i> I
MC	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	ND	ND
MCS156949	<i>Homo sapiens</i>	DF/ Brasil	IIb	<i>T. cruzi</i> II
MPD	<i>Homo sapiens</i>	MG/Brasil	IIb	<i>T. cruzi</i> II
OPS21 cl11	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela	I	<i>T. cruzi</i> I
P209 cl1	<i>Homo sapiens</i>	Bolívia	I	<i>T. cruzi</i> I
RA ³	<i>Homo sapiens</i>	Argentina	IId/e	Híbrido
RB 1	<i>Rhodnius brethesi</i>	AM/ Brasil	I	<i>T. cruzi</i> I
RB 3	<i>Rhodnius brethesi</i>	AM/Brasil	ND	ND
RB 6	<i>Rhodnius brethesi</i>	AM/ Brasil	I	<i>T. cruzi</i> I
RB 7	<i>Rhodnius brethesi</i>	AM/Brasil	ND	ND
RB 8 ⁴	<i>Rhodnius brethesi</i>	AM/Brasil	ND	ND
RB 10 ⁴	<i>Rhodnius brethesi</i>	AM/Brasil	ND	ND
Silvio X10 cl1	<i>Homo sapiens</i>	PA/Brasil	I	<i>T. cruzi</i> I
SO3 cl5	<i>Triatoma infestans</i>	Bolívia	IId	Híbrido

¹ DTU's I, IIa, IIb, IIc, IId e IIe são classificações para as cepas do *T. cruzi* descritas por Brisse *et al.* (2000, 2001).

² *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, *T. cruzi* III e híbridos são classificações para as cepas do *T. cruzi* de acordo com Freitas *et al.* (2006).

³ A linhagem destas cepas do *T. cruzi* foi previamente determinada pela amplificação do gene rDNA 24S α (Souto *et al.*, 1996) e pelo RFLP do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II (Freitas *et al.*, 2006).

⁴ Cepas pertencentes ao Zimodema Z3 de Miles *et al.* (1978).

⁵ Estas cepas são resultantes da passagem da cepa parental Berenice-78 em cães, sem raça definida.

⁶ Estas cepas são resultantes da passagem da cepa parental Berenice-78 em cães, sem raça definida, seguida de 25 passagens sucessivas em camundongos albinos Swiss.

ND: não determinada.

?: dados não disponíveis.

obtidos dos pacientes quando os mesmos foram submetidos a transplante cardíaco no centro cirúrgico do Hospital Felício Rocho, Belo Horizonte, MG, Brasil. Imediatamente após a cirurgia, os fragmentos do músculo cardíaco foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até que o DNA fosse extraído.

Paralelamente, foram analisadas amostras clínicas de pacientes argentinos infectados com *T. cruzi*: sangue de dois pacientes com doença de Chagas cardíaca crônica severa (ChHD-S e ChHD-T), sangue e fluido cerebrospinal de um paciente com encefalite chagásica (AS e AL, respectivamente), sangue de um recém-nascido com doença de Chagas congênita (HE), placenta de uma gestante (PI) e amostra de pele obtida por biópsia de um chagoma epidérmico em um paciente que apresentou reativação da doença de Chagas após transplante de coração (Sk-L).

Estas amostras de tecidos de pacientes chagásicos foram gentilmente cedidas pelo Dr. Alejandro Schijman (INGEBI-CONICET), Buenos Aires, Argentina e pela Dra. Stella Gonzalez Cappa, Faculdade de Medicina, Universidade de Buenos Aires, Argentina. Em todos os casos, o consentimento informado foi fornecido pelos pacientes ou suas famílias e certificamos que a análise destes casos foi devidamente aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) e INGENBI-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

4) AMOSTRAS ISOLADAS DE PACIENTES ENVOLVIDOS NA TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS CONGÊNITA

Foram analisados casos de transmissão congênita da infecção pelo *T. cruzi* provenientes de 3 regiões endêmicas diferentes: Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Brasil) e Buenos Aires (Argentina). A Tabela 2 mostra a relação dos pacientes envolvidos em casos de transmissão congênita da doença de Chagas analisados neste trabalho.

As crianças provenientes da cidade de Berilo (1J, 7J, 8J e 11J), Vale do Jequitinhonha, MG, com idade média de 12 anos tiveram sorologia positiva para pelo menos dois dos testes sorológicos recomendados pela Organização Mundial de Saúde e pelo Ministério da Saúde brasileiro: ELISA, Imunofluorescência Indireta e Hemoaglutinação. Os exames clínicos e físicos revelaram que todas as crianças eram assintomáticas para a doença de Chagas, mostrando eletrocardiogramas convencionais normais. As hemoculturas foram positivas para as cinco crianças, geralmente dentro do primeiro mês de cultivo dos parasitos em meio LIT (*Liver*

Tabela 2 – Descrição das amostras isoladas de pacientes envolvidos nos casos suspeitos de transmissão congênita da doença de Chagas analisadas neste trabalho.

Identificação	Origem	Data de Positividade da Hemocultura
1J (Filho) ¹	Berilo-MG	16.07.2004
3J (Mãe) ¹	Berilo-MG	16.07.2004
7J (Filho) ¹	Berilo-MG	16.07.2004
4J (Mãe) ¹	Berilo-MG	16.07.2004
8J (Filha) ¹	Berilo-MG	16.07.2004
5J (Mãe) ¹	Berilo-MG	16.07.2004
11J (Filho) ¹	Berilo-MG	16.07.2004
6J (Mãe) ¹	Berilo-MG	16.07.2004
94a (Mãe) ¹	Alvorada de Minas-MG	25.06.1999 19.04.2001
GAR(Filho)	Alvorada de Minas-MG	20.11.1998
CCIF (Mãe) ¹	Alvinópolis-MG	02.05.2006
CAF (Filha) ¹	Alvinópolis-MG	02.05.2006
MRAS (Mãe) ²	Montes Claros-MG	Hemocultura negativa 10.04.2001
MICA (Filha1) ^{1,2}	Montes Claros-MG	23.06.2004 21.03.2005
MICG (Filha2) ²	Montes Claros-MG	Hemocultura negativa
3061 ¹	Rio Grande do Sul	21.08.2004
3062 ¹	Rio Grande do Sul	21.08.2004
3062 ¹	Rio Grande do Sul	10.03.2005
3064 ¹	Rio Grande do Sul	20.08.2004
3054 ¹	Rio Grande do Sul	30.08.2004
3053 ¹	Rio Grande do Sul	21.08.2004
3052 ¹	Rio Grande do Sul	20.08.2004
3052 ¹	Rio Grande do Sul	28.01.2005
3051 ¹	Rio Grande do Sul	21.08.2004
3050 ¹	Rio Grande do Sul	20.08.2004
3048 ¹	Rio Grande do Sul	21.08.2004
3048 ¹	Rio Grande do Sul	10.03.2005
3047 ¹	Rio Grande do Sul	24.08.2004
3046 ¹	Rio Grande do Sul	21.08.2004
3045 ¹	Rio Grande do Sul	24.08.2004
3043 ¹	Rio Grande do Sul	20.08.2004
3042 ¹	Rio Grande do Sul	24.08.2004
3042 ¹	Rio Grande do Sul	10.03.2005
3041 ¹	Rio Grande do Sul	27.08.2004
3038 ¹	Rio Grande do Sul	24.08.2004
3037 ¹	Rio Grande do Sul	24.08.2004
3036 ¹	Rio Grande do Sul	21.03.2005
3035 ¹	Rio Grande do Sul	20.08.2004
3033 ¹	Rio Grande do Sul	24.08.2004
3032 ¹	Rio Grande do Sul	11.03.2005

Tabela 2 – Descrição das amostras isoladas de pacientes envolvidos nos casos suspeitos de transmissão congênita da doença de Chagas analisadas neste trabalho (continuação).

Identificação	Origem	Data de Positividade da Hemocultura
3023 ¹	Rio Grande do Sul	24.04.2004
3019 ¹	Rio Grande do Sul	24.08.2004
3005 ¹	Rio Grande do Sul	24.08.2004
3006 ¹	Rio Grande do Sul	24.08.2004
3007 ¹	Rio Grande do Sul	24.08.2004
3003 ¹	Rio Grande do Sul	20.08.2004
3002 ¹	Rio Grande do Sul	21.08.2004
814 (mãe) ²	Argentina	n.r. ³
801 (filha1) ²	Argentina	n.r. ³
802 (filha2) ²	Argentina	n.r. ³

¹Material analisado: DNA extraído de parasitos crescidos em cultura.

²Material analisado: DNA extraído de sangue dos pacientes

³n.r.: não realizada.

Infusion Tryptose). As crianças chagásicas foram tratadas com benzonidazol (Rochagan, Roche, SP, Brasil) seguindo o protocolo recomendado pelo Ministério da Saúde, consistindo de 8mg/Kg/dia por 60 dias consecutivos. A forma clínica apresentada pelas mães dessas crianças ainda está sendo avaliada.

No caso congênito proveniente de Alvorada de Minas-MG, a mãe (94a) apresenta a forma cardíaca da doença de Chagas. O filho (GAR), nasceu aparentemente normal (data de nascimento: 04.01.1992), mas atualmente, apresenta a forma cardíaca da doença. Após tratamento com benzonidazol (10mg/Kg/dia), GAR apresentou hemocultura negativa após 120 dias com amostras de sangue coletadas após 2, 12 e 19 meses do início do tratamento. Entretanto, de acordo com a última avaliação (12.10.2004), ele mostrou-se reativo para o teste ELISA.

O caso congênito proveniente de Alvinópolis-MG, a mãe CCIF apresenta a forma cardíaca da doença de Chagas e a filha CAF é assintomática. Tanto a mãe como a filha iniciaram o tratamento com benzonidazol (10mg/Kg/dia) em 21.08.2006 e 21.06.2006, respectivamente. Segundo dados obtidos com a última avaliação sorológica realizada em 16.03.2007, a filha (CAF) mostrou-se reativa para Imunofluorescência Indireta (IgG, 1/40) e ELISA.

Um caso de gravidez múltipla proveniente de Montes Claros-MG também foi analisado. Duas irmãs gêmeas bivitelinas nasceram de uma mãe na fase indeterminada da doença de Chagas. As duas irmãs foram diagnosticadas como infectadas com *T. cruzi* através dos exames ELISA, Hemoaglutinação e Imunofluorescência Indireta. As duas filhas são assintomáticas para a doença de Chagas. Mesmo após o tratamento com benzonidazol (10mg/Kg/dia) (dois tratamentos com intervalo de 3 anos), a Filha1 (MICA) sempre apresentou os testes sorológicos positivos e três hemoculturas positivas com 30 dias após a coleta de sangue. Já a filha2 (MICG), não apresentou nenhuma hemocultura positiva mesmo após 120 dias da coleta de sangue e, após os tratamentos com benzonidazol, os testes sorológicos mostraram-se ora reativos ora não-reativos para *T. cruzi*. Segundo a última avaliação laboratorial realizada em 10.04.2007, a filha1 (MICA) mostrou-se reativa para Imunofluorescência Indireta (IgG, 1/320), ELISA e Hemoaglutinação, e a filha2 (MICG) reativa para Imunofluorescência Indireta (IgG, 1/80) e ELISA.

Um outro caso de gravidez múltipla proveniente de Buenos Aires, Argentina, também foi analisado. Duas irmãs gêmeas bivitelinas nasceram de uma mãe na fase indeterminada da doença de Chagas. Para critério de diagnóstico da infecção

congênita pelo *T. cruzi*, amostras de sangue periférico das gêmeas foram analisadas por microhematócrito (MH) após o nascimento. As duas irmãs foram diagnosticadas como infectadas com *T. cruzi* com base na detecção do parasito por MH. Foram realizados também testes sorológicos por ELISA e Hemoaglutinação. As duas irmãs mostraram-se positivas para a infecção de *T. cruzi* nestes dois testes. As crianças infectadas foram tratadas com benzonidazol (Radanil, Roche, Buenos Aires, Argentina) 5–8 mg/kg/dia em duas doses diárias por 60 dias.

Todas estas amostras foram gentilmente cedidas pela Dra. Marta de Lana, do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, UFOP. Pela Dra. Eliana Gontijo, Faculdade de Medicina, UFMG. Pela Dra. Eliane Lages, da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (FMTM). E pelo Dr. Alejandro Schijman, do INGEBI-CONICET, Buenos Aires, Argentina. Em todos os casos, o consentimento informado foi fornecido pelos pacientes ou suas famílias e certificamos que a análise destes casos foi devidamente aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), UFOP e INGEBI-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

5) EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de sangue conservadas em guanidina-HCl pH 8,0 e as cepas isoladas por hemoculturas foram submetidas a um processo de extração de DNA total com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA total foi precipitado usando 10% acetato de sódio 3M e etanol absoluto. Em seguida, o DNA foi ressuspendido em 20µL de água Milli-Q estéril e 3µL foram usados nos ensaios de PCR. As amostras de tecidos foram processadas pelo protocolo de lise alcalina como descrito no item 2 desta seção. Alternativamente, o DNA de algumas amostras de tecidos humanos foi obtido usando o *Kit QiAmp Tissue* (Qiagen, CA, USA), como descrito por Schijman *et al.* (2000).

6) PESQUISA POR *LOCI* DE MICROSSATÉLITES NO GENOMA DO *T. CRUZI*

Para avaliar a abundância, composição e distribuição dos *loci* de microssatélites no genoma do *T. cruzi*, foi feita uma análise utilizando os dados obtidos com o seqüenciamento do genoma deste parasito (El-Sayed *et al.*, 2005).

Para este estudo, todas as seqüências de DNA presentes nos dois haplótipos da cepa CL Brener (haplótipo *Esmeraldo like* e haplótipo *non-Esmeraldo like*) foram submetidas ao programa SSRIT (*Simple Sequence Repeats Identification Tool*)

(Temnykh *et al.*, 2001) para identificar *loci* de microssatélites perfeitos compostos por repetições de di, tri e tetranucleotídeos. Foram utilizados os parâmetros básicos do programa, sem modificações. Paralelamente, também foi feita uma outra análise nos bancos de seqüências de DNA de regiões do genoma de *T. cruzi* que são codificantes (CDS) e regiões intergênicas não codificantes (Inter-CDS) para verificar a distribuição e quais motivos de microssatélites são mais abundantes nestas regiões.

7) IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS *LOCI* DE MICROSSATÉLITES EM *T. CRUZI*

Para obtenção de novos *loci* de microssatélites em *T. cruzi* foi utilizado o programa de computador *Tandem Repeats Finder* (Benson, 1999). Seqüências de DNA do clone CL Brener, obtidas pelo Projeto Genoma de *Trypanosoma cruzi* e depositadas em banco de dados (Tabela 3), foram copiadas do *GenBank* e submetidas ao programa para procura de novos microssatélites. Foram utilizados os parâmetros básicos fornecidos pelo programa, sem modificações.

8) MAPEAMENTO FÍSICO DOS *LOCI* DE MICROSSATÉLITES NO GENOMA DO *T. CRUZI*

Todos os *loci* de microssatélites estudados neste trabalho e suas respectivas regiões flangeadoras foram mapeados no genoma anotado de CL Brener, recentemente publicado por El-Sayed *et al.* (2005). Para essa análise, foi usado o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), (Altschul *et al.*, 1990). Além disso, por meio desta ferramenta, foi avaliado se estes mesmos *loci* estão presentes em regiões codificantes ou não codificantes no genoma de *T. cruzi*.

9) PCR DE MICROSSATÉLITES EM DNA DE CEPAS DO *T. CRUZI*

O DNA de cepas do *T. cruzi* provenientes de reservatórios silvestres e hospedeiros humanos foi submetido a ensaios de PCR com *loci* de microssatélites compostos por repetições de tri e tetranucleotídeos. Os iniciadores utilizados para a amplificação destes *loci* de microssatélites no genoma de *T. cruzi* foram desenhados utilizando o programa Oligo (Rychlik, 1991) e sintetizados pela empresa ALPHA DNA (Montreal, Quebec, Canadá). As seqüências dos iniciadores estão descritas na Tabela 4. Em todos os casos, um dos iniciadores internos do par foi marcado com fluoresceína na sua extremidade 5'.

Tabela 3 - Seqüências de DNA do *T. cruzi* depositadas no *GenBank* e submetidas ao programa *Tandem Repeats Finder*.

Numero de Acesso no Genbank	Descrição	Tamanho (pb)	Referência
AF052831	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener cosmídio 1o17 cromossomo 3	39240	Andersson <i>et al.</i> , 1998
AF052832	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener cosmídio 1b21 cromossomo 3.	41587	Andersson <i>et al.</i> , 1998
AF052833	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener cosmídio 1m17 cromossomo 3	35031	Andersson <i>et al.</i> , 1998
AC137988	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener, seqüência completa do cromossomo 3 (cosmídeos 1o17, 1m17, 1b21, 2n11).	105.864	Andersson <i>et al.</i> , 2003
BH842909	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener, clone TC3-58O18, seqüência de DNA proveniente de biblioteca randômica.	554	Andersson <i>et al.</i> , 2002
AC096913.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener, cosmídeo 39p3, quatro peças desordenadas.	31626	Andersson <i>et al.</i> , 2001

Tabela 4 - Seqüências dos iniciadores utilizados neste trabalho.

Iniciador	Seqüência
SCLE10-direto	5'-GATCCCGCAATAGGAAAC-3'
SCLE10-reverso	5'-FluoresceínaGTGCATGTTCCATGGCTT-3'
SCLE11-direto	5'-FluoresceínaACGACCAAAGCCATCATT-3'
SCLE11-reverso	5'-GATGCTAACTGCTCAAGTGA-3'
MCLF10-direto	5'-FluoresceínaGCGTAGCGATTCAATTCC-3'
MCLF10-reverso	5'-ATCCGCTACCACTATCCAC-3'
MCLG10-direto	5'-FluoresceínaAGGAGTCAAATATAATGAGGCA-3'
MCLG10-reverso	5'-ACGTGTGAAAGGCATCTATC-3'
TcAAT8-direto	5'-FluoresceínaACCTCATCGGTGTGCATGTC-3'
TcAAT8-reverso	5'-TATTGTCGCCGTGCAATTC-3'
TcAAT8ex-direto	5'-AGAGGCGCACAGTTGTATGC-3'
TcAAT8ex-reverso	5'-GACGCTTTATGTTGAATCA-3'
TcATT14-direto	5'-FluoresceínaTTATGGATGGGGTGGGTTTG-3'
TcATT14-reverso	5'-AGCAATAATCGTATTACGGC-3'
TcATT14ex-direto	5'-TTTGCAAATGGGACAGTTAC-3'
TcATT14ex-reverso	5'-ACCTATTTTGCTCCTTGGTG-3'
TcCAA10-direto	5'-FluoresceínaGCACAGGGAGTCAAACCTCA-3'
TcCAA10-reverso	5'-TCAAATTTATCACCCGTCGA-3'
TcCAA10ex-direto	5'-GGTAAGGGCGAGTATGACTG-3'
TcCAA10ex-reverso	5'-TAGCCAATAAAAGTGATGCC-3'
TcGAG10-direto	5'-FluoresceínaTTCTCGGCTTCTATGTGTGC-3'
TcGAG10-reverso	5'-GTGCCCTCCGTTTATTCCTC-3'
TcGAG10ex-direto	5'-TTTCTTACTGCGAGGTGAGT-3'
TcGAG10ex-reverso	5'-AAGTGAAGTGAAGTGGTGCC-3'
TcTAC15-direto	5'-FluoresceínaGAATTTCCCCATTTCCAAGC-3'
TcTAC15-reverso	5'-CGATGAGCAACAATCGCTTC-3'
TcTAC15ex-direto	5'-GGATATTTGTTACTGCTGGC-3'
TcTAC15ex-reverso	5'-CGGACATATCCCTCTAGTCG-3'
TcTAT20-direto	5'-FluoresceínaGATCCTTGAGCAGCCACCAA-3'
TcTAT20-reverso	5'-CAAATCCCAACGCAGCAGC-3'
TcTAT20ex-direto	5'-AGGCTGATCCTTGAGCAGCC-3'
TcTAT20ex-reverso	5'-CGGCGGTCTTCTTTGTCTC-3'
TcAAAT6-direto	5'-FluoresceínaGCCGTGCTCTAAAGAGCAAG-3'
TcAAAT6-reverso	5'-GGTTTTAGGGCCTTAGGTG-3'
TcAAAT6ex-direto	5'-ACGCACTCTTTGTAAACAG-3'
TcAAAT6ex-reverso	5'-CACATACACATTCCAATGGTT-3'
D71-direto	5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3'
D72-reverso	5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'
D75-direto	5'-CAGATCTTGGTTGGCGTAG-3'
TcMit10	5'-CCATATATTGTTGCATTATT-3'
TcMit21	5'-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3'
TcMit31	5'-TAAATAATATATATTGTACATGAG-3'
TcMit40	5'-CTRCATTGYCCATATATTGT-3'
TcIII-direto	5'-CTCCCCAGTGTGGCCTGGG-3'

Tabela 4 - Seqüências dos iniciadores utilizados neste trabalho (continuação).

Iniciador	Seqüência
UTCC-reverso	5' -CGTACCAATATAGTACAGAACTG-3'
S35	5'-AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA-3'
S36	5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'

Cada PCR foi realizada num volume total de 15 μ L contendo 10mM Tris-HCl pH 9,0, 50mM KCl, 0,1% Triton X-100 (Buffer B, Promega, Madison, Wiscosin, USA), 2,5mM MgCl₂ (Promega), 0,5U Taq DNA Polimerase (Promega), 250 μ M de cada dNTP, 0,3 μ M de cada iniciador (iniciadores direto marcado com fluoresceína e reverso), 3 μ L de DNA (1ng/ μ L) recobertos com óleo mineral. A amplificação foi realizada no termociclador PT100 (MJ Research, Inc., MA, USA) usando o protocolo *step-down* (Hecker e Roux, 1996) modificado para a amplificação de DNA de *T. cruzi*: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e desnaturação a 94°C por 30 segundos. 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, sendo seguido por uma extensão final dos iniciadores a 72°C por 10 minutos.

10) PCR DE MICROSSATÉLITES DIRETAMENTE EM TECIDOS DE CAMUNDONGOS E DE PACIENTES CHAGÁSICOS

Para a amplificação de microssatélites de *T. cruzi* diretamente em amostras de DNA extraído de tecidos de animais ou de pacientes infectados foi utilizada a estratégia de *full-nested* PCR (Figura 1). Este método consiste de duas etapas de amplificação: na primeira temos uma PCR contendo os iniciadores externos e na segunda, uma PCR utilizando o produto da primeira amplificação como DNA molde e iniciadores localizados mais internamente em relação aos usados na primeira rodada.

Para a primeira amplificação foram utilizados 3 μ L da diluição 1:10 do lisado de tecidos, em um volume final de 15 μ L por tubo, contendo 10mM Tris-HCl pH 9,0, 50mM KCl, 0,1% Triton X-100 (Buffer B, Promega), 2,5mM MgCl₂ (Promega), 0,5U Taq DNA Polimerase (Promega), 250 μ M de cada dNTP, 0,3 μ M de cada iniciador (iniciadores externos), recobertos com óleo mineral. Após a primeira amplificação, 10% do volume do produto de reação foram submetidos à segunda amplificação utilizando o par de iniciadores internos na mesma concentração (iniciadores direto marcado com fluoresceína e reverso). Os ciclos de amplificação tanto para a primeira como para a segunda rodada de PCR foram aqueles descritos nos item 9 desta seção.

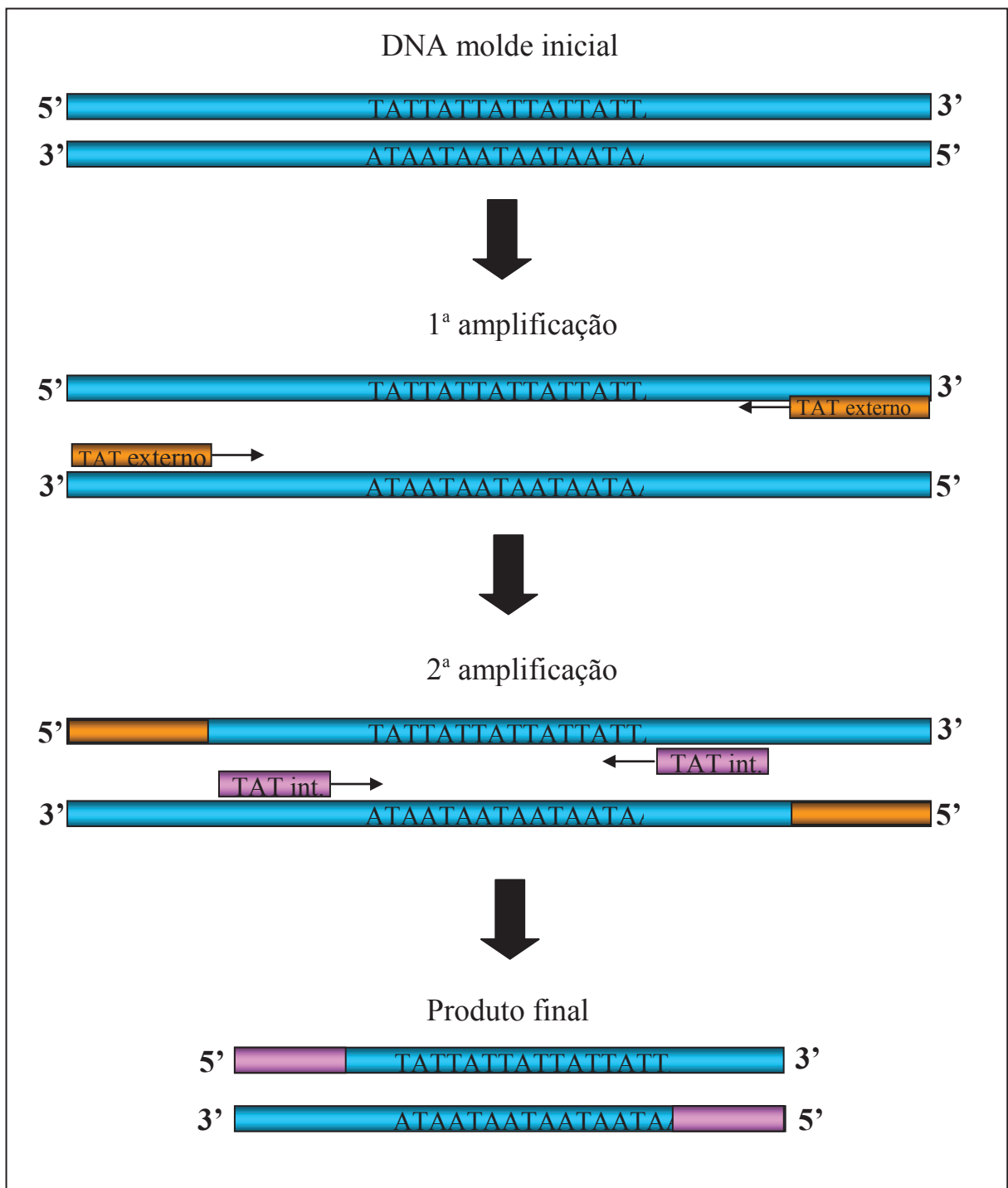


Figura 1 – Desenho esquemático da estratégia de *full nested PCR*.

12) ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Uma alíquota de 5 μ L dos produtos amplificados por PCR foi analisada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, 1x TBE, utilizando o aparato *Scooter 100* (Biokey American Instruments, CA, USA) a 250 volts por 15 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados após observação sob luz UV e o gel foi fotografado.

13) ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Uma alíquota de 5 μ L do material amplificado por PCR foi analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, 1x TBE, a 100 volts, por aproximadamente 2 horas. Após a eletroforese, os fragmentos amplificados foram visualizados por coloração com nitrato de prata, segundo o protocolo descrito por Sanguinetti *et al.* (1994). O gel foi fixado por 10 minutos à temperatura ambiente em solução 10% etanol e 0,5% ácido acético, seguido de uma incubação de 10 minutos em solução 0,1% de nitrato de prata. A revelação foi feita em solução 3% NaOH (p/v) e 0,1% formaldeído a 37% (v/v) durante o tempo necessário para o aparecimento das bandas. A revelação foi interrompida com solução de fixação e o gel foi fotografado.

14) DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS ALELOS DE MICROSSATÉLITES

Para a determinação do tamanho dos alelos dos microssatélites, uma alíquota de 1 a 3 μ l do produto da PCR, utilizando iniciadores fluorescentes, foi desnaturada a 90°C por 3 minutos e, depois, submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante (8M uréia) no seqüenciador automático de DNA A.L.F (GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin, USA). A corrida foi feita por 10 horas, a 45°C.

Como padrão externo das corridas eletroforéticas, foram utilizadas escadas alélicas contendo uma mistura de fragmentos fluorescentes de pesos moleculares variando de 50 em 50pb, *sizer 50-500* (GE Healthcare), na concentração de 5fmol/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 obtidos em forma de cromatogramas foram analisados com o auxílio do programa *Allelelocator* versão 1.03 (GE Healthcare). Os fragmentos de tamanhos conhecidos, presentes nos padrões externo e interno da corrida, foram corretamente alinhados e os tamanhos dos alelos para os *loci* de microssatélites foram calculados para cada amostra.

15) AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE GENÉTICA DE POPULAÇÕES

As análises de alguns parâmetros foram feitas baseando-se nos dados obtidos com as amplificações dos *loci* de microssatélites em diferentes cepas de *T. cruzi*. Utilizando o programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2000) foram calculadas, para cada *locus* de microssatélite descrito, a heterozigidade observada e a heterozigidade esperada, com seu correspondente intervalo de confiança em 95%. Para investigar o nível de associação entre alelos de diferentes *loci*, foram aplicados testes de desequilíbrio de ligação entre os *loci* de microssatélites estudados, em todas as possíveis comparações par a par. Foram utilizados dois métodos estatísticos para medir os níveis de desequilíbrio de ligação: o teste de chi-quadrado e o coeficiente de correlação. O teste de chi-quadrado avalia a diferença entre as frequências haplotípicas esperadas, na hipótese de não-associação, e as inferidas, a partir dos genótipos, utilizando um método de máxima verossimilhança. O valor do coeficiente de correlação é 0 quando não há associação entre os *loci*. Foi utilizado um teste de *bootstrap* (1000 reamostragens) para calcular um único valor de significância associado ao chi-quadrado e ao coeficiente de correlação. Os cálculos foram feitos utilizando o programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2000). O nível de significância utilizado foi de 0.05.

16) ANÁLISES DO POLIMORFISMO DO GENE RDNA 24S α DO *T. CRUZI*

Para a tipagem do rDNA 24S α , o DNA das amostras de *T. cruzi* foi submetido a uma PCR composta de 10mM Tris-HCl pH 9,0, 50mM KCl, 0,1% Triton X-100 (Buffer B, Promega), 3,5mM MgCl₂ (Promega), 0,625U Taq DNA Polimerase (Promega), 200 μ M de cada dNTP, 0,25 μ M de cada iniciador (D71 e D72), 2 μ L de DNA (1ng/ μ L) e quantidade de H₂O Milli-Q estéril suficiente para 12,5 μ L.

Os ciclos de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, um outro passo de desnaturação por 30 segundos, um passo de

anelamento a 60°C por 30 segundos e um passo de extensão a 72°C por 30 segundos, num total de 30 ciclos (Souto et al., 1996).

Após esta etapa uma alíquota de 5µL dos produtos da PCR foi analisada em gel de acrilamida 6% corado pela prata para a visualização dos produtos amplificados. Como controles das amplificações foram utilizados DNA de cepas ou clones que representam as linhagens de *T. cruzi* I (Col1.7G2), *T. cruzi* II (JG), *T. cruzi* III (4166) e cepas híbridas (SO3 cl5).

Em algumas situações envolvendo a amplificação deste gene, tais como, análises de células únicas de *T. cruzi*, foi empregada a técnica de *hemi nested* PCR. Neste protocolo, as condições dos ciclos da PCR e as concentrações dos reagentes na reação foram as mesmas, exceto para os iniciadores que no primeiro *round* foi utilizado o par D75 e D72 e no segundo *round* o par D71 e D72 (Tabela 4). No segundo *round* foram utilizados como DNA molde, 10% dos produtos amplificados no primeiro *round*.

17) ANÁLISES DE POLIMORFISMO DO GENE CITOCROMO OXIDASE II DO *T. CRUZI*

Para a amplificação da região gênica que compreende a subunidade II da enzima mitocondrial citocromo oxidase (COII) de *T. cruzi*, o DNA das amostras de *T. cruzi* foi submetido a uma PCR composta de 10mM Tris-HCl pH 8,8, 25mM KCl, 3,5mM MgCl₂, 1U Taq DNA Polimerase (Promega), 250µM de cada dNTP, 0,3µM dos iniciadores TcMit10 e TcMit21, 3µL de DNA (1ng/µL) e quantidade de H₂O Milli-Q estéril suficiente para 15µL. Os ciclos de amplificação da PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, um outro passo de desnaturação por 45 segundos, anelamento por 45 segundos e extensão por 1 minuto, num total de 40 ciclos.

Os produtos amplificados foram resolvidos em gel de agarose 2%. Posteriormente, 10µL da PCR foram submetidos a uma digestão empregando-se a enzima de restrição *AluI* (Promega), conforme instrução do fabricante. A análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição para este gene, em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata, permite distinguir as linhagens de *T. cruzi* I II e III. Como padrão de comparação dos RFLP foram utilizados DNA de cepas e clones característicos das linhagens de *T. cruzi* I (Haplótipo A), *T. cruzi* II (Haplótipo C). Entretanto, este marcador não diferencia as cepas da linhagem *T. cruzi* III das cepas híbridas, pois elas apresentam o mesmo perfil de restrição para o gene COII (Haplótipo B). Como padrão para o haplótipo B, foi utilizado o clone

híbrido CL Brener (Freitas *et al.*, 2006). A figura 2 ilustra o perfil esperado de bandas de cada um desses haplótipos de COII.

Como descrito no item anterior, em algumas situações envolvendo a amplificação deste gene foi empregada a técnica de *full nested* PCR. Neste protocolo, as condições dos ciclos da PCR e as concentrações dos reagentes na reação foram as mesmas, exceto para os iniciadores que no primeiro *round* foi utilizado o par TcMit31 e TcMit40 e no segundo *round* o par TcMit10 e TcMit21 (Tabela 4). No segundo *round* foram utilizados como DNA molde, 10% dos produtos amplificados no primeiro *round*.

18) ESPAÇADOR INTERGÊNICO DOS GENES MINI-EXON DO *T. CRUZI*

Para a amplificação da região intergênica dos genes mini-exon, o DNA das amostras de *T. cruzi* foi submetido a uma PCR composta de 20mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 250 µM de cada dNTP, 3µM de cada iniciador (TcIII e UTCC – Tabela 4), 1U Taq DNA Polimerase *Platinum* Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), 1µL de DNA total (1ng/µL) e quantidade de H₂O Milli-Q estéril suficiente para 15µL. Os iniciadores utilizados reconhecem as posições entre 368-386pb e 546-570pb da unidade repetitiva do mini-exon de *T. cruzi* (número de acesso no *GenBank*: AF050523) (Burgos *et al.*, 2007).

Os ciclos de amplificação da PCR consistiram de uma etapa de desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, anelamento a 68°C por 1 minuto, extensão dos iniciadores a 72°C e desnaturação a 94°C por 1 minuto. A cada três ciclos a temperatura de anelamento foi diminuída para 66, 64, 62 e 60°C. A esta última temperatura o número de ciclos foi aumentado para 35, sendo seguido por uma extensão final dos iniciadores a 72°C por 10 minutos. A análise dos produtos amplificados, em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata, permite distinguir a linhagens de *T. cruzi* III (estas apresentam um amplicon de 200pb) das cepas das linhagens *T. cruzi* I, II e híbridos (estas apresentam um amplicon de 150-157pb) (Burgos *et al.*, 2007). Como padrão de comparação foram utilizados DNA de cepas ou clones característicos das linhagens *T. cruzi* I, II, III e híbridos.

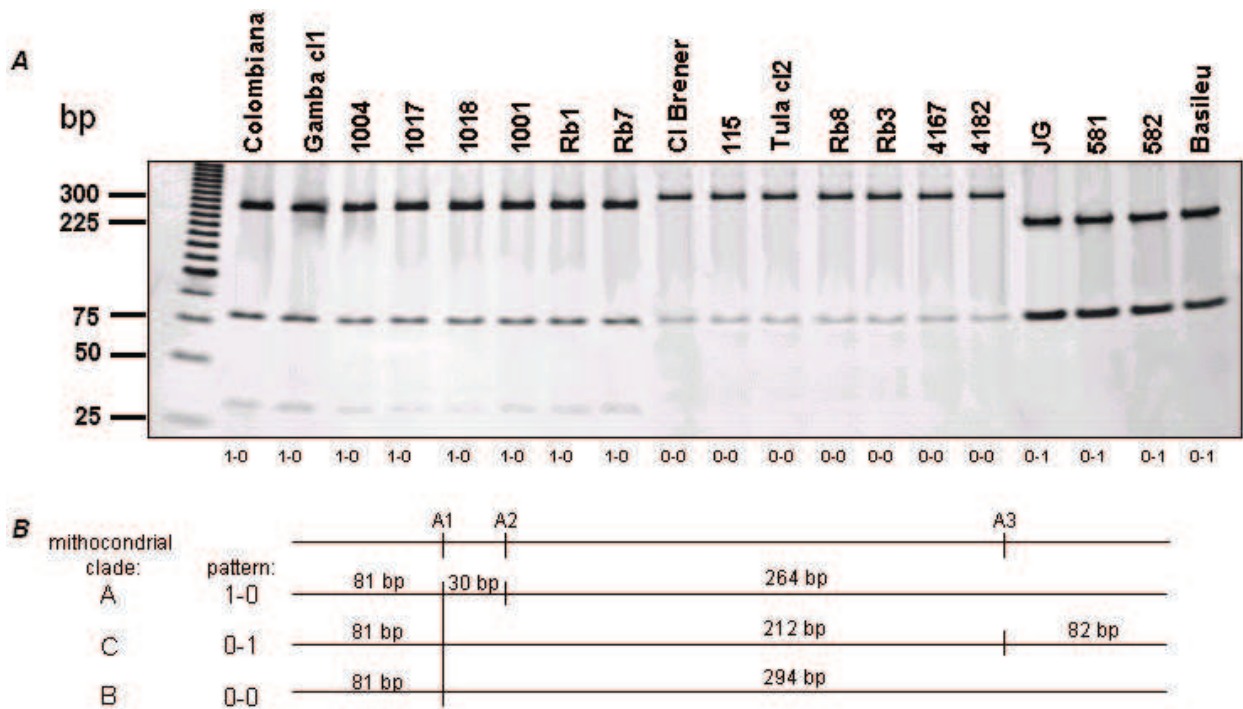


Figura 2 - Padrões típicos de RFLP obtidos a partir do fragmento amplificado por PCR para o gene COII após digestão com a enzima *AluI*. (A) Os caracteres apresentados abaixo do gel de poliácridamida 6% corada pela prata, referem aos 3 padrões observados. O número 0 indica a ausência de um sítio específico de restrição e o número 1 indica a sua presença. (B) Mapa de restrição gerado pela digestão dos fragmentos amplificados por PCR com *AluI*. A1, A2, e A3 indicam os três sítios de restrição para *AluI*. Os tamanhos esperados para os produtos digeridos correspondentes ao padrão 1-0 (Haplótipo A - Cepas da linhagem *T. cruzi* I), 0-1 (Haplótipo C - Cepas da linhagem *T. cruzi* II) e 0-0 (Haplótipo B - Cepas da linhagem *T. cruzi* III e cepas híbridas) estão indicados em pares de bases.

19) REGIÃO VARIÁVEL DO MINICÍRCULO DO kDNA DO *T. CRUZI*

A reação para a amplificação da região variável do minicírculo do kDNA de *T. cruzi* foi constituída de 10mM Tris-HCl pH 8.5, 25mM de KCl, 2mM de MgSO₄, 3,5mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 1 μ M de cada um dos iniciadores específicos S35 e S36 descritos por Sturm *et al.* (1989), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Promega), 4 μ L de DNA e água Milli-Q estéril suficiente para 20 μ L. Os ciclos de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de um passo de anelamento a 65°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e nova desnaturação a 94°C por 1 minuto. Foram feitos 35 ciclos de amplificação, sendo que, no último ciclo, o passo de extensão a 72°C foi estendido para 10 minutos. Em seguida, uma alíquota de 5 μ L dos produtos da PCR foi analisada em gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata, para a visualização dos produtos amplificados.

20) PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS DE *T. CRUZI* PARA SEPARAÇÃO EM FACS VANTAGE CELL SORTER

As populações policlonais naturais de *T. cruzi* para separação em FACS *Cell Sorter* foram gentilmente cedidas pelo pela Dra. Maria Therezinha Bahia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, UFOP (cepa Berenice-78 25B) e pela Dra. Mônica Lúcia Gomes, da Universidade Estadual de Maringá, Paraná (cepa A316A R7).

Cerca de 1,5mL de uma cultura de epimastigotas de *T. cruzi*, em meio LIT, contendo, aproximadamente, 10⁶ células móveis e sem formação de grumos foram colocados em um tubo *Vacutainer* siliconado 16x100mm (Itupeva, SP, Brasil), sem aditivos. A cultura foi centrifugada a 400rpm, por 10 minutos a 4°C, em centrífuga Himac CR 21 (Hitachi), para separação das células intactas dos *debris* celulares presentes na cultura. Após a centrifugação, a cultura foi deixada em repouso por 10 minutos, para que as formas epimastigotas de *T. cruzi* pudessem migrar para o sobrenadante. Utilizando uma pipeta plástica, o sobrenadante foi transferido para outro tubo *Vacutainer* para ser submetido a uma série de três lavagens.

Para as lavagens, foi acrescentado 1mL de 1x PBS (Tampão Salina Fosfato) pH 7,4 a 4°C, esterilizado por filtração utilizando filtro 0,22 μ M Millex GV (Millipore, MA, USA). O tubo foi invertido gentilmente para homogeneização da mistura e submetido à centrifugação a 2.200rpm, por 10 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado invertendo-se rapidamente o tubo. O

precipitado de células presente no fundo do tubo foi ressuscitado e homogeneizado em 1mL de solução de 1x PBS pH 7,4 a 4°C e submetido a uma nova etapa de lavagem.

Após a última lavagem, o precipitado de células foi ressuscitado em 1mL de 1x PBS pH 7,4. Esta suspensão de células foi transferida para um outro tubo contendo 500µL de etanol 96% mantido a -20°C e com o auxílio de uma pipeta plástica foram formadas bolhas de ar para a homogeneização. As células foram deixadas por 30 minutos no gelo para fixação e, após este período, o tubo foi submetido à centrifugação a 2.200rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 1mL de 1x PBS pH 7,4. A solução de células fixadas foi deixada em geladeira (4°C) até a manhã seguinte, quando foi submetida à separação no aparelho FACS Vantage *Cell Sorter*.

21) SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS DO *T. CRUZI* EM FACS VANTAGE *CELL SORTER*

Uma pequena alíquota da solução de células fixadas foi transferida para um tubo Falcon de poliestireno 352054 (Becton Dickinson, USA) para contagem no FACS *Cell Sorter*. A solução foi diluída em 1x PBS pH 7,4 até que a contagem do aparelho indicasse, aproximadamente, 100 eventos/segundo.

O protocolo para a separação em microplacas de 96 poços (Figura 3) foi feito segundo as instruções do manual do FACS Vantage (Becton-Dinckson, 1997). As placas deflectoras foram ligadas 20 minutos antes do experimento para que o campo elétrico fosse criado. Para a separação das células foi utilizado o parâmetro *Counter*, o modo mais utilizado em separação de células, devido a sua alta acurácia e pureza em contar as células.

Para a seleção das células a serem separadas, inicialmente foi construído um gráfico FSC X SSC que traduz o tamanho relativo das células *versus* a granulosidade e complexidade das mesmas. As células que apresentaram um tamanho adequado foram selecionadas e analisadas em um novo gráfico, FL1 X FL2, que traduz o grau de fluorescência emitida pelas células. A autofluorescência de células é um fenômeno comum, devido à complexidade química apresentada pelas superfícies das membranas celulares. Esse padrão de autofluorescência do *T. cruzi* possibilita a separação das células sem a necessidade de marcação fluorescente adicional. Dessa forma, as células apresentando fluorescência e tamanho adequados foram selecionadas para a separação, através da delimitação da região correspondente no gráfico (Figura 4). O programa *Clone Cyt* (Becton-

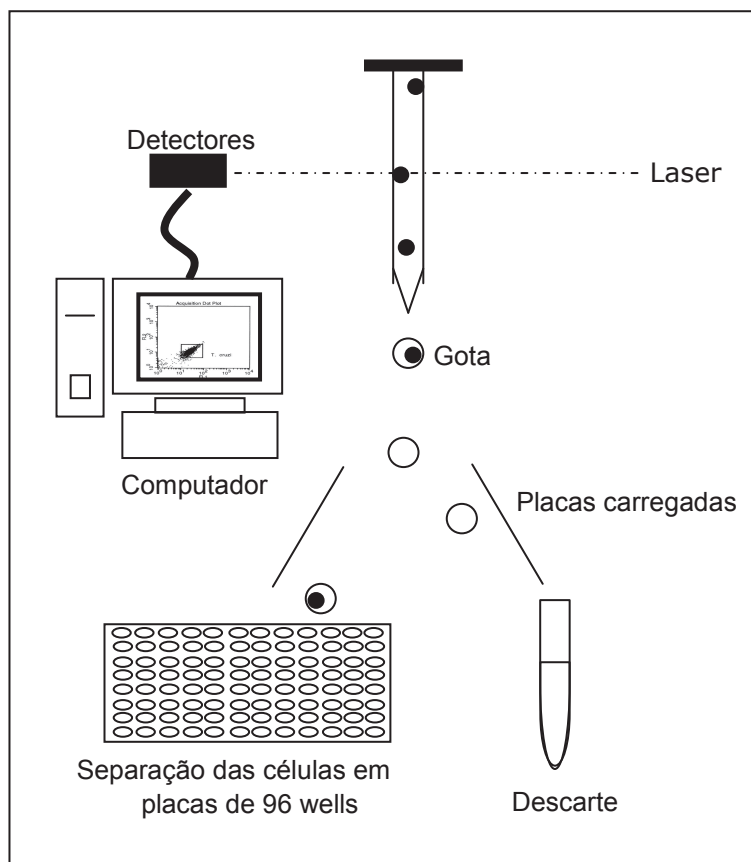


Figura 3 – Desenho esquemático da separação de células únicas de *T. cruzi* em placas de 96 poços através do aparelho FACS Vantage *Cell Sorter*.

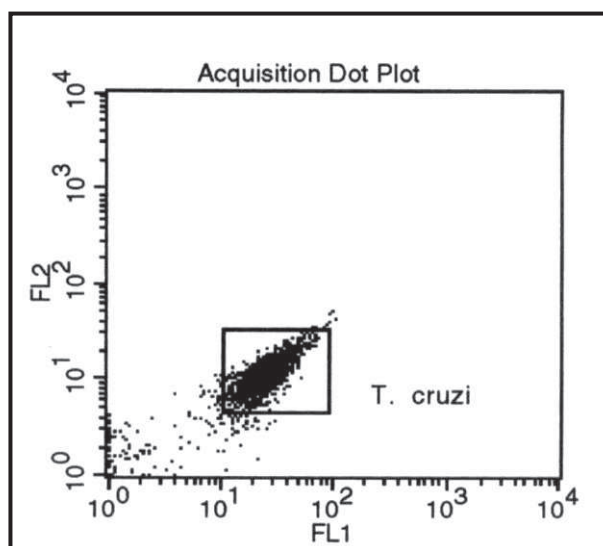


Figura 4 - Gráfico captado pelo FACS Vantage *Cell Sorter* mostrando o padrão de autofluorescência FL1 X FL2 gerado pelas células de *T. cruzi*.

Dinckson, 1997) foi utilizado para a separação das células diretamente em microplacas de plástico com 96 poços em fundo V (Sorensen BioScience, UT, USA) contendo 5 μ L de uma solução 10% Triton X-100 em cada poço (Figura 5).

Após a separação das células, uma gota de óleo mineral foi adicionada a cada um dos poços da placa. As placas foram seladas com cobertura plástica Microseal 'A' Film (MJ Research), identificadas e guardadas a -20°C para serem posteriormente submetidas a PCR.

Esferas com fluorescência amarela medindo 10.0-14.0 μ m (Spherotech, Inc., IL, USA) foram utilizadas como controle da separação através do FACS Vantage *Cell Sorter*. O protocolo de separação das esferas em microplacas de 96 poços foi o mesmo descrito para a separação das células de *T. cruzi*. Uma lâmina de vidro foi fixada na parte superior da microplaca, onde foram depositadas as esferas fluorescentes para permitir a visualização das mesmas em microscópio ótico de fluorescência (Olympus BX60). As esferas presentes em cada gotícula na lâmina foram contadas e fotografadas (Figura 6).

22) PCR MULTIPLEX DE MICROSSATÉLITES EM CÉLULAS ÚNICAS DO *T. CRUZI*

Para a PCR multiplex de microsatélites ser empregada nas células únicas de *T. cruzi*, foi primeiramente padronizado em nosso laboratório um método de *full nested* PCR, utilizando diluições seriadas de DNA de 1ng até 10fg do clone CL Brener de *T. cruzi*. Este método consiste de duas etapas de amplificação: na primeira temos uma PCR multiplex contendo os iniciadores externos para 4 *loci* de microsatélites (TcTAC15, TcAAT8, TcTAT20 e TcAAAT6) e em seguida uma *full nested* PCR monoplex utilizando o produto da primeira amplificação como DNA molde e os iniciadores internos para cada *locus*, separadamente.

As placas contendo as células únicas de *T. cruzi* separadas pelo FACS *Cell Sorter*, foram retiradas do congelador e imediatamente submetidas a aquecimento a 80°C, por 1 hora, em termociclador, para lise dos parasitos.

No primeiro *round* cada PCR foi realizada num volume total de 25 μ L contendo as células de *T. cruzi* lisadas em 5 μ L de 10% Triton X-100, 10mM Tris-HCl pH 9,0, 50mM KCl, 0,1% Triton X-100 (Buffer B, Promega) 2,5mM MgCl₂ (Promega), 1U Taq DNA Polimerase (Promega), 300 μ M de cada dNTP, 0,3 μ M de cada iniciador externo para os *loci* TcTAC15, TcAAT8, TcTAT20 e TcAAAT6, recobertos com óleo mineral. Esta primeira amplificação foi realizada no termociclador PT100 (MJ Research) usando o protocolo *step-down*, descrito no item 9 desta seção.

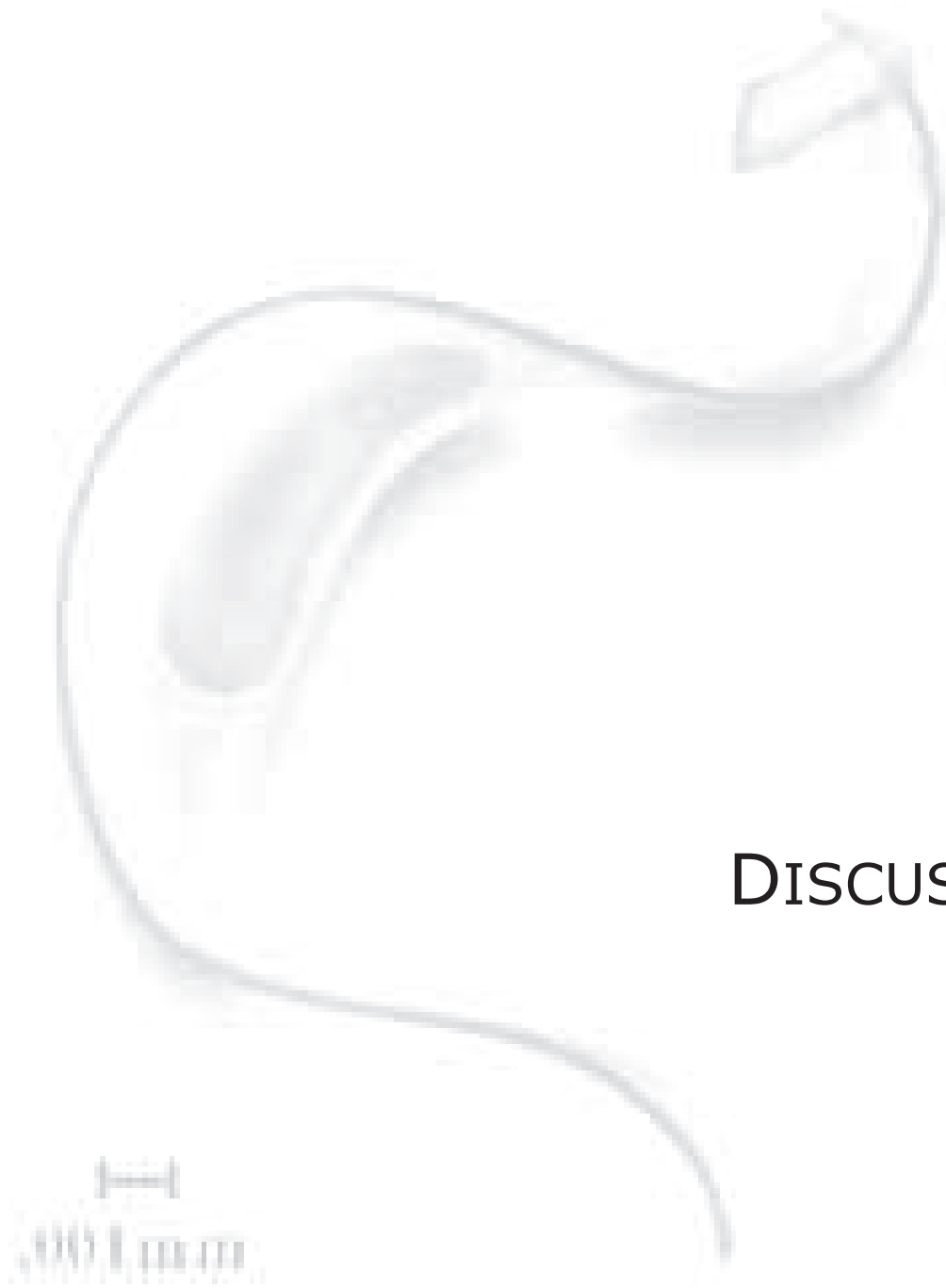
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10	10	5	5	2	2	1	1	1	1	1	0
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H	DNA	DNA	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0

Figura 5 - Mapa da placa de 96 poços onde foram separadas as células únicas de *T. cruzi* através do aparelho FACS Vantage Cell Sorter. Os números dentro dos poços indicam a quantidade de células a serem separadas naquele poço. Os poços onde está escrito DNA ou 0 foram programadas para não conterem células e foram reservados, respectivamente, para os controles positivos (DNA de cepa) ou negativos (ausência de DNA) da amplificação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50	10	10	5	5	2	2	0		1	1	1
B	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1
C	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1
D										1	1	1
E	5	5	2	2	1	1	1	1		1	1	1
F	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1
G	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1
H										1	1	1

Figura 6 - Desenho esquemático da placa de 96 poços mostrando a localização das lâminas fixadas à placa e a programação da separação das esferas fluorescentes no FACS. Os números indicam a quantidade de esferas depositadas em cada gotícula nas lâminas.

Após esta primeira amplificação, foi realizado um segundo *round* de PCR específico para cada *locus* de microssatélite. Para isso foram empregados 10% do volume da primeira amplificação e os iniciadores internos para cada *locus* de microssatélite. A mistura de reação e as condições dos ciclos da PCR para a segunda amplificação foram as mesmas descritas no item 9 desta seção.



DISCUSSÃO



Embora a seqüência do genoma do *T. cruzi* tenha sido publicada recentemente, muitos aspectos da estrutura populacional e evolução deste protozoário permanecem ainda não elucidados. A espécie *T. cruzi* apresenta uma grande heterogeneidade tanto genotípica quanto fenotípica, provavelmente resultante do seu modo de reprodução predominantemente clonal, que leva as populações a evoluírem geograficamente isoladas, acumulando mutações e características próprias. Muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de evidenciar as características peculiares de cada isolado de *T. cruzi*, sendo que variações de forma, virulência, dinâmica de crescimento, seqüências gênicas e até mesmo número de cromossomos foram demonstradas.

No entanto, apesar dessa grande variabilidade apresentada, técnicas bioquímicas e moleculares evidenciaram a presença de padrões conservados entre alguns grupos de cepas, despertando a atenção da comunidade científica para o significado desses achados (Romanha, 1982; Miles *et al.*, 1978; Tibayrenc *et al.*, 1986; Oliveira *et al.*, 1998; Macedo *et al.*, 1992, 2001, 2004). Desde 1999, uma clara divisão do parasito em pelo menos duas linhagens evolucionárias principais, apresentando uma alta divergência filogenética e distintas características epidemiológicas, têm sido reconhecida e foram chamadas de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Momen, 1999).

No entanto, alguns isolados não puderam ser classificados em nenhuma das duas linhagens formadas e outras subdivisões foram propostas seqüencialmente, por outros autores, utilizando marcadores moleculares com diferentes taxas evolutivas (Brisse *et al.*, 2000; Machado e Ayala 2001; Robello, 2000; Augusto-Pinto *et al.*, 2003). Recentemente, foram descritos novos aspectos da estrutura populacional de *T. cruzi*. Freitas *et al.* (2006) propuseram a divisão das cepas de *T. cruzi* em 3 linhagens filogenéticas principais *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e *T. cruzi* III. Além disso, as cepas híbridas de *T. cruzi*, as quais não puderam ser incluídas na nomenclatura *T. cruzi* I e *T. cruzi* II proposta em 1999, neste trabalho estas cepas tiveram uma posição definida dentro das análises, formando claramente, um quarto grupo de cepas.

Apesar de todos esses estudos sobre a variabilidade genotípica do *T. cruzi*, nenhuma correlação clara entre os tipos de parasitos encontrados e as diferentes formas clínicas da doença de Chagas foi evidenciada. Sendo assim, o significado dessas subdivisões precisa ser investigado através do maior número de marcadores possível. Só então poderemos vislumbrar um quadro cada vez mais claro das

interações entre os indivíduos da espécie *T. cruzi*, bem como da relação entre a genética do parasito e as características clínicas da doença que eles causam.

Com base no Modelo Histotrópico Clonal proposto para explicar a patogênese da doença de Chagas (Macedo e Pena, 1998), para melhor compreender as diferentes manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes acometidos por esta parasitose, é imprescindível a caracterização dos parasitos diretamente nos tecidos infectados. O baixo conteúdo de parasitos em amostras biológicas, tais como sangue e tecidos de pacientes chagásicos crônicos, exige a utilização de estratégias mais sensíveis envolvendo a detecção do parasito nessas amostras.

A utilização das análises de microssatélites em estudos de variabilidade genética em *T. cruzi* tem demonstrado que estes marcadores são ideais tanto para análises filogenéticas quanto para identificação e caracterização de isolados. 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 em outras regiões do genoma (Levinson e Gutman, 1987a; Henderson e Petes, 1992). Dessa forma, os microssatélites são capazes de apontar as diferenças sutis entre as cepas do *T. cruzi* que não são percebidas por outros marcadores de evolução lenta, como polimorfismos nos genes rDNA 24S α , mini-exon e COII, sem, contudo, perder a capacidade de evidenciar as semelhanças entre os grandes grupos de cepas. Além disso, os *loci* de microssatélites analisados estão localizados no genoma nuclear e, na maioria das vezes, em regiões não expressas, o que os torna livres de quaisquer pressões seletivas que podem ocorrer com outros marcadores clássicos, como as isoenzimas, por exemplo. Também, ao contrário de outros marcadores aleatórios, como o RAPD, os microssatélites são unilocais, ou seja, estão presentes em apenas uma cópia por genoma haplóide, o que faz com que possamos determinar, exatamente, os alelos presentes em uma cepa, permitindo-nos fazer inferências populacionais mais refinadas.

Essa característica própria das análises de microssatélites, que permite a fácil detecção das semelhanças e diferenças entre as cepas, torna esses marcadores ideais para estudos que procuram correlacionar aspectos genéticos do parasito envolvido aos aspectos clínicos da doença que ele causa. Assim, análises de múltiplos *loci* de microssatélites em ensaios de PCR mais sensíveis podem ser utilizadas em análises de tecidos de pacientes, na tentativa de resolver as grandes questões que ainda intrigam os pesquisadores.

Os primeiros microssatélites do *T. cruzi* foram isolados através de clonagem e seqüenciamento de bibliotecas genômicas para determinação das seqüências

flanqueadoras e construção de iniciadores para uma PCR *locus* específica. Oliveira *et al.* (1998), utilizando uma biblioteca de DNA genômico 15X enriquecida para repetições do tipo (CA)_n da cepa CL Brener de *T. cruzi*, isolaram oito *loci* de microssatélites polimórficos. Estes *loci* de microssatélites representam um marco nos estudos populacionais de *T. cruzi*, tendo permitido, por exemplo, avaliar a grande diversidade genética neste parasito, que não era percebida por outros marcadores moleculares. Entretanto, estes 8 *loci* de microssatélites disponíveis, não apresentam regiões flanqueadoras longas o suficiente para o desenho de iniciadores mais externos e, desta forma, não podem ser utilizados em estratégias de PCR mais sensíveis, como o *nested PCR*.

Na época em que os primeiros *loci* de microssatélites foram descritos, o número de seqüências do *T. cruzi* depositadas em bancos de dados era ainda incipiente. Hoje, com o término do seqüenciamento do genoma do clone CL Brener de *T. cruzi*, um grande número de seqüências está disponível nos bancos de dados. O uso de programas, como o *Tandem Repeats Finder*, para a procura de novos *loci* de microssatélites, é uma tarefa simples que se utiliza das informações já disponíveis nos bancos de dados de seqüências, dispensando o uso de técnicas de laboratório trabalhosas e caras.

Os avanços da tecnologia do DNA recombinante, principalmente a automação do seqüenciamento de nucleotídeos e o processamento da informação por métodos computacionais, possibilitaram o desenvolvimento de projetos visando decifrar o genoma de vários organismos. A quantidade de dados gerados em um projeto genoma é muito grande impossibilitando a sua divulgação em revistas científicas e, dessa maneira, a construção de bancos de dados depositário de todas as informações geradas no projeto é de grande importância, pois permite um acesso livre e irrestrito a todas essas informações.

Aproveitando os dados obtidos com o seqüenciamento do genoma completo do clone CL Brener, pôde-se fazer um estudo quanto à abundância, composição e dispersão de microssatélites constituídos por motivos de di, tri e tetranucleotídeos no genoma deste parasito, bem como selecionar e caracterizar novos *loci* de microssatélites.

Em 1994 teve início o projeto genoma do *T. cruzi*. Pesquisas realizadas, um ano depois, com a finalidade de verificar a freqüência de microssatélites para repetições de di e trinucleotídeos nas seqüências de *T. cruzi* depositadas no *GenBank* indicaram a presença de somente 261 seqüências totalizando 346Kb de DNA (Oliveira, 1997). Naquelas seqüências, o microssatélite mais freqüente foi o de

repetição (AC)_n com 37 *loci*. Foram encontrados também 11 *loci* com repetições (AAC)_n e 15 *loci* com repetições (AAT)_n (Oliveira, 1997). Em um trabalho realizado por Valadares (2002), sete anos mais tarde, foi verificado que houve um grande avanço no seqüenciamento do genoma de *T. cruzi*. De acordo com os resultados, obtidos naquela época, existiam cerca de 32.600 seqüências de *T. cruzi* depositadas no *GenBank* totalizando aproximadamente 20Mb de DNA distribuídos entre regiões gênicas codificadoras e não codificadoras; um aumento bastante significativo quando se compara com os resultados obtidos em 1995. Já naquela época, foi possível observar que existia uma grande abundância de microssatélites no genoma de *T. cruzi*, tendo sido encontrados um total de total 2.247 possíveis *loci* constituídos por motivos de di, tri e tetranucleotídeos.

Em nosso trabalho, foi encontrado um grande número de *loci* de microssatélites no genoma do *T. cruzi*: 11.892 possíveis *loci* em 54,7Mb de DNA. Os motivos de microssatélites do tipo (AC)_n foram os mais freqüentes. Dentre os motivos de microssatélites constituídos por trinucleotídeos, os mais abundantes foram do tipo (AAT)_n e (AAC)_n. Para as repetições compostas por tetranucleotídeos, os motivos mais abundantes foram aqueles constituídos por (AAAT)_n e (AAAC)_n.

Tem sido reportado na literatura que as repetições do tipo (AC)_n é o motivo mais comum em animais e invertebrados (Stallings *et al.*, 1991). Em um estudo investigado por Tóth *et al.* (2000) para verificar a abundância de microssatélites no genoma de eucariotos de diferentes grupos taxonômicos, tais como, humanos (cromossomo 22), primatas, roedores, mamíferos e artrópodes, demonstrou que as repetições de trinucleotídeos do tipo (AAT)_n e (AAC)_n estão entre as mais freqüentes em todas as seqüências analisadas para cada grupo taxonômico. Uma concordância entre os nossos resultados e os obtidos por Tóth *et al.* (2000), foi também verificada para a freqüência das repetições compostas por tetranucleotídeos.

Adicionalmente, nós investigamos a freqüência de microssatélites em regiões codificantes (CDS) e regiões intergênicas (Inter-CDS) e observamos que a abundância e a distribuição de certos tipos de repetições variam conforme a região genômica analisada.

Como era de se esperar, nossos resultados mostraram que nas regiões CDS de *T. cruzi* existe uma dominância de microssatélites compostos por repetições de trinucleotídeos. As regiões codificantes de proteínas representam um ambiente essencialmente diferente para os microssatélites do que as regiões não codificantes. A principal diferença surge das maiores pressões evolucionárias

impostas sobre as regiões codificantes de proteínas do que em regiões não codificantes e, conseqüentemente, os microssatélites em regiões codificantes são fortemente suprimidos pela não-perturbação da janela de leitura de genes (Hancock, 1995). Isto tem sido provado pelos seguintes fatos: primeiro é que em bancos de dados de seqüência de cDNA de humanos mais do que 92% dos polimorfismos dos microssatélites preditos dentro das regiões codificantes tem os tamanhos das unidades repetitivas que são múltiplos de três (Wren *et al.*, 2000), e segundo, é que muitos éxons contêm raros microssatélites compostos por repetições de di e tetranucleotídeos, mas tem muito mais microssatélites compostos por tri e hexanucleotídeos do que as outras repetições (Field e Wills, 1996; Wren *et al.*, 2000; Cordeiro *et al.*, 2001; Morgante, Hanafey e Powell, 2002). Em genes procarióticos relacionados à adaptação ou a respostas ao *stress* de *Escherichia coli* K12, trinucleotídeos também estão super-representados, enquanto di e tetranucleotídeos apresentam uma baixa freqüência (Rocha, Matic e Taddei, 2002). Então a dominância de microssatélites compostos por trinucleotídeos em regiões codificantes pode ser explicada com base na supressão de microssatélites não-triméricos, evitando-se assim mutações na janela de leitura de genes presentes nestas regiões (Metzgar, Byotof e Wills, 2000).

Os microssatélites presentes em regiões codificantes estão sobre forte pressão seletiva, como dito anteriormente. Se mudanças ocasionadas pela derrapagem da polimerase durante a replicação do DNA ou se outros mecanismos mutacionais surgem dentro dos microssatélites, isso pode levar a mudanças nas funções das proteínas. Há numerosas linhas de evidências indicando que mudanças nos comprimentos dos microssatélites, principalmente os compostos por trinucleotídeos, ou repetições de aminoácidos dentro das regiões codificantes podem causar ganho ou perda de função ou até mesmo levar ao silenciamento completo do gene ou induzir a formação de novas proteínas e fatores de virulência. Variações no número de repetições de microssatélites localizados nas extremidades 5'-UTR e 3'-UTR podem causar efeitos significativos na expressão gênica, por exemplo, no *splicing* e na tradução do mRNA e levar a mudanças fenotípicas com alterados valores seletivos (Li *et al.*, 2004). Análises preliminares obtidas neste trabalho mostraram que nas regiões codificantes de *T. cruzi*, os códon para Gln (CAA e CAG) foram os mais abundantes, mostrando que o genoma de *T. cruzi* é capaz de gerar proteínas com alto teor deste aminoácido. Logicamente, para se ter dados mais apurados a esse respeito é necessário fazer uma análise mais detalhada, como, por exemplo, determinar o início da janela de leitura para estes

genes, uma vez, que isso pode levar ou não a uma mudança na fase de leitura dentro das regiões contendo as repetições.

Outro resultado notório, em nosso trabalho, é a ausência ou uma baixa frequência de microssatélites do tipo CG, ACG e CCG nas regiões codificantes e intergênicas de *T. cruzi*. Isso pode ser explicado pela presença da seqüência dinucleotídica CpG a qual é altamente mutável. O DNA da maioria dos organismos, inclusive *T. cruzi*, contém bases modificadas, usualmente a 5-metilcitosina (Razin e Riggs, 1980; Rojas e Galanti, 1990, 1991). Quando a citosina é metilada ela se torna instável, podendo sofrer um processo de desaminação espontânea se transformando em uma timina, ocasionando, então, uma mutação pontual dentro da seqüência de DNA. Provavelmente, por esta razão, microssatélites constituídos por CG são fortemente suprimidos no genoma dos organismos.

Adicionalmente, repetições CCG também podem ter uma seleção negativa por causa dos requerimentos da maquinaria de *splicing*. Longas seqüências CCG poderiam competir com estas regiões no recrutamento dos componentes necessários para o processamento do mRNA, resultando em um *splicing* inadequado. Além disso, repetições CGG, as quais exibem considerável potencial para formar estruturas em forma de grampo, podem influenciar a estrutura secundária da molécula de pré-mRNA, modulando a eficiência e acurácia do processamento e conseqüentemente interferindo com a formação do mRNA maduro (Coleman e Roesser, 1998; Tóth *et al.*, 2000). Isso está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que foram encontrados microssatélites CCG e ACG apresentando poucas unidades repetitivas.

Outro resultado encontrado neste trabalho foi a presença de microssatélites mais longos em regiões intergênicas do que nas regiões codificantes no genoma de *T. cruzi*. Uma vez que as regiões intergênicas não estão sob uma forte pressão seletiva é razoável supor que os microssatélites presentes nestas regiões apresentam uma maior taxa de mutação do que os microssatélites presentes em regiões CDS, gerando assim um número maior de unidades repetitivas, as quais passaram despercebidas pela maquinaria de reparo de DNA das células durante o processo de replicação de DNA.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos nesta parte do trabalho, em concordância com vários relatos na literatura, sugerem que a distribuição genômica dos microssatélites é não-randômica entre as regiões codificantes e não codificantes do genoma de *T. cruzi*, uma vez que uma significativa parte das estruturas adquiridas pelos microssatélites são funcionalmente importantes para a

transcrição gênica, tradução, recombinação, replicação e reparo do DNA, etc. e, desta forma, a seleção parece agir contra as expansões e contrações randômicas no tamanho dos microssatélites em determinadas regiões genômicas.

Uma grande vantagem de se analisar seqüências de DNA depositadas em bancos de dados por projetos genomas é que essas seqüências são provenientes de bibliotecas que utilizam vetores com a capacidade de abrigarem insertos de grande tamanho, tais como cosmídeos. Essa característica faz com que as extremidades flanqueadoras dos *loci* de microssatélites presentes nestas seqüências sejam bastante amplas dando inúmeras possibilidades de desenho de iniciadores.

A partir da análise de seqüências de *contigs* e de clones originados de bibliotecas genômicas randômicas do clone CL Brener de *T. cruzi*, foram selecionados sete *loci* de microssatélites contendo repetições de trinucleotídeos e tetranucleotídeos. A variação no número de unidades repetitivas, que caracteriza o polimorfismo dos microssatélites, tem sido descrita como sendo inversamente proporcional ao tamanho da unidade repetitiva (Schötterer e Tautz, 1992; Chakraborty *et al.*, 1997). Ou seja, as repetições de mono, di, tri e tetranucleotídeos são mais polimórficas que as repetições de penta e hexanucleotídeos. Porém, a amplificação de repetições de mono e dinucleotídeos está mais sujeita ao fenômeno da derrapagem da DNA polimerase, que freqüentemente ocorre durante a PCR de microssatélites em condições de laboratório (Harr, 2000; revisado por Ellegren, 2004). Por isso, apesar de terem sido encontrados *loci* de microssatélites com unidades repetitivas de diferentes tamanhos, foram selecionados apenas *loci* contendo tri e tetranucleotídeos.

Os sete *loci* de microssatélites descritos aqui (TcTAC15, TcTAT20, TcAAT8, TcATT14, TcGAG10, TcCAA10 e TcAAAT6), apresentaram altos níveis de polimorfismos entre as diferentes cepas de *T. cruzi*, drásticos desvios do equilíbrio de Hardy Weinberg e desequilíbrio de ligação, comparável àqueles previamente descritos por Oliveira *et al.* (1998). Estes resultados têm sido interpretados como evidências de que *T. cruzi* tem uma evolução predominantemente clonal e que a reprodução sexual neste parasito é um evento raro (Ayala, 1993; Tibayrenc, 1995).

Embora, já tenha sido demonstrado claramente que *T. cruzi* é capaz de realizar eventos de recombinação em condições de laboratório (Gaunt *et al.*, 2003), tanto a freqüência e o mecanismo de como esses eventos sexuais ocorrem permanecem obscuros. Além disso, a ocorrência de cepas híbridas na natureza sugerida por análises de muitos marcadores genéticos e confirmada usando seqüências nucleotídicas (Machado e Ayala, 2001; Sturm *et al.*, 2003; Elias *et al.*,

2005; Westenberger *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2006) mostram que eventos de troca genética exercem um papel importante na variabilidade genética deste organismo.

Uma vez que, a maioria dos *loci* de microssatélites analisados neste trabalho está localizada em uma única banda cromossomal, esses marcadores tornam-se ferramentas adequadas para investigar eventos de recombinação nestes parasitos. Dois tipos de mecanismos têm sido propostos para explicar a instabilidade dos microssatélites: a replicação e a recombinação. A recombinação pode mudar potencialmente o comprimento dos microssatélites por meio de um evento chamado *crossing over* desigual que acontece dentro das repetições de microssatélites entre cromátides no mesmo cromossomo. O *crossing over* desigual pode levar à deleção de unidades repetitivas em uma fita de DNA e inserção em outra, resultando no extremo nível de polimorfismo visto em muitos mini e microssatélites (Richard e Pâques, 2000; Li *et al.*, 2002).

Explorando os dados adquiridos com o seqüenciamento do genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi*, foi possível refinar a localização de todos os *loci* de microssatélites no genoma deste parasito, exceto para o *locus* TcCAA10. Todos os outros foram mapeados em *contigs* do cromossomo III, juntamente com quatro outros marcadores adicionais, incluindo o marcador 161, todos eles pertencentes ao grupo de ligação I proposto por Branche *et al.* (2006). Os *loci* de microssatélites TcATT14, TcAAAT6 e TcAAT8 foram localizados próximos um do outro, enquanto que TcTAC15, TcTAT20 and TcGAG10 mostraram estar distribuídos mais distantemente um do outro ao longo dos *contigs*.

Além disso, como visto neste trabalho e em outros já descritos na literatura, os microssatélites são muito mais numerosos em regiões não codificantes do genoma, embora, existam muitos relatos que demonstram um grande número de microssatélites presentes em regiões transcritas, incluindo genes codificantes de proteínas. Em nossas análises, o *locus* de microssatélite TcCAA10 foi localizado dentro de uma região codificante para uma proteína hipotética em *T. cruzi*. Alinhamentos entre as seqüências de DNA para os dois alelos deste gene mostraram uma deleção de 8 unidades repetitivas do tipo CAA, na seqüência do alelo correspondente ao haplótipo *non-Esmeraldo-like*, gerando duas proteínas com diferentes números de aminoácidos.

O alinhamento das seqüências flangeadoras dos *loci* de microssatélites isolados neste trabalho (Anderson *et al.*, 1998, 2001, 2002, 2003) com as obtidas pelo projeto genoma do *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005) mostrou para o *locus*

TcAAT8, que o tamanho do alelo de 292pb em CL Brener (haplótipo *non-Esmeraldo like*) não é gerado por um aumento das unidades repetitivas AAT, mas sim por inserções de vários nucleotídeos, principalmente adeninas. Isto sugere que esta região flanqueadora neste haplótipo corresponde a uma região de maior instabilidade genômica, uma vez que este *locus* apresentou o maior número de alelos entre as cepas de *T. cruzi* analisadas, sendo, portanto o *locus* com maior índice de heterozigosidade. Além disso, este alelo de 292pb, bem como os alelos de 295 e 298pb, foram encontradas em cepas das linhagens *T. cruzi* II, III e híbridos, o que pode estar relacionado com alguma particularidade do genoma destas cepas. Embora este *locus* de microssatélite tenha se mostrado extremamente polimórfico entre as cepas de *T. cruzi*, estes resultados sugerem que o mesmo deve ser empregado com cautela em estudos filogenéticos. Isto por que as construções das árvores filogenéticas são baseadas no número de repetições encontradas para cada *locus* de microssatélite seguindo o modelo de mutação passo a passo (Valdes *et al.*, 1993; Shriver *et al.*, 1993). Além disso, dos *loci* analisados neste trabalho, o *locus* TcAAT8 apresentou a menor eficiência de amplificação pela estratégia de *full nested* PCR, como demonstrado nas análises em tecidos e em células únicas.

Para os sete novos *loci* de microssatélites selecionados, foi possível desenhar dois pares de iniciadores para serem utilizados no desenvolvimento de reações de *full nested* PCR. Por esta estratégia, a sensibilidade da reação em detectar o DNA do parasito passou a ser cerca de 100 a 1000 vezes maior em relação à sensibilidade de uma PCR convencional. Os resultados obtidos com o uso desta estratégia permitiram detectar o DNA de *T. cruzi* até ao nível de 100 fentogramas, quantidade esta inferior àquela correspondente ao DNA de uma única célula do parasito. Esta sensibilidade nos permitiu detectar específicos amplicons de *T. cruzi* diretamente nos tecidos de camundongos infectados com uma mistura de cepas. Além de detectar a presença do DNA dos parasitos no tecido, a análise por microssatélites nos possibilitou identificar a cepa responsável pela infecção, uma vez que houve correspondência entre os perfis de amplificação da cepa JG com o DNA dos parasitos detectados nos corações dos camundongos e do clone Col1.7G2 nos retos, de acordo com os resultados previamente obtidos para esses mesmos animais através da técnica de LSSP-PCR (Andrade *et al.*, 1999).

A LSSP-PCR foi a primeira técnica capaz de analisar DNA de *T. cruzi* diretamente em tecidos infectados. Vago *et al.* (1996) foram capazes de obter perfis de assinaturas de kDNA do parasito diretamente em tecidos de pacientes, enquanto Andrade *et al.* (1996), analisando camundongos infectados com uma

mistura de clones do *T. cruzi*, demonstraram a existência de um tropismo tecidual das cepas. Utilizamos exatamente os tecidos desses mesmos camundongos que já haviam sido estudados pela LSSP-PCR, com o intuito de comparar os dados obtidos com as duas metodologias.

A comparação das análises dos retos e corações dos camundongos estudados mostrou uma perfeita correlação entre os resultados obtidos com os sete *loci* de microssatélites e as análises de LSSP-PCR. Nas duas técnicas, os perfis obtidos indicaram a presença da cepa JG no coração dos camundongos e do clone Col1.7G2 nos retos dos animais. A convergência desses resultados demonstra a aplicabilidade de ambas as técnicas em análises diretamente em tecidos infectados. Contudo, as análises de microssatélites apresentam algumas vantagens sobre a LSSP-PCR.

Em primeiro lugar, o alvo das análises de microssatélites é o DNA nuclear, enquanto a LSSP-PCR analisa o kDNA dos parasitos. Uma vez que estamos tentando correlacionar a patologia da doença ao genótipo do parasito e, provavelmente, os eventos primordiais determinantes da virulência de cada cepa de *T. cruzi* ocorrem no DNA nuclear e não no kDNA, os *loci* de microssatélites têm maior probabilidade de estarem ligados a marcadores determinantes da patogenicidade da cepa do que *loci* presentes no kDNA. Ademais, a análise dos perfis de LSSP-PCR pode ser uma tarefa difícil, já que a técnica envolve uma etapa de amplificação aleatória, o que gera perfis bastante complexos. Dessa forma, é impossível associar bandas específicas de LSSP-PCR com *loci* específicos do kDNA. Ao contrário, os microssatélites são marcadores unilocais. Além disso, já foi reportado que a proporção de subpopulações de moléculas de minicírculo pode variar sob certas condições de manutenção em laboratório, o que levaria a uma instabilidade dos perfis de LSSP-PCR que poderiam não ser reprodutíveis (Devera *et al.*, 2002; Lages-Silva *et al.*, 2001). Os microssatélites apresentam altos níveis de polimorfismo que pode ser diretamente relacionado à distância genética entre as cepas, e seus perfis se mantêm estáveis por várias gerações (Macedo *et al.*, 2001). Todas estas razões, associadas ao fato de que a análise de microssatélites constitui-se em uma metodologia simples, totalmente baseada na PCR, fácil de ser implementada e de simples interpretação, fazem com que esses marcadores sejam os ideais em análises de tecidos para a caracterização das cepas que estão, efetivamente, causando a patologia nos diferentes tecidos de um animal ou paciente.

Apesar dos sete *loci* utilizados terem provado ser sensíveis o suficiente para analisar quantidades de DNA tão pequenas quanto as de uma única célula de *T.*

cruzi, em análises diretamente em tecidos alguns fatores devem ser levados em consideração. Em primeiro lugar, na fase crônica da doença de Chagas, a quantidade de parasitos no tecido pode ser bastante reduzida. Por isso, todas as PCRs foram realizadas em uma série de três tubos, para garantir que, por chance, em um dos tubos tivesse sido pipetado uma parte do tecido contendo, pelo menos, um parasito. A menor taxa de amplificação observada nos retos de animais infectados com a mistura de JG e Col1.7G2 pode ser devida a uma menor quantidade de parasitos neste tecido. Uma alternativa é aumentar o volume de tecido lisado na PCR, porém esta estratégia está sujeita a um segundo problema, o aumento da quantidade de inibidores. Por exemplo, o grupo heme, presente nas hemácias sangüíneas, é considerado um importante inibidor da PCR (Belec, 1998). Aumentando a quantidade de DNA molde na PCR, estaremos, ao mesmo tempo, aumentando a concentração de inibidores, o que levaria a um efeito contrário ao desejado na eficiência de amplificação. Assim, não foi possível obter amplificação para os *loci* de microssatélites (TcAAT8, TcTAT20 e TcCAA10) nos retos dos camundongos analisados. Além disso, o fato de alguns *loci* terem apresentado ampliações positivas nos retos dos camundongos e outros não, sugere que os ensaios de PCR para alguns *loci* apresentam sensibilidade maior que os de outros. Isso demonstra a necessidade contínua de busca por novos *loci* de microssatélites em *T. cruzi* e o estabelecimento de ensaios de PCR cada vez mais sensíveis, para permitir análises em quaisquer tecidos.

Além dos tecidos de camundongos experimentalmente infectados, foi possível também detectar amplicons específicos de *T. cruzi* para os *loci* de microssatélites em diferentes tecidos humanos infectados. Foram analisadas nove amostras clínicas diferentes incluindo, sangue, fluido cérebro-espinhal, coração, placenta e pele de pacientes infectados. A análise do parasito diretamente em tecidos infectados dispensa as etapas de isolamento e manutenção das cepas em laboratório, que podem selecionar subpopulações mais adaptadas ao meio de cultura e, desta maneira, restringir a diversidade genética dos parasitos presentes nos diferentes tecidos do paciente a poucos clones disponíveis para análise.

Uma interessante observação que emergiu dos dados obtidos com as ampliações por PCR de *loci* de microssatélites nestes tecidos, foi a detecção dos alelos de 99pb para o *locus* TcTAC15 na maioria dos tecidos humanos infectados, incluindo sangue, coração, placenta e biópsia de pele de um paciente apresentando chagoma. Freitas *et al.* (2005) através de uma estratégia de *hemi-nested* PCR em tempo real, elaborada para amplificar os alelos do gene rDNA 24S α diretamente em

tecidos de humanos infectados, demonstrou a predominância de alelos típicos de cepas *T. cruzi* II no coração, esôfago e cólon de amostras de pacientes brasileiros. Além deste fato, ao utilizar o DNA de várias cepas de *T. cruzi* para verificar o polimorfismo do *locus* TcTAC15, todas as cepas de *T. cruzi* II e algumas cepas de *T. cruzi* III e híbridos apresentaram os alelos de 99pb. Logo, embasando-se nestes resultados, é razoável associar a amplificação dos alelos de 99pb para o *locus* TcTAC15 com populações do parasito pertencentes às linhagens *T. cruzi* II, *T. cruzi* III e híbridos, mas não com cepas *T. cruzi* I, as quais, até o momento, apresentaram somente os alelos de 96pb.

Várias evidências já foram encontradas propondo que apenas as cepas *T. cruzi* II seriam capazes de estabelecer a infecção no homem (Di Nóia *et al.*, 2002; Buscaglia e Di Nóia, 2003; Freitas *et al.*, 2005). Os resultados obtidos com as amplificações de microssatélites diretamente nos tecidos analisados mostrou uma grande variabilidade genotípica para as cepas infectantes. Nossos resultados corroboram em parte com os dados na literatura, pois além de mostrar que cepas *T. cruzi* II estão associadas com a infecção no homem, cepas pertencentes tanto a linhagem *T. cruzi* I e ao grupo das cepas híbridas também são capazes de infectar e causar a doença. Isso traz nova luz à patogênese da doença de Chagas e lança algumas perguntas sobre o significado do ciclo silvestre da doença e sua interação com o ciclo doméstico.

Outro importante achado nestas análises foi a observação de que o paciente AS, o qual apresentou um episódio de encefalite chagásica associada com AIDS, foi infectado com uma população multiclinal presente no sangue deste paciente, revelada pela detecção de 3 fragmentos amplificados para o *locus* TcTAC15. Enquanto que na amostra de fluido cérebro-espinhal coletada deste mesmo paciente, ao mesmo tempo, foi detectado o alelo de 96pb, característico de cepas *T. cruzi* I. Embora a presença de cepas *T. cruzi* I em pacientes chagásicos crônicos seja rara, pelo menos no Brasil e Argentina, recentemente foi detectado o predomínio desta linhagem de *T. cruzi* em pacientes de países do norte da América do Sul. Añes *et al.* (2004) mostraram que a maioria das populações de *T. cruzi* isoladas de sangue periférico de pacientes venezuelanos com severas e fatais manifestações clínicas de doença de Chagas aguda foram tipadas como *T. cruzi* I. Parasitos desta linhagem predominam na região amazônica brasileira onde a doença de Chagas tem sido considerada como uma doença emergente (Coura *et al.* 2002). Nesta região ocorreram muitas micro-epidemias, provavelmente causadas pela contaminação oral. No Brasil, *T. cruzi* I, tem sido isolado a partir de sangue

periférico de poucos pacientes na fase crônica (Zingales *et al.*, 1998) e agora, recentemente foram caracterizados parasitos da linhagem *T. cruzi* I em um paciente brasileiro apresentando cardiomiopatia chagásica crônica (Teixeira *et al.*, 2006). Portanto, todos esses dados de pacientes da Venezuela, Amazônia e do Brasil, demonstram que isolados de *T. cruzi* I infectam humanos e causam a doença de Chagas, abrangendo desde casos assintomáticos a casos fatais na fase aguda e doença cardíaca severa na fase crônica da doença.

Assim como na amostra de sangue do paciente AS, uma outra população multiclonal de *T. cruzi* foi detectada na placenta de uma mulher gestante com doença de Chagas assintomática, a qual não transmitiu os parasitos para o recém-nascido. Estes resultados confirmam a proposta de que as análises dos perfis de microssátelites constituem num teste simples de triagem para avaliar se cepas de *T. cruzi* são populações monoclonais ou policlonais (Oliveira *et al.*, 1998, 1999; Macedo *et al.*, 2001, 2004).

Em face da confirmação de que as cepas do *T. cruzi* possuem tropismo diferencial para os diversos tecidos do hospedeiro humano, torna-se cada vez mais importante o entendimento das populações naturais de *T. cruzi* quanto à sua natureza monoclonal ou policlonal e à sua constituição de clones.

A multiclonalidade das cepas do *T. cruzi* tem sido motivo de grande interesse, uma vez que se acredita que a presença de vários clones, interagindo em uma população, provavelmente resolve alguns dos problemas evolucionários geralmente encontrados pelas populações clonais. A multiclonalidade pode levar ao estabelecimento de relações mutualísticas entre os clones de uma determinada população, levando a uma evolução clonal mais rápida, aumentando a diversidade genética e abrindo novas perspectivas para as propriedades biológicas inovadoras (Bernstein *et al.*, 1985).

A separação de uma cepa natural do *T. cruzi* nas células únicas dos clones que a compõem pode trazer à tona as respostas para muitas perguntas, como, por exemplo: quantos clones diferentes do parasito podem formar uma cepa policlonal? Esses clones são semelhantes geneticamente ou clones pertencentes a grupos diferentes podem conviver em uma única cepa?

A análise da estrutura populacional do *T. cruzi* através da amplificação de *loci* de microssátelites em células únicas do parasito separadas por FACS *Cell Sorter*, foi pioneiramente demonstrado por Pimenta (2002). Nessa época, foi realizada uma padronização inicial da metodologia de separação de células no FACS, através de análises de populações artificialmente heterogêneas, como as mistura das cepas

Rosa e MLBM e da cepa JG com o clone Col1.7G2 (Macedo *et al.*, 2001; Pimenta, 2002).

A separação das células epimastigotas do *T. cruzi* utilizando FACS *Cell Sorter* é uma tarefa simples, uma vez que a capacidade do aparelho de detectar a autofluorescência dos parasitos elimina uma etapa, por vezes cara e trabalhosa, que é a marcação das células. Até o momento, analisamos diferentes cepas de *T. cruzi* no FACS e todas elas, a despeito de pequenas diferenças no tamanho e forma das células, apresentaram padrões de fluorescência semelhantes. A fixação das células utilizando etanol não elimina a fluorescência, mas causa uma ligeira perda de turgidez das células, o que não ocorre com outros fixadores, como o paraformaldeído, por exemplo. No entanto, a fixação com etanol não interfere nas análises posteriores por PCR, enquanto o paraformaldeído, por promover a formação de ligações cruzadas entre proteínas e DNA, muitas vezes inibe a PCR.

O sucesso das reações de PCR de microssatélites em células únicas está sujeito a diversos fatores. Uma etapa importante é a lise das células. O protocolo de lise que utilizamos - aquecimento a 80°C por 1h em solução contendo Triton X-100, um detergente neutro - garante a ruptura de todas as membranas celulares e a exposição do DNA. Entretanto, devemos ter em mente que, após a lise, não temos apenas o DNA em solução: ele está misturado a outros componentes da célula como RNA, proteínas e restos de membranas celulares. Para analisarmos *loci* de cópia única no genoma, como são os microssatélites, é preciso que, no meio dessa mistura de componentes, os iniciadores sejam capazes de encontrar o seu local correto de anelamento e que a enzima polimerase se ligue ao DNA molde para copiar a fita nascente. Muitas vezes, apesar de a reação de PCR mostrar sensibilidade suficiente durante a otimização, utilizando diluições seriadas de DNA, nas análises diretamente em células únicas ela pode, através da ação desses inibidores, perder sensibilidade. Por isso, ocasionalmente as reações de PCR em células únicas de *T. cruzi* apresentam um baixo rendimento e um variável percentual de reações positivas. Além disso, a possibilidade de que alguns poços da placa possam, na verdade, não conter células, por erro do FACS, também deve ser levada em consideração. O problema principal é que não existe um método direto para verificarmos a presença da célula no poço da placa e isso faz com que a PCR seja o controle da separação. Por outro lado, se a PCR, pelos motivos já citados, não funciona em 100% das vezes, e não há produto de amplificação, sempre resta a dúvida se o que não funcionou foi a separação ou a PCR. De qualquer modo, a eficiência de amplificação em torno de 40% é mais do que suficiente para a

realização de estudos populacionais. Se em uma placa podemos analisar 90 células diferentes (reservando seis poços para os controles da reação), ao analisar apenas três placas de uma população, estaremos amostrando mais de 100 células únicas, um número bastante razoável para fazermos inferências populacionais estatisticamente significativas.

A otimização da metodologia desenvolvida, utilizando análises de populações artificialmente heterogêneas de células, como a mistura dos clones Silvio X10 cl1 e Esmeraldo cl3, através da amplificação do gene rDNA 24S α , mostrou como essa tecnologia é poderosa e capaz de identificar, indubitavelmente, os diferentes clones presentes em uma população mista. Esse tipo de análise confirmou também a especificidade da separação das células pelo FACS, uma vez que não foi observado padrão de amplificação correspondente a uma mistura dos clones em nenhum dos poços da placa programados para conter apenas uma única célula. Isto é muito importante porque mostra, mais uma vez, que, se a separação de células através do FACS é passível de erros, seria sempre no sentido de colocar um número de células menor do que aquele programado, o que leva simplesmente à ausência de amplificação, e não de depositar células a mais, o que, certamente, comprometeria as análises populacionais.

Todavia, para que essa metodologia pudesse ser adotada em estudos de populações naturalmente policlonais de *T. cruzi*, seria necessário desenvolver um método sensível de PCR multiplex para a amplificação de *loci* de microssatélites. Neste trabalho mostramos que é possível o desenvolvimento de reações multiplex para análises de microssatélites em células únicas de *T. cruzi*. Este tipo de estratégia é necessário, uma vez que é essencial uma correspondência entre os alelos apresentados por uma única célula com os vários *loci* utilizados, dando maior robustez aos resultados encontrados.

A análise de um número grande de *loci* em uma única célula aumenta a chance de detectarmos quaisquer diferenças, mesmos sutis, entre os clones de uma cepa policlonal. O desenvolvimento de reações de PCR multiplex não é uma tarefa fácil. Muitos autores (revisado por Markoulatos, 2002) já demonstraram que a interação entre um número grande de iniciadores pode levar à completa inibição das reações de PCR. Além disso, uma reação multiplex pode ser traduzida, na verdade, por uma competição dos diferentes *loci* pela enzima polimerase, pelos nucleotídeos e íons necessários à amplificação. Isso cria a necessidade de que, cada vez que novos iniciadores são adicionados a uma reação, tenhamos que fazer um estudo completo de todas as variáveis da PCR para dosarmos as concentrações

corretas de cada iniciador, e dos demais componentes da reação, a fim de obtermos uma reação perfeita, em que todos os *loci* apresentem boa amplificação. Numa PCR levada ao limite, como a PCR em células únicas, essa tarefa pode se tornar ainda mais desafiante. Por isso, estamos sempre à procura de novos *loci* de microssatélites que sejam sensíveis e, ao mesmo tempo, compatíveis, para que possamos desenvolver uma reação de PCR multiplex para células únicas que analise o maior número de *loci* possível.

Neste trabalho, analisamos duas populações do *T. cruzi* naturalmente policlonais separadas por FACS *Cell Sorter*: a cepa Berenice-78 25B e a cepa A316A R7.

Duas populações do *T. cruzi* foram isoladas da Berenice, a primeira paciente de Carlos Chagas: a cepa Berenice-62 (Be-62), isolada por Salgado *et al.*, em 1962 e a cepa Berenice-78 (Be-78), extraída em 1978 da mesma paciente 16 anos depois e isolada por Lana *et al.* (1981). Essas duas populações foram comparadas por Lana e Chiari (1986) e mostraram diferenças marcantes de comportamento em camundongos e em cultura acelular: a cepa Be-62 foi considerada de alta virulência e patogenicidade para camundongos, sendo observados altos níveis de parasitemia e 100% de mortalidade, enquanto, os animais inoculados com a cepa Be-78 apresentaram níveis de parasitemia menores e 0% mortalidade. Ao contrário, foi demonstrada uma maior virulência e patogenicidade da cepa Be-78, em relação à Be-62, quando utilizado o modelo cão (Lana *et al.*, 1988; 1992).

Como explicar estas diferenças de comportamento, sendo que os parasitos foram extraídos de uma mesma paciente? Seria a cepa Berenice uma cepa policlonal? Na tentativa de responder esta pergunta, Cruz *et al.* (2006), clonaram por diluição limitante as cepas Be-62 e Be-78 e seus quatro clones foram analisados pela técnica de microssatélites. Os resultados obtidos embora demonstraram diferenças entre as cepas parentais, elas foram caracterizadas como monoclonais, uma vez que cada cepa e seus respectivos clones mostraram os mesmos perfis de amplificação com somente um ou dois picos.

Em um estudo realizado por Veloso *et al.* (2005) a constituição populacional da cepa Be-78 foi melhor investigada. Quatro populações de *T. cruzi*, isoladas de diferentes cães infectados cronicamente com a cepa Be-78, foram inoculadas em camundongos diferentes por 25 passagens sucessivas. A análise das populações obtidas após a 1^a e 25^a passagens em camundongos, através dos perfis de isoenzimas e RAPD, demonstrou a existência de subpopulações distintas da cepa Berenice-78, sugerindo que esta cepa teria uma constituição multiclonal. Como

explicar, então, que a análise por microssatélites da cepa Be-78 original não tenha mostrado a presença de mais de dois picos para nenhum dos *loci* analisados? A possibilidade seria de que esses clones diferentes existiriam em uma quantidade tão inferior ao clone majoritário dentro da cepa original, que a PCR de microssatélites era incapaz de detectá-lo.

Os resultados obtidos por Veloso *et al.* (2005) também demonstraram que alguns isolados apresentaram características de mistura de subpopulações, como por exemplo, o isolado Be-78 25B, uma população resultante da 25ª passagem em camundongos. Nós então, utilizamos este isolado como objeto de separação em células únicas utilizando a metodologia do FACS.

A PCR dos *loci* de microssatélites nas células de Be-78 25B separadas pelo FACS foi capaz de detectar a presença de duas populações distintas: uma, com o perfil correspondente ao da cepa Be-62, e outra apresentando um padrão genético totalmente diferente das duas cepas Berenice. A detecção da cepa Be-62 dentro da cepa Be-78 demonstra que realmente estes dois isolados foram obtidos da mesma paciente, mas não se pode excluir com apenas este achado a possibilidade de reinfecção no período de 1962 a 1978, uma vez que estas duas cepas possuem diferenças marcantes de comportamento e morfologia. Por outro lado, a hipótese de uma seleção de população de parasitos no organismo do hospedeiro ao longo de uma fase crônica de longa duração não pode ser descartada. Seria interessante, avaliar as células únicas da cepa Be-62 por PCR de microssatélites com a finalidade de se detectar a presença de Be-78, o que descartaria de vez a hipótese de reinfecção.

A análise dos perfis de microssatélites nas células únicas de Be-78 25B mostrou a presença de uma população dentro da cepa Be-78 com características genéticas distintas das duas cepas Berenice. A análise dos perfis de microssatélites para o *locus* TcTAT20, mostrou que esta população está presente em todas as passagens da cepa Be-78 em camundongos, apesar do inóculo utilizado na primeira passagem em camundongos ter origem de diferentes cães em fases diferentes da doença de chagas e com diferentes períodos de infecção.

A cepa Be-78 foi estudada por Lana *et al.* (1981) através de perfis eletroforéticos de isoenzimas tendo sido classificada como pertencente ao Zimodema A de acordo com Romanha *et al.* (1979). Já nesta época, os autores relataram a ocorrência de uma banda extra no perfil eletroforético da enzima PMG (fosfoglicomutase) e um perfil típico de B ou C, para a enzima MDH (malato desidrogenase), indicando uma mistura de populações nesta cepa. Esses dados

sugerem que houve uma alteração na estrutura populacional da cepa Be-78, desde o primeiro estudo realizado por Lana *et al.* (1981). É importante lembrar, também, que a cepa Be-78 foi isolada há pelo menos 69 anos de infecção da paciente Berenice e que após seu isolamento por xenodiagnóstico, esta cepa foi mantida por vários anos em camundongos, sendo posteriormente inoculada em diferentes momentos, em cães, permanecendo nestes animais por períodos variáveis. Todas essas passagens em diferentes hospedeiros podem ter promovido uma alteração na dinâmica de crescimento das diferentes subpopulações, ocasionando uma flutuação das populações predominantes quando foram analisadas as diferentes passagens da cepa Be-78 nesses hospedeiros.

Uma vez demonstrada a natureza multiclonal do isolado Be-78 25B, foram realizadas amplificações por PCR para diferentes marcadores com a finalidade de saber se as diferentes subpopulações eram pertencentes a grupos filogenéticos diferentes. Os resultados obtidos com os ensaios de PCR dirigidos para a amplificação do *locus* de microssatélite TcTAT20, dos genes rDNA 24S α e COII e do espaçador intergênico de mini-éxon, convergiram no sentido de responder uma das perguntas formuladas aqui: se as populações de *T. cruzi* são formadas por misturas de clones heterogêneos ou pertencentes à mesma linhagem. Neste caso, foi constatado que o isolado Be-78 25B é formado por subpopulações que pertencem a grupos filogenéticos distintos: *T. cruzi* II e híbridos.

A segunda cepa do *T. cruzi* analisada nesta parte do trabalho foi A316A R7. A análise dos perfis de microssatélites nas células únicas de A316A R7 mostrou que esta cepa é constituída por duas subpopulações com alelos de microssatélites bastante distintos. É importante ressaltar que houve uma correspondência dos alelos de 99pb para o *locus* TcTAC15 com os alelos de 190/238pb para o *locus* TcTAT20, com os alelos de 250/259pb para o *locus* TcAAT8, com os alelos de 275pb para o *locus* TcAAAT6 e com os alelos de 125pb para o rDNA 24S α caracterizando uma população em A316A R7. Houve também uma correspondência dos alelos 96pb para o *locus* TcTAC15 com os alelos de 181pb para o *locus* TcTAT20, com os alelos de 232pb para o *locus* TcAAT8, com os alelos de 251pb para o *locus* TcAAAT6 e com os alelos de 117pb para o rDNA 24S α caracterizando uma segunda população em A316A R7.

Fato interessante aconteceu com os alelos de 96pb para o *locus* TcTAC15 e de 181pb para o *locus* TcTAT20 para a subpopulação pertencente à linhagem *T. cruzi* I, a qual está presente em torno de 10% na cepa original. Estes alelos não foram detectados para estes *loci* quando foram realizados ensaios de PCR utilizando o

DNA obtido a partir de um *pool* de parasitos. Somente com a utilização das células únicas separadas pelo FACS estes alelos puderam ser detectados demonstrando a importância desta estratégia em estudos populacionais desses parasitos.

Outro fato digno de ser comentado é que quando foi analisado o DNA da cepa A316A R7, obtido a partir de uma cultura de parasitos, a análise dos fragmentos amplificados fluorescentes no A.L.F para o *locus* TCAAAT6 mostrou a presença de dois alelos de 251 e 275pb, um genótipo heterozigoto, mas sem indicativos, *a priori*, de multiclonalidade para esta cepa. As análises das células únicas desta cepa para este mesmo *locus* mostraram a presença de duas populações homozigotas diferentes. Neste ponto, é importante ressaltar que este tipo de resultado valoriza as análises de microssatélites em células únicas de *T. cruzi*, uma vez que quando observamos um genótipo heterozigoto por uma PCR convencional e assumimos que uma população é homogênea, na verdade podemos estar mascarando uma mistura de dois genótipos homozigotos diferentes.

Um outro resultado observado na caracterização das subpopulações da cepa A316A R7 foi a presença de uma subpopulação *T. cruzi* I, a qual apresentou um fragmento de 117pb para o gene rDNA 24S α e não o de 110pb que é o normalmente observado para este grupo (Souto *et al.*, 1996). Trabalhos realizados por Souto *et al.* (1993, 1996) já demonstraram através de alinhamentos das seqüências de DNA de produtos amplificados para este gene em cepas da linhagem *T. cruzi* I, a presença de microheterogeneidades representadas por pequenas variações em regiões homopoliméricas, as quais resultam em acréscimos ou diminuições no número de nucleotídeos das seqüências. Dados da literatura já mostraram também que algumas cepas apresentaram fragmentos de tamanhos anômalos para este gene, tais como 117 e 119pb (Pimenta, 2002). Entretanto, as cepas que apresentaram os fragmentos de 117 e 119pb foram pertencentes ao Zimodema 3 de Miles *et al.* (1977, 1978) e hoje, maior parte delas foram agrupadas na nova linhagem *T. cruzi* III (Freitas *et al.*, 2006). O caso descrito neste trabalho, a tipagem de uma das subpopulações da cepa A316A R7 como *T. cruzi* I, foi confirmada através do RLFP dos produtos amplificados para o gene mitocondrial CO II nas células únicas, os quais apresentaram o haplótipo A, característico de cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* I.

Interessantemente, quando se analisa os alelos para determinados *loci* de microssatélites nas células únicas tanto em Be-78 25B e A316A R7 foi notado uma alternância de correspondência entre os alelos para estes *loci* sugerindo que estavam ocorrendo fenômenos de alelo *drop-out* (ADO) nos ensaios de PCR.

Vários estudos já demonstraram que ensaios de PCR envolvendo a amplificação de *loci* dialélicos em condições de quantidades limitantes de DNA, inerentes às de uma única célula, podem levar a amplificação preferencial de um dos alelos (Ray *et al.*, 1994; Findlay *et al.*, 1995; Rechitsky *et al.*, 1996). Além disso, existem outros motivos que podem gerar amplificação preferencial, tais como: condições dos ciclos da PCR, protocolos de lise das células e tamanho do fragmento a ser amplificado (Piyamongkol *et al.*, 2003).

Neste trabalho foram abordadas duas estratégias diferentes (*Whole Genomic Amplification* e um sistema de lise das células contendo SDS e Proteinase K) numa tentativa de minimizar os efeitos de ADO nas amplificações em células únicas. Infelizmente, não foi possível implementar nenhuma destas estratégias, uma vez que os resultados obtidos não convergiram para uma diminuição da ocorrência de ADO, bem como, para um aumento da positividade das amplificações.

Embora, ADO é considerado um problema inerente às amplificações que envolvem quantidades limitantes de DNA, ele acontece de forma randômica com ambos os alelos sendo igualmente susceptíveis ao *drop-out* e, felizmente, ele não ocorre em todas as amplificações. Estas características aliadas a uma minuciosa análise foi o que nos possibilitou a identificar as subpopulações presentes nestas duas cepas estudadas nesta parte do trabalho.

Com as análises de células únicas em *T. cruzi*, uma estratégia que analisa as populações deste parasito a limites ainda não investigados na literatura, foram abordadas várias questões que se encontravam abertas. Tivemos a oportunidade de trabalhar com diferentes isolados de *T. cruzi* que abrigavam diferentes subpopulações pertencentes a linhagens filogenéticas diferentes, verificamos o percentual de representatividade de cada subpopulação dentro da cepa original e ainda mais, foi resolvida uma questão que sempre esteve presente nas amplificações de microssatélites: o fato de algumas cepas que apresentavam mais de dois alelos serem consideradas como multiclonais ou aneuplóides. As análises de células únicas mostram que, na verdade, as cepas analisadas são multiclonais, uma vez que em todas as análises não foi observada a presença de mais de dois picos para uma única célula.

Nossos resultados mostrados até aqui indicaram mais uma vez, que a amplificação de microssatélites é uma ferramenta poderosa para estudos moleculares envolvendo a variabilidade genética deste parasito. Partindo desse pressuposto, nós tivemos a oportunidade de avaliar casos de transmissão congênita da doença de Chagas em diferentes regiões endêmicas, através dos perfis de

microssatélites. Estes marcadores são extremamente polimórficos e, por isso, quando diferentes amostras do *T. cruzi* são comparadas, eles geram perfis altamente individuais e reprodutíveis possibilitando identificar quaisquer diferenças entre as amostras. Desta forma, ao analisar o DNA de pares mães-filhos, por um conjunto de *loci* de microssatélites, poderemos observar se o parasito que está presente na mãe é o mesmo ou diferente daquele que está no filho. Assim, os microssatélites tornam uma poderosa ferramenta para a triagem de casos congênitos da doença de Chagas.

Para ser melhor esclarecida a participação de aspectos genéticos ligados às cepas de *T. cruzi* na transmissão congênita da infecção pelo *T. cruzi*, um número maior de casos de doença de Chagas congênita, em especial de regiões endêmicas distintas, precisavam ser analisados. Neste trabalho, foram analisados casos de transmissão congênita em três diferentes regiões geográficas: Minas Gerais e Rio Grande do Sul, Brasil, e Buenos Aires, Argentina.

As análises de microssatélites nas amostras provenientes de Minas Gerais mostraram uma perfeita identidade genotípica dos parasitos presentes nos pares mães-filhos. Uma vez que as crianças residentes no município de Berilo-MG, uma região endêmica para a doença de Chagas, não tiveram um acompanhamento médico para serem realizados exames sorológicos ou exames para inspeção do parasito por microhematócrito, logo após o nascimento e, levando-se em conta o fato que estes pacientes têm uma idade média de 12 anos, surgem dúvidas sobre a infecção congênita nestes pacientes. Inquéritos epidemiológicos realizados nesta região por Aguilar *et al.*, (1988) indicaram que a transmissão vetorial na região está controlada e que a soropositividade entre os menores de 10 anos examinados foi de 1,5%. Mais recentemente, este dado foi confirmado por um inquérito sorológico realizados em crianças nascidas antes e após a implantação do serviço de vigilância epidemiológica (crianças entre 7 e 14 anos) na região, encontrando uma prevalência de 0,4% (Borges *et al.*, 2006). Mais recentemente, dados obtidos por Marta de Lana (comunicação pessoal), mostraram que a transmissão vetorial está controlada, uma vez que o índice de infestação da unidade domiciliar por triatomíneos foi de 0,7% e dos 331 triatomíneos capturados e examinados, nenhum deles se mostrou infectado. Estes dados, aliados às nossas análises com microssatélites, corroboram para a transmissão congênita da infecção nestes pacientes.

Infelizmente, não foi possível obter a identificação dos pares mães-filhos para as amostras provenientes do Rio Grande do Sul. Este fato nos impossibilitou de

estabelecer uma correlação entre os possíveis pares, uma vez que as análises de microssatélites mostraram uma grande homogeneidade genômica entre as amostras.

As análises de microssatélites mostraram que existe uma maior diversidade genotípica entre as cepas de *T. cruzi* envolvidas na transmissão congênita no estado de Minas Gerais em relação àquelas provenientes do Rio Grande do Sul. Esses dados sugerem, que no Rio Grande do Sul, dentro da região analisada, parecem existir, pelos menos, duas cepas diferentes de *T. cruzi* responsáveis pela transmissão da doença de Chagas, enquanto que em Minas Gerais, os isolados de cada caso foram totalmente diferentes.

Um fato interessante aconteceu com o caso de transmissão congênita em Minas Gerais envolvendo gravidez de gêmeas. Embora, não tenha sido possível conseguir hemoculturas positivas para a mãe e uma das filhas, a triagem das amostras de sangue coletadas para as duas filhas e a mãe, pela amplificação do fragmento de 330pb, correspondente à região variável do kDNA de *T. cruzi*, demonstrou a infecção e a presença deste parasito nas três pacientes. As duas crianças foram submetidas ao tratamento quimioterápico específico e após nove anos, mesmo apesar de gêmeas, uma dessas crianças não respondeu ao tratamento (Filha1) enquanto a outra (Filha2) parece que o tratamento foi mais eficaz, uma vez que as avaliações laboratoriais demonstraram que ora ela se apresenta reativa ora não-reativa para *T. cruzi*. A questão que se coloca diante disso seria se a mãe teria transmitido subpopulações de parasitos diferentes para os dois recém-nascidos. Um resultado interessante que ocorreu com as análises de microssatélites com o DNA obtido a partir de uma cultura de parasitos da Filha1, foi a detecção, numa PCR convencional, de dois alelos para o *locus* TcAAT8: um desses alelos, o de 262pb, mostrou ser facilmente amplificado, já o de 250pb mostrou-se pobremente amplificável, restando a dúvida se na realidade este alelo existia ou não. Numa segunda tentativa utilizando desta vez, o protocolo de *full nested* PCR, esses dois alelos apresentaram um perfil de amplificação semelhante, podendo estar indicando que o alelo de 250pb seria pertencente a uma subpopulação, a qual estaria subrepresentada na população originalmente isolada da Filha1, uma vez que, como mostrado neste trabalho, um genótipo heterozigoto pode, às vezes, representar duas populações homozigotas diferentes. Este dado pode contribuir para uma suspeita de infecção policlonal na mãe e na Filha1 e que somente a subpopulação apresentando o alelo de 250pb poderia estar presente na filha2, a qual foi mais susceptível ao tratamento quimioterápico. Uma estratégia para

esclarecer esta questão seria a separação em FACS dos parasitos infectantes na Filha1, tornando possível a identificação das diferentes subpopulações. Certamente, nós não podemos descartar a possibilidade de aspectos genéticos e imunológicos relacionados aos hospedeiros estarem influenciando na reposta ao longo do tratamento quimioterápico e na eliminação do parasito.

Um outro caso de gravidez múltipla proveniente de Buenos Aires, Argentina foi também analisado, incluindo amostras de sangue da mãe (814) e das duas filhas infectadas (801 e 802). Os resultados obtidos com análises de microssatélites mostraram para dois *loci* (TcTAC15 e TcAAAT6) uma semelhança entre os perfis genéticos das cepas de *T. cruzi* presente tanto na mãe quanto nas duas filhas infectadas. Além disso, os perfis obtidos para este dois *loci*, mostraram que a mãe teve uma infecção policlonal. Estes achados revelaram que as diferentes populações de *T. cruzi* presentes na circulação sangüínea maternal foram transmitidas para as filhas sem a ocorrência de um processo de seleção diferencial de subpopulações e que numa mãe infectada por uma população multiclinal as subpopulações foram igualmente infectivas a ambas as gêmeas.

As análises de marcadores evolutivamente mais conservados em *T. cruzi*, como o rDNA 24S α e o COII mitocondrial, mostraram dois cenários bastantes distintos para os casos de transmissão congênita da infecção pelo *T. cruzi* nas regiões geográficas analisadas, no que diz respeito às linhagens filogenéticas de *T. cruzi* infectantes: em Minas Gerais, os parasitos isolados de todos os casos congênitos foram pertencentes à linhagem *T. cruzi* II, enquanto que no Rio grande do Sul e Argentina, os parasitos foram pertencentes ao grupo das cepas híbridas.

Análises de populações de parasitos presentes em amostras de Minas Gerais são bastante conhecidas e há um claro predomínio de parasitos da linhagem *T. cruzi* II nesta região. Em acréscimo, já é bem documentado na literatura que cepas pertencentes às linhagens *T. cruzi* II (sublinhagem IIb) e cepas híbridas (sublinhagens IIId e IIe), são mais freqüentes em humanos e em vetores domiciliados da espécie *Triatoma infestans* em países da América do Sul (de Luca D'oro *et al.*, 1993; Barnabé *et al.*, 2001; Di Nóia *et al.*, 2002; Burgos *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2005, Marcet *et al.*, 2006).

Virreira *et al.* (2006) analisando sangue de cordão umbilical de recém-nascidos bolivianos infectados congenitalmente demonstraram que o polimorfismo genético de *T. cruzi* não está associado com a ocorrência de infecção congênita ou o desenvolvimento de formas clínicas severas da doença de Chagas. Foi encontrado que cepas pertencentes às sublinhagens *T. cruzi* IIb, IIId e IIe podem induzir

infecção congênita, sendo que a sublinhagem IID apresentou-se com maior frequência nos neonatos infectados. Entretanto, a frequência da sublinhagem IID foi também similar em pacientes chagásicos não relacionados com a infecção congênita (Virreira *et al.*, 2006). Um estudo realizado por Burgos *et al.* (2007) envolvendo amostras de sangue de pacientes argentinos e bolivianos também indicou que não existe uma linhagem específica de *T. cruzi* na transmissão vertical da doença de Chagas. Além disso, estes autores também mostraram uma maior frequência para a sublinhagem IID nos pacientes com infecção congênita, corroborando os dados obtidos por Virreira *et al.* (2006).

Então, comparando os resultados obtidos neste trabalho com as evidências já documentadas na literatura, é razoável supor, que as linhagens de *T. cruzi* identificadas nas amostras analisadas (*T. cruzi* II em Minas Gerais e das cepas híbridas no Rio Grande do Sul e Argentina) provavelmente são as mais frequentes entre os indivíduos chagásicos não relacionados com a transmissão congênita de *T. cruzi*. Entretanto, é interessante notar que a prevalência de casos congênitos da doença de Chagas na parte sul do Brasil e Argentina parece ser muito mais elevada do que em Minas Gerais. Assim, nós propomos a hipótese de que a alta frequência de casos congênitos da doença de Chagas nestas áreas endêmicas pode estar associada com uma maior predominância de populações híbridas de *T. cruzi* (especialmente do DTU IID) circulantes nestas regiões. Estes achados podem estar relacionados com o fato das populações híbridas de *T. cruzi* promoverem uma maior parasitemia nas mães infectadas (Burgos *et al.*, 2007), o que por si só facilitaria a passagem transplacentária dos parasitos e ocasionando a transmissão vertical da doença de Chagas em neonatos. Podemos ainda supor que estas populações de *T. cruzi* apresentam uma maior capacidade de invasão na placenta ou uma maior capacidade de colonização neste tecido. Certamente, estudos experimentais envolvendo a infecção congênita com estas populações poderão fornecer maior lucidez a estes questionamentos.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- ADAD SJ, ANDRADE DCS e LOPES ER (1991). Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 33:443-450.
- AGUILAR HM (1988). Epidemiologia da doença de Chagas: aspectos históricos, sociais e morbidade em duas áreas endêmicas de Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.
- ANDERSSON B E BONTEMPI EJ (2003). AC137988. *Trypanosoma cruzi* strain Brener chromosome 3 clone cosmids 1o17, 1m17, 1b21, 2n11, complete sequence. Direct Submission (22-JAN-2003). Center for Genomics and Bioinformatics, Karolinska Institute, Stockholm SE-171 77, Sweden.
- ANDERSSON B, MYLER PJ, AGGARWAL G, FAZELINIA G, MACK J, MARTY A, MUNDEN H, *et al.* (2002). BH842909.1 *Trypanosoma cruzi* CL-Brener TC3 BAC-end sequencing. Seattle Biomedical Research Institute, Seattle, WA, USA.
- ANDERSSON B E BONTEMPI EJ (2001). AC096913.1. Direct Submission, Submitted (02-OCT-2001) Department of Genetics and Pathology, Uppsala University, Rudbeck Laboratory, Uppsala SE-751 85, Sweden.
- ANDERSSON B, ASLUND L, TAMMI M, TRAN AN, HOHEISEL JD E PETTERSSON U (1998). Complete sequence of a 93.4-kb contig from chromosome 3 of *Trypanosoma cruzi* containing a strand-switch region. **Genome Res.** 8:809-816.
- ANDRADE LO, MACHADO CRS, CHIARI E, PENA SDJ E MACEDO AM (1999). Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Mol. Biochem. Parasitol.** 100:163-172.
- ANDRADE LO, CHIARI E, MACHADO CRS *et al.* (1996). Tissue distribution of different clones and strains of *Trypanosoma cruzi* in double infected mice analyzed by LSSP-PCR. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 91(supl.)298.
- ANDRADE ZA E ANDRADE SG (1979). Patologia da Doença de Chagas. Em: Brener, Z. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas, Segunda Edição, Editora Guanabara Koogan, RJ:199-248.
- ANDRADE SG (1982). The influence of strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 76:123-128.

- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ (1990). Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215(3):403-10.
- ANES N, CRISANTE G E ROJAS A (2004). Update on Chagas disease in Venezuela: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 99:781-787.
- ARAÚJO SM E CHIARI E (1988). Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongo C₃H isogênico. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 83:175-181.
- ASLUND L, CARISSON L, HENRIKSSON J *et al.* (1994). A gene family encoding heterogenous histone H1 protein in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 100:317-330.
- AUFDERHEIDE AC, SALO W, MADDEN M, STREITZ J, BUIKSTRA J, GUHL F, ARRIAZA B, RENIER C, WITTMERS LE, FORNACIARI G E ALLISON M (2003). A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 101(7):2034-2039.
- AUGUSTO-PINTO L, TEIXEIRA SMR, PENA SDJ E MACHADO CR (2003). Single-Nucleotide Polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in Mismatch-Repair efficiency. **Genetics** 164:117-126.
- AVILA HA, SIGMAN DS, COHEN LM, MILLIKAN RC *et al.* (1991). Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. **Mol. Biochem. Parasitol.** 48:211-222.
- AVILA HA, PEREIRA JB, THIEMANN O, PAIVA E *et al.* (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. **J. Clin. Microbiol.** 31:2421-2426.
- AYALA FJ (1993). *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. **Biol. Res.** 26:47-63.
- BAPTISTA CS, VÊNIO RZN, ABDALA S, CARRANZA JC, WESTENBERGER SJ, SILVA MN, PEREIRA CAB, GALVÃO LMC, GONTIJO ED, CHIARI E, STURM N E ZINGALES B (2006). Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. **Mol. Biochem. Parasitol.** 150:236-248.

- BARAN N, LAPIDOT A E MANOR H (1991). *Curr Opin Struct Biol* 8:321-330. Em: Eckert KA e Yan G (2000). Mutational analyses of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites in *Escherichia coli*: influence of sequence on expansion mutagenesis. **Nucleic Acid. Res.** 28:2831-2838.
- BARNABÉ C, NEUBAUER K, SOLARI A E TIBAYRENC M (2001). *Trypanosoma cruzi*: presence of the two major phylogenetic lineages and of several lesser discrete typing units (DTUs) in Chile and Paraguay. **Acta Trop.** 78:127-137.
- BARRETO MP (1979). Epidemiologia. Em: Brener, Z. e Andrade, Z. A. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Segunda Edição, Editora Guanabara Koogan, RJ:89-151.
- BECKMANN JS E WEBER JL (1992). Survey of human and rat microsatellites. **Genomics** 12:627-631.
- BECTON-DINCKSON (1997). FACS Vantage™ Reference Manual. Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA.
- BELEC L, AUTHIER J, ELIEZER-VANEROT MC, PIEDOUILLET C, MOHAMED AS E GHERARDI RK (1998). Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by use of *Thermus thermophilus* polymerase. **Muscle Nerve** 21(8):1064-7.
- BENSON G (1999). Tandem Repeats Finder: a program to analyze DNA sequence. **Nucleic Acid. Res.** 27:573-580.
- BERNSTEIN H, BYERLY HC, HOPF FA E MICHOD RE (1985). The evolutionary role of recombinational repair and sex. **Int. Rev. Cytol.** 96:1-28.
- BORGES JD, MACHADO DE ASSIS GF, GOMES LV, DIAS JCP, PINTO LDM, MARTINS-FILHO AO, TORRES RM, VIÑAS PA, BAHIA MT, MACHADO-COELHO GLL E LANA M (2006). Seroprevalence of Chagas disease in schoolchildren from two municipalities of Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil; six years following the onset of epidemiological surveillance. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 48(2):81-86.
- BORST P, VAN-DER-PLOEEM M, VAN-HOEK JF *et al.* (1982). On the DNA content and ploidy of trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 6:13-23.
- BRANCHE C, OCHAYA S, ASLUND L E ANDERSSON B (2006). Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 147:30-8.

- BRENER Z (1992). *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. Em Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M. E. e Rassi, A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo ISBT BRAZIL – SBHH:13-19.
- BRENER Z (1987). Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 82:205-212.
- BRENIÈRE SF, BOSSENO MF, TELLERIA J *et al.* (1995). Field amplification of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in bolivian triatomines. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 53:179-184.
- BRIONES RSM, SOUTO RP, STOLF BS E ZINGALES B (1999). The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and had implications to pathogenicity and host specificity. **Mol. Biochem. Parasitol.** 104:219-232.
- BRISSE S, VERHOEF J, TIBAYRENC M (2001). Characterization of large of small subunit rRNA and mine-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. **Int. J. Parasitol.** 31:1218-26.
- BRISSE S, DUJARDIN J E TIBAYRENC M (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Mol. Biochem. Parasitol.** 111:95-105.
- BRITTO C, CARDOSO MA, MONTEIRO VANNI CM *et al.* (1995). Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. **Parasitology** 110:241-247.
- BURGOS JM, ALTSCHECH JAIME, BISIO MARGARITA, DUFFY T, VALADARES HMS, SEIDENSTEIN ME, PICCINALI R, FREITAS JM, LEVIN MJ, MACCHI L, MACEDO AM, FREILIJ H E SCHIJMAN AG (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. **Int. J. Parasitol.**
- BURGOS JM, BEGHER S, FREITAS JM, BISIO M, DUFFY T, ALTSCHECH J, TEIJEIRO R, LOPEZ ALCOBA H, DECCARLINI F, FREILIJ H, LEVIN MJ, LEVALLE J, MACEDO AM AND SCHIJMAN AG (2005). Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 73:1016-1018.

- BUSCÁGLIA CA E DI NÓIA JM (2003). *Trypanosoma cruzi* and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes and Infection** 5:419-427.
- CAMPETELLA O, HENRIKSSON J, ASLUND L, FRASCH ACC, PETTERSSON U E CAZZULO JJ (1992). The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 50:225-234.
- CANO MI, GRUBER A, VAZQUEZ M, CORTÉS A, LEVIN MJ, GONZALEZ A, DEGRAVE W, RONDINELLI E, RAMIREZ JL, ALONSO C, REQUENA JM E FRANCO DA SILVEIRA J (1995). Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome Project. **Mol. Biochem. Parasitol.** 71:273-278.
- CARLIER Y E TORRICO F (2003). Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 36:767-771.
- CARNEIRO M, CHIARI E, GONÇALVES AM *et al.* (1990). Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. **Acta Trop.** 47:35-45.
- CHAKRABORTY R, KIMMEL M, STIVERS DN, DAVISON LJ E DEKA R (1997). Relative mutations rate at di-, tri- e tetranucleotide microsatellite loci. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 94:1041-1046.
- COLEMAN TP E ROESSER JR (1998). RNA secondary structure: na important cis-element in rat calcitonin/CGRP pré-messeger RNA splicing. **Biochemistry** 37:15941-15950.
- CORDEIRO GM, CASU R, MCINTYRE CL, MANNERS JM E HENRY RJ (2001). Microsatellites markers from sugarcane (*Saccharum* ssp) ESTs across transferable to erianthus and sorghum. **Plant. Sci.** 160:1115-1123.
- COURA JR, JUNQUEIRA AC, FERNANDES O, VALENTE AS, MILES MA (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends Parasitol.** 18(4):171-6.
- CRUZ RE, MACEDO AM, BARNABÉ C, FREITAS JM, CHIARI E, VELOSO VM, CARNEIRO CM, BAHIA MT, TAFURI WL E LANA M (2006). Further genetic characterization of the two *Trypanosoma cruzi* Berenice strains (Be-62 and Be-78) isolated from the first human case of Chagas disease (Chagas, 1909). **Acta Trop.** 97:239-246.

- CUNHA-NETO E, BILATE AM, HYLAND KV, FONSECA SG, KALIL J, ENGMAN DM (2006). Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. **Autoimmunity** 39(1):41-54. Review.
- DAO L (1949). Otros casos de enfermedad de Chagas em el Estado Guárico (Venezuela). Formas agudas y crónicas. Observación sobre enfermedad de Chagas congênita. **Rev. Policlin. (Caracas)** 17:17-32.
- DA SILVEIRA AB, LEMOS EM, ADAD SJ, CORREA-OLIVEIRA R, FURNESS JB, D'AVILA REIS D (2007a). Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Hum. Pathol.**
- DA SILVEIRA AB, D'AVILA REIS D, DE OLIVEIRA EC, NETO SG, LUQUETTI AO, POOLE D, CORREA-OLIVEIRA R, FURNESS JB (2007b). Neurochemical Coding of the Enteric Nervous System in Chagasic Patients with Megacolon. **Dig. Dis. Sci.**
- DEANE M, SOUZA M, PEREIRA M *et al.* (1984). *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analysis. **J. Protozool.** 31:276-280.
- DE LUCA D'ORO GM, GARDENAL CN, PERRET B, CRISCI JV, MONTAMAT EE (1993). Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations from Argentina estimated from enzyme polymorphism. **Parasitology** 107:405-410.
- DE SOUZA W (1984). Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Internacional Review of Cytology** 86:197-283.
- DEVERA R, FERNANDES O E COURA JR (2003). 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** 98:1-12.
- DEVERA R, ILLARRAMENDI X, MONTOYA-ARAÚJO R, PIRMEZ C, FERNANDES O E COURA JR (2002). Biodemes of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from humans from three endemic areas in Minas Gerais state. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 35(4):323-30.
- DIAS JCP (2001). Chagas disease, environment, participation and the state. **Cad. Saúde Pública.** vol.17 suppl. Rio de Janeiro.

- DIAS JCP (2000). Epidemiologia. Em: Brener Z, Andrade ZA e Barral-Netto M (2000). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edição, Editora Guanabara Koogan, RJ:48-74.
- DIAS JCP (1992). Epidemiology of Chagas disease (Americam Trypanosomiasis): It's impact on transfusion and clinical medicine. **São Paulo ISBT Brazil – SBHH** 49-80.
- DI NÓIA, JM, BUSCAGLIA CA, DE MARCHI CR, ALMEIDA IC E FRASCH, AC (2002). A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **J. Exp. Med.** 195(4):401-13.
- DVORAK JA (1993). Analysis of the DNA of parasitic protozoa by flow cytometry. **Methods Mol. Biol.** 21:191-204.
- DVORAK JA (1984). The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. **J. Cell. Biochem.** 24 (4):357-71.
- DVORAK JA, HALL TE, CRANE MSJ, ENGEL JC, MCDANIEL JP E URIEGAS R (1982). *Trypanosoma cruzi*: Flow cytometric analysis. Em: Analysis of total DNA/organism by means of mitramycin-induced fluorescence. **J. Protozool.** 29:430-437.
- EL-HASHEMITE N E DELHANTY JDA (1997). A technique for eliminating allele specific amplification failure during DNA amplification of heterozygous cells for preimplantation diagnosis. **Mol. Hum. Reprod.** 3(11):975-8.
- ELIAS MCQB, VARGAS N, TOMAZI L, PEDROSO A, ZINGALES B SCHENKMAN S E BRIONES MRS (2005). 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.** 140:221-227.
- ELLEGREN H (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews** 5:435-445.
- EL-SAYED NM, MYLER PJ, BARTHOLOMEU DC *et al.* (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science** 309:409-415.
- FERNANDES O, SOUTO RP, COURA JR *et al.* (1998). Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages

- using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 58 (6):807-811.
- FIELD D E WILLS C (1996). Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proc. R. Soc. London Ser. B.** 263:209-251.
- FINDLAY L, RAY P, QUIRKE P, RUTHERFORD A E LILFORD R (1995). *Human Reprod* 10:1609-1618. Em Garvin AM, Holzgreve W e Hahn S (1998). Highly accurate analysis of heterozygous loci by single cell PCR. **Nucleic Acid. Res.** 26:3468-3472.
- FREITAS JM, AUGUSTO-PINTO L, PIMENTA JR, BASTOS-RODRIGUES L, GONCALVES VF, TEIXEIRA SM, CHIARI E, JUNQUEIRA AC, FERNANDES O, MACEDO AM, MACHADO CR E PENA SDJ (2006). Ancestral genomes, Sex and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog.** 2: 226-235.
- FREITAS JM, LAGES-SILVA E, CREMA E, PENA SD, MACEDO AM (2005). Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **Int. J. Parasitol.** 35(4):411-7.
- GALANTI N, GALINDO M, SABAJ V, ESPINOZA I E TORO GC (1998). Histone genes in trypanosomatids. **Parasitol. Today** 14(2):64-70.
- GAUNT MW, YEO M, FRAME IA, STOTHARD JR, CARRASCO HJ, TAYLOR MC, MENA SS, VEASEY P, MILES GAJ, ACOSTA N, ARIAS AR E MILES MA (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature** 421:936-939.
- GERBER HP, SEIPEL K, GEORGIEV O, HOFFERER M, HUG M, RUSCONI S E SCHAFFNER W (1994). Transcriptional activation modulated by homopolimeric glutamine and proline stretches. **Science** 263:808-811.
- GIBSON WC E MILLES MA (1986). The Karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J.** 5:1299-1305.
- GOLDSTEIN DB E POLLOCK DD (1997). Launching microsatellites: a review of mutation process and methods of phylogenetic inference. **J. Hered.** 88:335-342.
- GONZALEZ CSM, MIRKIN GA, SOLANA ME E TEKIEL VS (1999). Patologia for *Trypanosoma cruzi*: cepa dependente? **Medicina (B Aires)** 59(Suppl 2):69-74.

- HAJDUK SL E SABATINI RS (1996). RNA editing: post-transcriptional restructuring of genetic information. Em: Smith DF e Parsons M. *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*, IRL Press Oxford:135-158.
- HANCOCK JM (1995). The contribution of slippage-like process to genome evolution. **J. Mol. Evol.** 41:1038-1047.
- HARR B, ZANGERL B E SCHLÖTTERER C (2000). Removal of microsatellite interruptions by DNA replication slippage: phylogenetic evidence from *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.** 17:1001-1009.
- HECKER KH E ROUX KH (1996). High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and step-down PCR. **Biotechniques** 20:478-485.
- HEITMAN J (2006). Sexual reproduction an the evolution of microbial pathogens. **Current Biology** 16:R711-R726.
- HENDERSON ST E PETES TD (1992). Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** 12:2749-2757.
- HENRIKSSON J, ASLUND L E PETERSSON U (1996). Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today** 12:108-114.
- HENRIKSSON J, PETERSON U E SOLARI A (1993). *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. **Exp. Parasitol.** 77:334-348.
- HENRIKSSON J, ASLUND L, MACINA RA, FRANKE DE CAZZULO BM, CAZZULO JJ, FRASCH AC E PETERSON U (1990). Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 42: 213-224.
- HERMAN E, TRUYENS C, ALONSO-VEGA C, RODRIGUES P, BERTHE A, GONZALEZ-MERINO E, TORRICO F E CARLIER Y (2004). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon-gama in response to parasite antigens. **J. Infect. Dis.** 189:1274-1281.
- HERMAN E, TRUYENS C, ALONSO-VEGA C, EVEN J, RODRIGUES P, BERTHE A, GONZALEZ-MERINO E, TORRICO F E CARLIER Y (2002). Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. **Blood** 100:2153-2158.

- HERNANDEZ R, RIOS P, VALDÉS AM *et al.* (1990). Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.** 41:207-212.
- HIGGINS D, THOMPSON J, GIBSON T, THOMPSON JD, HIGGINS DG E GIBSON TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid. Res.** 22:4673-4680.
- JONES EM, COLLEY DG, TOSTES S, LOPES ER, VNENCAK-JONES, CL E MCCURLEY, TL (1993). Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 48(3)348-357.
- JUNQUEIRA CV, DEGRAVE W E BRANDÃO A (2005). Minicircule organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends Parasitol.** 21(6):270-2.
- KANG S, OHSHIMA K, SHIMIZU M, AMIRHAERI S E WELLS RD (1995). *J. Biol. Chem.* 270:27014-27021. Em: Eckert KA e Yan G (2000). Mutational analyses of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites in *Escherichia coli*: influence of sequence on expansion mutagenesis. **Nucleic Acid. Res.** 28(14):2831-2838.
- KASHI Y E SOLLER M (1999). Functional roles of microsatellites and minisatellites. Em: Goldstein DB e Schlötterer C (1999). *Microsatellites: evolution and applications*, Oxford University Press.
- KNAPIK EW, GOODMAN A, EKKER M *et al.* (1998). A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). **Nature Genetics** 8:338-343.
- KOEBERLE F (1968). Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of american trypanosomiasis. **Adv. Parasitol.** 6:63-110.
- KOLLIEN AH E SCHAUB GA (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol. Today** 16 (9):381-387.
- LAGES-SILVA E, RAMÍREZ LE, PEDROSA AL, CREMA E, GALVÃO LMC, PENA SDJ, MACEDO AM E CHIARI E (2006). Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. **J. Clin. Microbiol.** 44 (6):2167-2171.
- LAGES-SILVA E, CREMA E, RAMÍREZ LE, MACEDO AM, PENA SDJ E CHIARI E (2001). Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic

- megaesophagus: blood and tissue parasitism. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 65(5):435-41.
- LANA M, CHIARI E E TAFURI WL (1992). Experimental Chagas' disease in dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 87:59-71.
- LANA M, TAFURI WL, CALIARI MV, BAMBIRRA EA, CHIARI CA, LEITE VHR, BARBOSA AJA, TOLEDO MJO E CHIARI E (1988). Fase crônica cardíaca fibrosante da tripanosomíase experimental em cão. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 21:113-121.
- LANA M E CHIARI CA (1986). Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice-62 e Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi* isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 81:247-253.
- LANA M (1981). Caracterização do *Trypanosoma cruzi*, cepa Berenice, isolada da mesma paciente em diferentes períodos. Dissertação de Mestrado. UFMG, Belo Horizonte, MG. 91p.
- LEE YC, KOROL AB, FAHIMA T, BEILES A E NEVO E (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology** 11:2453-2465.
- LEON JS E ENGMAN DM (2003). The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. **Front Biosc** 8:315-322.
- LEVINSON G E GUTMAN GA (1987a). High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. **Nucleic. Acid. Res.** 15:5323-5338.
- LEVINSON G E GUTMAN GA (1987b). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequences evolution. **Mol. Biol. Evol.** 4:203-221.
- LI YC, KOROL AB, FAHIMA T E NEVO E (2004). Microsatellites within genes: structures, function and evolution. **Mol. Biol. Evol.** 21(6):991-1007.
- LITT M E LUTY JA (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Gen.** 44:397-401.
- LORCA M (2002). La enfermedad de Chagas congênita, transfusional y otras vías en el contexto de la interrupción de la transmisión vectorial. **Rev. Patol. Trop.** 31 (supl.):77-147.

- LUQUETTI AO, DIAS JC, PRATA A (2005a). Diagnosis and treatment of congenital infection caused by *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 38 (Suppl2):27-8.
- LUQUETTI AO, FERREIRA AW, OLIVEIRA RA, TAVARES SB, RASSI A, DIAS JC E PRATA A (2005b). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: estimation of prevalence base don preliminary data of national serological surveys in children under 5 years old and other sources. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 38(Suppl 2):27-8.
- LUQUETTI AO, MILES MA, RASSI A, DE REZENDE JM, DE SOUZA AA, POVOA MM E RODRIGUES I (1986). *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 80:462-470.
- MACEDO AM, MACHADO CR, OLIVEIRA RP E PENA SDJ (2004). *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 99(1):1-12.
- MACEDO AM, PIMENTA JR, AGUIAR RS, MELO AR, CHIARI E, ZINGALES B, PENA SDJ E OLIVEIRA RP (2001). Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 96(3):407-413.
- MACEDO AM E PENA SDJ (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol. Today** 14 (3):119-124.
- MACEDO AM, MARTINS MS, CHIARI E E PENA SDJ (1992). DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Mol. Biochem. Parasitol.** 55:147-154.
- MACHADO CA E AYALA FJ (2001). Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98:7396-7401.
- MACHADO CR, AUGUSTO-PINTO L, MCCULLOCH R E TEIXEIRA SMR (2005). DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. **Mutat Res.** 612(1):40-57.
- MARCET PL, DUFFY T, CARDINAL MV, BURGOS JM, LAURICELLA MA, LEVIN MJ, KITRON U, GURTLER RE E SCHIJMAN AG (2006). PCR-based screening and the

- lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northeastern Argentina. **Parasitology** 132:57-65.
- MARKOULATOS P, SIAFAKAS N E MONCANY M (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **J. Clin. Lab. Anal.** 16(1):47-51. Review.
- MEDONÇA MB, NEHME NS, SANTOS SS, CUPOLILLO E, VARGAS N, JUNQUEIRA A, NAIFF RD, BARRETT TV, COURA JR, ZINGALES B E FERNANDES O (2002). Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. **Parasitology** 124(Pt2):177-184.
- METZGAR D, BYOTOF J E WILLS C (2000). Selection against frameshift mutations limits microsatellites expansion in coding DNA. **Genome Res.** 10:72-80.
- MCDANIEL JP E DVORAK JA (1993). Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. **Mol. Biochem. Parasitol.** 57:213-222.
- MILES MA, LANHAN SM, SOUZA AA *et al.* (1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 74:221-237.
- MILES MA, SOUZA A, POVOA M, SHAW JJ, LAINSON R E TOYÉ PJ (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature** 272:819-821.
- MILES MA, TOYÉ PJ, OSWALD SC. E GODFREY DG (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 71:217-225.
- MOMEN H (1999). Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 94(1):181-184.
- MOREL C, CHIARI E, CAMARGO EP, MATTEI D, ROMANHA AJ E SIMPSON L (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease product of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77:6810-6814.
- MOREL CM E SIMPSON L (1986). The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. **Parasitol. Today** 2:97-101.

- MORGANTE M, HANAFEY M E POWELL W (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nat. Genet.** 30:194-200.
- MOYA PR (2000). Enfermedad de Chagas congénita/Congenital Chagas' disease. Reunión anual de pesquisa aplicada em doença de Chagas e leishamioses (XVI). Relatório final. Uberaba.3p.
- MORENO EA, RIVERA IM, MORENO SC, ALARCON ME, LUGO-YARBUH A (2003). Transmission vertical de *Trypanosoma cruzi* em ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. **Invest. Clin.** 44:241-254.
- MYLER PJ (1993). Molecular variation in trypanosomes. **Acta Trop.** 53:205-225.
- NATAN-LARRIER L (1921). Herédité dès infections experimentales a *Schizotrypanum cruzi*. **Bull. Soc. Path. Exot.** 14:232-238.
- OLIVEIRA RP, MELO AIR, MACEDO AM, CHIARI E E PENA SDJ (1999). The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 94(Suppl.1):65-70.
- OLIVEIRA RP, BROUDE NE, MACEDO AM, CANTOR CR, SMITH CL E PENA SDJ (1998). Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95:3376-3780.
- OLIVEIRA RP (1997). Análise de polimorfismos de DNA para estudos populacionais e evolutivos em *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais.
- PALACIUS-PRU E, CARRASCO H, SCORZA C *et al.* (1989). Ultrastructural characteristics of different stages of human chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med.** 41:29-40.
- PENA SDJ, BARRETO G, VAGO AR, DE MARCO L, REINACH FC, NETO ED E SIMPSON AJG (1994). Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91:1946-1949.
- PENA SDJ E SANTOS FR (2000). Origen de los Amerindios. **Investigacion y Ciencia** 287:48-54.
- PIERCE KE, RICE JE, SANCHEZ JA, WANGH LJ (2002). QuantiLyse: reliable DNA amplification from single cells. **Biotechniques** 32(5):1106-11.

- PIMENTA JR (2002). Análises Filogenéticas e Populacionais em *Trypanosoma cruzi* a partir de estudos de microssatélites polimórficos de DNA. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais.
- PINTO AS, DE LANA M, BASTRENTA B, BARNABE C, QUESNEY V, NOEL S, TIBAYRENC M (1998). Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. **Parasitol. Res.** 84(5):348-53.
- PIYAMONGKAL W, BERMÚDEZ MG, HARPER JC E WELLS D (2003). Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. **Mol. Hum. Reprod.** 9 (7):411-420.
- PORCILLE PE, SANTOS MR, SOUZA RT, VERBISCK NV, BRANDÃO A, URMENYI T, SILVA R, RONDINELLI E, LORENZI H, LEVIN MJ, DEGRAVE W, FRANCO DA SILVEIRA J (2003). A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. **Gene** 308:53-65.
- POSTAN M, MCDANIEL JP E DVORAK JA (1984). Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. II. Course of infection of C57BL/6 mice with single-cell-isolated stocks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 33(2):236-8.
- PRATA A (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. **The Lancet Infect. Dis.** 1:92-100.
- RAY PF, WINSTON RML E HANDYSIDE AH (1994). Single cells analysis for diagnosis of cystic fibrosis and Lesch Nyhan syndrome in human embryos before implantation. Miami Bio/Technology European Symposium, Advances in Gene Technology: **Mol. Biol. Hum. Gen. Dis.** 5:46.
- RASSI AG (1992). Chagas disease – Clinical features. Em: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo ME e Rassi A. Chagas disease (Americam Trypanosomiasis): It's impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo ISBT Brazil-SBHH:81-101.
- RAZIN A E RIGGS AD (1980). DNA methylation and gene function. **Science** 210(4470):604-10.
- RECHITSKY S, FREIDINE M, VERLINSKY Y E STROM CM (1996). Allele drop-out in sequencial PCR and FISH analysis of single cell (cell recycling). **J. Assist. Reprodu. Genet.** 13:115-124.

- RECOMMENDATIONS FROM A SATELLITE MEETING (1999). International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease, April 11-16 1999, Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 94: 429-432.
- REVOLLO S, OURY B, LAURENT JP, BARNABE C, QUESNEY V, CARRIERE V, NOEL S, TIBAYRENC M (1998). *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. **Exp. Parasitol.** 89:30-39.
- RICHARD GF E PÂQUES F (2000). Mini e microsatellite expansions: the recombination connection. **EMBO Reports** 21:122-126.
- ROBELLO C, GAMARRO F, CASTANYS S, E ALVAREZ-VALI F (2000). Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. **Gene** 246(1-2) 331-338.
- ROCHA EP, MATIC I E TADDEI F (2002). Over-representation of repeats in stress response genes: a strategy to increase versatility under stressful conditions? **Nucleic Acid. Res.** 30:1886-1894.
- ROJAS MV E GALANTI N (1990). DNA methylation in *Trypanosoma cruzi*. **FEBS** 263:113-116.
- ROJAS MV E GALANTI N (1991). Relationship between DNA methylation and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi*. **FEBS** 295:31-34.
- ROMANHA JA (1982). Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais.
- ROMANHA JA, DA SILVA PEREIRA AA, CHIARI E E KILGOUR V (1979). Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. **Comp. Biochem. Physiol.** 62:139-142.
- RUSSOMANDO G, ROJAS DE ARIAS A, ALMIRON M et al. (1996). *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. **Exp. Parasitol.** 83:62-66.
- RUSSOMANDO G, FIGUEREDO A, ALMIRON M, et al. (1992). Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. **Clin. Microbiol.** 30:2864-2868.
- RYCHLIK W (1989-1991). Oligo 4.0- Primer Analysis Software, Copyright.

- RYCKMAN RE (1986). The vertebrate hosts of the Triatominae of North and Central America and the West Indies (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Bull. Soc. Vect. Ecol.** 11:221-241.
- SALGADO JA, GARCEZ PN, OLIVEIRA CA E GALIZZI J (1962). Revisão clínica atual do primeiro caso humano descrito de Doença de Chagas. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 4:330-337.
- SANGUINETTI CJ, DIAS NETO E E SIMPSON AJ (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques** 17:914-921.
- SANTELO FH, DOST CK, ALBURQUERQUE S *et al.* (1998). Morphometric characterization of a strain of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 93 (suppl.111):141.
- SANTOS MR, CANO MI, SCHIJMAN A, LORENZI H, VAZQUEZ M, LEVIN MJ, RAMIREZ JL, BRANDÃO A, DEGRAVE WM, DA SILVEIRA JF (1997). The *Trypanosoma cruzi* genome project: nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brener. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 92:821-828.
- SCHENKMAN S, JANG M, HART GW E NUSSENZWEIG V (1991). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell** 65:117-1125.
- SCHENONE H, GAGGERO M, SAPUNAR J, CONTRERAS MC E ROJAS A (2001). Congenital Chagas disease of second generation in Santiago, Chile. Report of two cases. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 43:231-232.
- SCHIJMAN A, VIGLIANO C, BURGOS JM, FAVALORO R, PERRONE S, LAGUENS R E LEVIN MJ (2000). Early diagnosis of recurrence of *T. cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. **J. Heart. Lung Transplant.** 19:1114-7.
- SCHLÖTTERER C E TAUTZ D (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Res.** 20:211-215.
- SCHMUÑIS GA (2000). A Tripanossomíase Americana e seu impacto na saúde pública das Américas. Em: Brener Z e Andrade ZA (2000). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edição, Editora Guanabara Koogan, RJ:1-15.

- SCHNEIDER S, ROESSLI D E EXCOFFIER L (2000). Arlequin version 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SCHOFIELD CJ (1994). Triatominae, Biología y Control. **Eurocommunica Publications**, West Sussex PO229RR, UK.
- SHINDE D, LAY Y, SUN F E ARNHEIM N (2003). Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. **Nucleic Acids Res.** 31:974-980.
- SHRIVER MD, JIN L, CHAKRABORTY R *et al.* (1993). VNTR allele frequency distribution under the stepwise mutation model: a computer simulation approach. **Genetics** 134:983-993.
- SILVEIRA JF (2000). Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. Em: Brener Z e Andrade ZA (2000). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edição, Editora Guanabara Koogan, RJ:127-152.
- SIMPSON L (1987). The mitochondrial DNA of kinetoplastida protozoa: genomic organization, replication and evolution. **Annu. Rev. Microbiol.** 41:363-82.
- SINDEN RR (1994). DNA Structure and Function. Academic Press, NY. Em: Eckert KA e Yan G (2000). Mutational analyses of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites in *Escherichia coli*: influence of sequence on expansion mutagenesis. **Nucleic Acids Res.** 28(14):2831-2838.
- SOLARI AJ (1980). The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. **Chromosoma** 78:239-255.
- SOUTO RP, FERNANDES O, MACEDO AM, CAMPBELL DA E ZINGALES B (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 83:141-152.
- SOUTO RP E ZINGALES B (1993). Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Mol. Biochem. Parasitol.** 62:45-52.
- STALLINGS RL, FORD AF, NELSON D, TORNEY DC, HILDEBRAND CE E MOYZIS RK (1991). Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. **Genomics** 10:807-815.

- STUART K (1995). RNA editing: an overview, status report, and personal perspective. Em: Boothroyd JC e Komuniecki R. *Molecular Approaches to Parasitology*, Wiley-Liss, Inc. NY:243-254.
- STURM NR, VARGAS NS, WESTENBERGER SJ, ZINGALES B E CAMPBELL DA (2003). Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol.** 33:269-279.
- STURM NR, DEGRAVE W, MOREL C *et al.* (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplifications of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Mol. Biochem. Parasitol.** 33:205-214.
- SPITZNER FL, FREITAS JM, MACEDO AM, TOLEDO MJO, ARAÚJO SM, PRIOLI AJ E GOMES ML (2007). *Trypanosoma cruzi* - Triatomine associations and the presence of mixed infections in single triatomine bugs in Paraná State, Brazil. Artigo aceito para publicação.
- TANOWITZ HB, KIRCHHOFF LV, SIMON P *et al.* (1992). Chagas disease. **Ann. Rev. Microbiol.** 5:400-419.
- TARLETON RL (2003). Chagas disease: a role for autoimmunity? **Trends Parasitol.** 19:447-451.
- TAUTZ D (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.** 17:6463-6471.
- TEIXEIRA ARL, NASCIMENTO RJ E STURM N (2006). Evolution and pathology in Chagas disease – A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 101(5): 463-491.
- TEIXEIRA MMG, DASILVA FM, MARCILI A, UMEZAWA ES, SHIKANAI-YASUDA MA, CUNHA-NETO E, KALIL J, STOLF N E STOLF AM (2006). *Trypanosoma cruzi* lineage I in endomyocardial biopsy from a north-eastern Brazilian patient at end-stage chronic chagasic cardiomyopathy. **Trop. Med. Int. Health** 11(3):294-298.
- TEMNYKH S, DECLERCK G, LUKASHOVA A, LIPOVICH L, CARTINHO S E MCCOUCH S (2001). Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome Res.** 11:1441-1452.
- TIBAYRENC M (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. **Adv. Parasitol.** 36:48-115.

- TIBAYRENC M, NEUBAUER K, BARNABÉ C, GUERRINI F, SKARECKY D E AYALA, FJ (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90:1335-1339.
- TIBAYRENC M, KJELLBERG F, ARNAUD J, OURY B, BRENIERE SF, DARDE ML E AYALA FJ (1991). Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. **Proc Natl Acad Sci USA** 88(12):5129-33.
- TIBAYRENC M, KJELLBERG F E AYALA FJ (1990). 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. USA** 87:2414-2418.
- TIBAYRENC M E AYALA FJ (1988). Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. **Evolution** 42:277-292.
- TIBAYRENC M, WARD P, MOYA A E AYALA FJ (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83:115-119.
- TORO CG E GALANTI N (1988). H1 histone and histone variants in *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Cell. Res.** 174:16-24.
- TORRICO F, ALONSO-VEJA C, SUAREZ E, RODRIGUEZ P, TORRICO MC, DRAMAIX M, TRUYENS C E CARLIER Y (2004). Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 70:201-209.
- TORRICO MC, SOLANO M, GUZMAN JM, PARRADO R, SUAREZ E, ALONSO-VEJA C, TRUYENS C CARLIER Y E TORRICO F (2005). Estimation of the parasitemia in *Trypanosoma cruzi* human infection: high parasitemias are associated with severe and fatal congenital Chagas disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 38 (Suppl2):55-7.
- TÓTH G, GÁSPÁRI Z E JURKA J (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Res.** 10:967-981.
- ULLU E, TSCHUDI C, GUNZI A (1996). Trans-splicing in trypanosomatid protozoa. Em Smith DF, Parsons M (eds). **Molecular Biology of Parasitic Protozoa**. IRL Press Oxford:115-129.

- UMEZAWA E, STOLF AMS, CORBETT CEP E SHIKANAI-YASUDA MA (2001). Chagas' disease. **The Lancet** 357:797-799.
- VAGO AR, SILVA DM, ADAD SJ, CORREA-OLIVEIRA R E D'AVILA REIS D (2003). Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the oesophagus of patients without megaoesophagus. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 97(3):308-9.
- VAGO AR, ANDRADE LO, LEITE AA, REIS DA, MACEDO AM, ADAD SJ, TOSTES SJR, MOREIRA MCV, FILHO GB E PENA SDJ (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* from tissues of patients with chronic chagas disease. **Am. J. Pathol.** 156(5):1805-1809.
- VAGO AR, MACEDO AM, OLIVEIRA RP, ANDRADE LO, CHIARI E, GALVÃO LMC, REIS DR, PEREIRA MES, SIMPSON AJG, TOSTES S E PENA SDJ (1996). Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **Am. J. Pathol.** 149(6):2153-2159.
- VALADARES HMS (2002). Isolamento e caracterização de microssatélites de trinucleotídeos no genoma de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto.
- VALDES AM, SLATKIN M, FREIMER NB (1993). Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model. **Genetics** 133:737-749.
- VARGAS N, PEDROSO A E ZINGALES B (2004). Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. **Mol. Biochem. Parasitol.** 138:131-141.
- VELOSO VM, ROMANHA AJ, LANA M, MURTA SM, CARNEIRO CM, ALVES CF, BORGES EC, TAFURI WL, MACHADO-COELHO GL, CHIARI E, BAHIA MT (2005). Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. **Parasitol. Res.** 96(6):382-9.
- VINHAES MC (2002). Os Programas nacionais de controle na fase avançada de controle e os novos desafios estratégicos, políticos e epidemiológicos. **Rev. Pat. Trop.** 31:124-129.
- VIRREIRA M, ALONSO-VEGA C, SOLANO M, JIJENA J, BRUTUS L, BUSTAMANTE Z, TRUYENS C, SCHNEIDER D, TORRICO F, CARLIER Y E SVOBODA M (2006). Congenital Chagas disease in Bolívia is not associated with DNA polymorphisms of *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 75:871-879.

- WAGNER W E SO M (1990). Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of multicopy genes. **Infect. Immun.** 58:3217-3224.
- WALDER JA, EDER PS, ENGAMAN DM, BRENTANO ST, WLADER RY, KNUTZON DS, DORFAMAN DM E DONELSON JE (1986). The 35 nucleotide-spliced leader is common to all trypanosome messenger RNA's. **Science** 233:569-571.
- WEBER JL (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics** 7:524-530.
- WEBER JL E MAY PE (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms wich can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Gen.** 44:388-396.
- WESTENBERGER SJ, CERQUEIRA GC, EL-SAYED NM, ZINGALES B, CAMPBELL DA E STURM NR (2006). *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircules display species- and strains-specific variation and a conserved element in the non-coding region. **BMC Genomics** 22:47-60.
- WESTENBERGER SJ, BARNABÉ C, CAMPBELL DA E STURM NR (2005). Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics** 171:527-543.
- WHITE TC, RUDENKO G E BORST P (1986). Three small RNAs within the 10kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28S rRNAs. **Nucleic. Acid. Res.** 14:9471-9489.
- WHO (2005). <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/files/chagas-poster.pdf>
- WINCKER P, BRITTO C, PEREIRA JB *et al.* (1994). Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 51:771-777.
- WREN JD, FORGACS E, FONDON JW, GARNER HR *et al.* (2000). Repeat polymorphisms within gene regions: phenotypic and evolutionary implications. **Am. J. Hum. Genet.** 67:345-356.
- ZHANG L, XIANGFENG C, SHMITT K, HUBERT R, NAVIDI W E ARNHEIM N (1992). Whole genome amplification from a single cell: Implications for genetic analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89:5847-5851.

ZINGALES B, SOUTO RP, MANGIA RH , LISBOA CV, CAMPBELL DA, COURA JR, JASEN A E FERNANDES O (1998). Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Int. J. Parasitol.** 28(1):105-112.



ANEXOS





ARTIGOS ACEITOS PARA
PUBLICAÇÃO



Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites

Helder Magno Silva Valadares ^{a,1}, Juliana Ramos Pimenta ^{a,1}, Jorge Marcelo de Freitas ^a, Tomás Duffy ^b, Daniella C. Bartholomeu ^c, Riva de Paula Oliveira ^d, Egler Chiari ^c, Maria da Consolação Vieira Moreira ^e, Geraldo Brasileiro Filho ^f, Alejandro Gabriel Schijman ^b, Glória Regina Franco ^a, Carlos Renato Machado ^a, Sérgio Danilo Junho Pena ^a, Andréa Mara Macedo ^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 486, 30161970 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET), Buenos Aires, Argentina

^c Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

^d Joslin Diabetes Center, Section in Developmental and Stem Cell Biology, Boston, MA, United States

^e Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

^f Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

Received 1 August 2007; received in revised form 15 October 2007; accepted 25 October 2007

Abstract

The investigation of the importance of the genetics of *Trypanosoma cruzi* in determining the clinical course of Chagas disease will depend on precise characterisation of the parasites present in the tissue lesions. This can be adequately accomplished by the use of hyper-variable nuclear markers such as microsatellites. However the unilocal nature of these loci and the scarcity of parasites in chronic lesions make it necessary to use high sensitivity PCR with nested primers, whose design depends on the availability of long flanking regions, a feature not hitherto available for any known *T. cruzi* microsatellites. Herein, making use of the extensive *T. cruzi* genome sequence now available and using the Tandem Repeats Finder software, it was possible to identify and characterise seven new microsatellite loci – six composed of trinucleotide (TcTAC15, TcTAT20, TcAAT8, TcATT14, TcGAG10 and TcCAA10) and one composed of tetranucleotide (TcAAAT6) motifs. All except the TcCAA10 locus were physically mapped onto distinct intergenic regions of chromosome III of the CL Brener clone contigs. The TcCAA10 locus was localised within a hypothetical protein gene in the *T. cruzi* genome. All microsatellites were polymorphic and useful for *T. cruzi* genetic variability studies. Using the TcTAC15 locus it was possible to separate the strains belonging to the *T. cruzi* I lineage (DTU I) from those belonging to *T. cruzi* II (DTU IIb), *T. cruzi* III (DTU IIc) and a hybrid group (DTU IId, IIe). The long flanking regions of these novel microsatellites allowed construction of nested primers and the use of full nested PCR protocols. This strategy enabled us to detect and differentiate *T. cruzi* strains directly in clinical specimens including heart, blood, CSF and skin tissues from patients in the acute and chronic phases of Chagas disease.

© 2007 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; Genome project; Polymorphic microsatellites; Full nested PCR

1. Introduction

The clinical features of Chagas disease, an American parasitic disease caused by *Trypanosoma cruzi*, are quite variable, ranging from asymptomatic cases to severe

* Corresponding author. Tel.: +55 31 34992641; fax: +55 31 34992984.
E-mail address: andrea@icb.ufmg.br (A.M. Macedo).

¹ Both authors contributed equally to the work.

Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease

Juan M. Burgos ^a, Jaime Altcheh ^b, Margarita Bisio ^a, Tomas Duffy ^a,
Helder M.S. Valadares ^c, María Elena Seidenstein ^d, Romina Piccinalli ^e,
Jorge M. Freitas ^c, Mariano J. Levin ^a, Liliana Macchi ^d,
Andrea M. Macedo ^c, Hector Freilij ^b, Alejandro G. Schijman ^{a,*}

^a Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (LaBMECh),

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET), Buenos Aires, Argentina

^b Laboratorio de Parasitología y Enfermedad de Chagas, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina

^c Laboratorio de Genética-Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Inmunología, ICB/UFMG, Belo Horizonte, Brazil

^d Servicio de Neonatología y Obstetricia, Hospital Bernardino Rivadavia, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^e Laboratorio de Eco-Epidemiología, Departamento de Ecología, Genética y Evolución,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Received 21 February 2007; received in revised form 9 April 2007; accepted 18 April 2007

Abstract

Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* may occur in some or all the gestations from a *T. cruzi*-infected mother. Variable rates of congenital transmission have been reported in different geographical areas where different parasitic strains predominate, suggesting that parasitic genotypes might play a role in the risk of congenital transmission. Moreover, in cases of transmission it is unknown if the whole maternal *T. cruzi* population or certain clones are preferentially transmitted by the transplacental route. In this study, bloodstream *T. cruzi* lineages were identified in blood samples from congenitally infected children, transmitting and non-transmitting mothers and unrelated Chagas disease patients, using improved PCR strategies targeted to nuclear genomic markers. *T. cruzi* II_d was the prevalent genotype among 36/38 PCR-positive congenitally infected infants, 5/5 mothers who transmitted congenital Chagas disease, 12/13 mothers who delivered non-infected children and 28/34 unrelated Chagas disease patients, all coming from endemic localities of Argentina and Bolivia. These figures indicate no association between a particular genotype and vertical transmission. Furthermore, minicircle signatures from the maternal and infants' bloodstream trypanosomes were profiled by restriction fragment length polymorphism of the 330-bp PCR-amplified variable regions in seven cases of mothers and congenitally infected infants. Minicircle signatures were nearly identical between each mother and her infant/s and unique to each mother-infant/s case, a feature that was also observed in twin deliveries. Moreover, allelic size polymorphism analysis of microsatellite loci from populations transmitted to twins showed that all clones from the maternal polyclonal population were equally infective to both siblings.

© 2007 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Transplacental transmission; Phylogenetic lineage; Real time PCR; *Trypanosoma cruzi* clonality; Microsatellite loci

1. Introduction

Due to the increasing control of the transmission of *Trypanosoma cruzi* mediated by vector, blood transfusion and organ transplant, congenital Chagas disease (CCD) has

* Corresponding author. Tel.: +54 11 47832871; fax: +54 11 47868576.
E-mail address: schijman@dna.uba.ar (A.G. Schijman).

Impact of Dual Infections on Chemotherapeutic Efficacy in BALB/c Mice Infected with Major Genotypes of *Trypanosoma cruzi*[¶]

H. R. Martins,^{1*} R. Moreira Silva,² H. M. S. Valadares,³ M. J. O. Toledo,⁴ V. M. Veloso,⁵
D. M. Vitelli-Avelar,⁷ C. M. Carneiro,^{1,7} G. L. L. Machado-Coelho,^{1,2} M. T. Bahia,^{1,5}
O. A. Martins-Filho,⁶ A. M. Macedo,³ and M. Lana^{1,7}

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto¹; Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto²; Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais³; Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Pr⁴; Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto⁵; Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ⁶; and Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, MG, Brazil

Received 20 December 2006/Returned for modification 17 March 2007/Accepted 21 June 2007

The aim of this work was to investigate the impact of dual infections with stocks of *Trypanosoma cruzi* major genotypes on benznidazole (BZ) treatment efficacy. For this purpose, *T. cruzi* stocks representative of the genetic *T. cruzi* lineages, displaying different susceptibilities to BZ, belonging to the major *T. cruzi* genotypes broadly dispersed in North and South America and important in Chagas' disease epidemiology were used. Therapeutic efficacy was observed in 27.8% of the animals treated. Following BZ susceptibility classification, significant differences were observed in dual infections on the major genotype level, demonstrating that combinations of genotypes 19+39 and genotypes 19+32 led to a shift in the expected BZ susceptibility profile toward the resistance pattern. Analysis on the *T. cruzi* stock level demonstrated that 9 out of 24 dual infections shifted the expected BZ susceptibility profile compared with the respective single infections, including shifts toward lower and higher BZ susceptibilities. Microsatellite identification was able to identify a mixture of *T. cruzi* stocks in 7.7% of the *T. cruzi* isolates from infected and untreated mice (6.9%) and infected and treated but not cured mice (9.0%), revealing in some mixtures of BZ-susceptible and -resistant stocks that the *T. cruzi* stock identified after BZ treatment was previously susceptible in single infections. Considering the clonal structure and evolution of *T. cruzi*, an unexpected result was the identification of parasite subpopulations with distinct microsatellite alleles in relation to the original stocks observed in 12.2% of the isolates. Taken together, the data suggest that mixed infections, already verified in nature, may have an important impact on the efficacy of chemotherapy.

Chagas' disease, which is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is widespread in North and South America, from Mexico to southern Argentina and Chile. Although great advances have been reached in vectorial and transfusional transmission, reducing the incidence of Chagas' disease by more than 70% (28), it is estimated that 13 million individuals still remain infected in Central and Latin America and 200,000 new cases occur per year in areas where the disease is endemic (47). The infection is characterized by a brief acute phase, followed by a chronic phase in which most patients remain asymptomatic. Approximately 30% of these people develop a silent and debilitating disease with complex and varied clinical pictures (14). This reality justifies the studies of specific Chagas' disease chemotherapy that currently have shown unsatisfactory and controversial results. Therefore, the treatment of individuals with Chagas' disease remains a great challenge. In this context, several studies have pointed out the relevance of parasite-related features to the genesis and perpetuation of

tissue lesions (21, 29), as well as the beneficial effect of effective treatment, even for uncured patients, on the prognosis and clinical evolution of the disease (5, 16, 43).

Despite intensive research to develop new drugs that are safer and efficient in the chemotherapy of Chagas' disease (42), only two drugs are available for human disease chemotherapy, including benznidazole (BZ; Rochagan, Rodanil [Roche]) and nifurtimox (Lampit; Bayer). These nitro derivatives are used in prolonged treatment schedules and cause important adverse reactions that hamper treatment continuity. The results of chemotherapy are more successful during the acute phase of the disease, and an approximately 40 to 76% parasitological cure rate could be observed. The efficacy of treatment in the chronic phase is low or zero, and a parasitological cure is obtained in 0 to 20% of the patients treated (19, 34).

It has been proposed that parasite genetic aspects are involved and make important contributions to explain the differences observed after treatment when screening results in distinct geographic areas are compared. Also, the existence of strains naturally resistant or susceptible to nitro derivatives has been described (4, 15, 18, 39). Considering that *T. cruzi* undergoes predominantly clonal evolution (36), a correlation among phylogenetic divergence and parasite biological and medical properties is expected. Several in vitro and in vivo studies (3,

* Corresponding author. Mailing address: Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário, Morro do Cruzeiro, 35400-000 Ouro Preto, MG, Brazil. Phone: 55-31-3559-1691. Fax: 55-31-3559-1800. E-mail: helen@nupcb.ufop.br.

[¶] Published ahead of print on 16 July 2007.

Trypanosoma cruzi: Impact of dual-clone infections on parasite biological properties in BALB/c mice

H.R. Martins^a, M.J.O. Toledo^b, V.M. Veloso^c, C.M. Carneiro^{a,d}, G.L.L. Machado-Coelho^e,
W.L. Tafuri^a, M.T. Bahia^c, H.M. Valadares^f, A.M. Macedo^f, M. Lana^{a,d,*}

^a Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB), UFOP, MG, Brazil

^b Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil

^c Departamento de Ciências Biológicas, ICEB, UFOP, MG, Brazil

^d Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Rua Costa Sena, 171, CEP: 35 400-000 Ouro Preto, MG, Brazil

^e Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia, UFOP, MG, Brazil

^f Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFOP, MG, Brazil

Received 8 April 2005; received in revised form 8 November 2005; accepted 10 November 2005

Available online 9 January 2006

Abstract

Herein, we have analyzed major biological properties following dual-clone *Trypanosoma cruzi* infections in BALB/c mice. Eight *T. cruzi* clonal stocks, two of each principal genotype, including genotype 19 and 20 (*T. cruzi* I), hybrid genotype 39 (*T. cruzi*) and 32 (*T. cruzi* II) were combined into 24 different dual-clone infections. Special attention was given to characterize biological parameters assayed including: prepatent period, patent period, maximum of parasitemia, day of maximum parasitemia, area under the parasitemia curve, infectivity, mortality, and hemoculture positivity. Our findings clearly demonstrated that features resultant of dual-clone infections of *T. cruzi* clonal stocks did not display either the characteristics of the corresponding monoclonal infections or the theoretical mixture based on the respective monoclonal infections. Significant changes in the expected values were observed in 4.2–79.2% of the mixtures considering the eight biological parameters studied. A lower frequency of significant differences was found for mixtures composed by phylogenetically distant clonal stocks. Altogether, our data support our hypothesis that mixed *T. cruzi* infections have a great impact on the biological properties of the parasite in the host and re-emphasizes the importance of considering the possible occurrence of natural mixed infections in humans and their consequences on the biological aspects of ongoing Chagas' disease.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Index Descriptors and Abbreviations: *Trypanosoma cruzi*; Dual-clone infection; Clonal genotypes; Biological properties; PPP, prepatent period; PP, patent period; MP, maximum parasitemia; DMP, day of maximum parasitemia; PAR, area under the parasitemia curve; INF, infectivity; MORT, mortality; +HEM, hemoculture positivity; MW, Mann–Whitney test; KS, Kolmogorov–Smirnov test; χ^2 , chi-square test; SD, number of significant differences; S, significant difference at $P < 0.05$; NS, nonsignificant difference at $P > 0.05$; NR, not recorded due to subpatent parasitemia; I, increased parasitemia; D, decreased parasitemia; *n*, numbers of animals

1. Introduction

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas' disease, is a protozoan parasite that displays extremely heterogeneous biological properties (Andrade, 1976; Toledo et al.,

2002), including growth kinetics in cellular and acellular cultures (Dvorak et al., 1980; Laurent et al., 1997; Revollo et al., 1998), tissue tropism (Diego et al., 1998; Melo and Brener, 1978), pathogenicity (Andrade and Magalhães, 1997), ability to multiply and differentiate in the insect vectors (Garcia and Dvorack, 1982; Lana et al., 1998), and susceptibility to chemotherapy (Andrade et al., 1992; Revollo et al., 1998; Toledo et al., 2003; reviewed by Toledo et al., 2004). Recently, it has been considered that the diverse

* Corresponding author. Fax: +55 31 3559 1680.
E-mail address: delana@nupeb.ufop.br (M. Lana).