

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Marcela Segatto do Carmo

**FERRAMENTAS MOLECULARES PARA A DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO
Trypanosoma cruzi: APLICAÇÃO EM ESTUDOS POPULACIONAIS DO PARASITO E
DA EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS CARDÍACA**

Belo Horizonte, 2013

Marcela Segatto do Carmo

**FERRAMENTAS MOLECULARES PARA A DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO
Trypanosoma cruzi: APLICAÇÃO EM ESTUDOS POPULACIONAIS DO PARASITO E
DA EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS CARDÍACA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências com ênfase em Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Mara Macedo

Belo Horizonte, 2013

Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância.

(John F. Kennedy)

AGRADECIMENTOS

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota (Madre Teresa de Calcutá).

Gostaria de agradecer a todos que fizeram parte deste trabalho, direta ou indiretamente. Vocês, certamente, contribuíram mais do que com uma gota para realização deste projeto.

À Andréa Macedo minha orientadora, por te me recebido e acolhido em seu laboratório, e a mim confiado muitas tarefas. Pessoa e cientista admirável, com quem eu muito aprendi nesses quatro anos.

Aos pacientes que fizeram parte deste projeto. Sem dúvida alguma o sofrimento de vocês não pode, por mim, ser mensurado. Mas eu experimentava um misto de tristeza e alegria a cada resultado positivo obtido. Tenham certeza que fiz meu máximo para contribuir com diagnóstico confiável e rápido, na tentativa de propiciar um pouco de alívio a vocês.

Aos médicos do HC da UFMG colaboradores deste trabalho. Dr. Geraldo Brasileiro Filho que além de suas estimadas sugestões, me acalmou em vários momentos e esteve sempre pronto a contribuir. Dra Maria da Consolação V. Moreira e Dr. Sílvio Amadeu, médicos responsáveis pela triagem e acompanhamento dos pacientes transplantados cardíacos, que a dedicação de vocês aos pacientes sirva de exemplo para todos os outros profissionais do Sistema Único de Saúde. Dr. Cláudio Gelape e Lucas Lodi, responsáveis pela cirurgia e hemodinâmica, respectivamente. A contribuição de vocês foi indispensável para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Égler e todos os integrantes de seu laboratório: os técnicos Orlando e Afonso e as alunas Daniella e Fabiana. Pelas conversas, hemoculturas, intercâmbio de reagentes e pelos sábios ensinamentos.

Aos demais professores do Laboratório de Genética e Bioquímica (LGB), Carlos Renato Machado, Glória Franco e Sérgio Pena, pelos valiosos ensinamentos e discussões nas reuniões de laboratório.

Aos amigos do LGB, em especial aos orientados pela Profa. Andréa: Helder, Claudiney, Rodrigo, Denise, Ítalo, Viviane, Joice, Isabella e Tiago. Pela harmoniosa convivência, pelos enormes e recíprocos favores, pelas experiências e por todo aprendizado compartilhados ao longo desses anos.

À amiga-irmã Priscila Grynberg e sua família. Pelas terapias de grupo, pela acessoria computacional, por ser solícita e estar sempre pronta a ouvir, discutir e consolar, pelas infinitas caronas e hospedagens. Sem o convívio familiar de vocês tudo teria sido mais difícil.

À Ana Paula que ouvia as lamentações e as agonias da minha vida científica até em casa. Pela amizade, pelo companheirismo, pela simplicidade cativante, pelas palavras de conforto que você sempre tem pra dar.

As amigas adquiridas ao longo do doutorado: Mainá, Dani Durso, Marcela D., Marina e Neuzinha. Pela amizade sincera, pela agradável companhia e pelos momentos de descontração que estivemos juntas. Sempre foi muito prazeroso conviver com vocês.

Aos funcionários da secretaria da Pós, em especial à Celise, que sempre foram muito cordiais e prestativos.

A minha família, mamãe, Renata, Felipe e vovó, que mesmo sem entender direito o que eu faço me apoiam incondicionalmente. Vocês são meu porto seguro.

Ao Vinícius, a melhor parte desse doutorado, que o destino se encarregou de me apresentar em BH. Por todo amor, paciência, ensinamentos, pela cumplicidade na vida e na ciência, pela sintonia em geral. Além de uma tese, agora teremos a história de uma vida inteira pra contar.

À Capes pelo suporte financeiro.

À Deus pela saúde e disposição que me levam a seguir a diante.

RESUMO

A doença de Chagas ainda é responsável por altos índices de mortalidade e morbidade na América Latina. O *Trypanosoma cruzi*, seu agente etiológico é uma espécie muito polimórfica tendo sido recentemente classificada em seis linhagens ou DTUs principais (Tcl-VI). Os aspectos epidemiológicos associados aos diferentes DTUs ainda não estão bem definidos, mas já há evidências de associação com a distribuição geográfica, ciclos de transmissão e aspectos clínicos da doença. Todavia, mais de um século após a descoberta da doença de Chagas, muitas questões ainda precisam ser esclarecidas acerca de sua patogênese, diagnóstico e tratamento. Os esforços do nosso grupo de pesquisa têm sido focados no desenvolvimento de metodologias para a caracterização do *T. cruzi* e sua aplicação no estudo da epidemiologia molecular da doença de Chagas. Há alguns anos o grupo propôs o Modelo Histotrópico Clonal da doença de Chagas como uma tentativa para explicar a dificuldade de se demonstrar estreita correlação entre aspectos genéticos do parasito e características clínicas dos pacientes. Três aspectos constituem a base desse modelo: populações naturais de *T. cruzi* são multiclonais; clones distintos do parasito possuem tropismo tecidual diferencial; e métodos convencionais de análise implicam no crescimento *in vitro* das populações isoladas de parasitos, o que tende a favorecer o crescimento de alguns indivíduos. Neste trabalho procuramos desenvolver ou aperfeiçoar procedimentos moleculares que nos permitissem elucidar a complexidade de populações de *T. cruzi* tanto *in vitro* quanto aquelas presentes diretamente em tecidos de pacientes portadores da cardiopatia chagásica crônica grave. Para dissecar a complexidade de isolados de *T. cruzi*, nós adaptamos uma metodologia originalmente descrita para estudos genéticos de espermatozoides individuais, para separar e caracterizar células únicas dos parasitos. Esta abordagem permitiu-nos identificar completamente a complexidade de três isolados naturais de *T. cruzi* e estimar a contribuição relativa de cada subpopulação. Por exemplo, foi possível pela primeira vez identificar e quantificar a presença de clones similares a Be-62 dentro da Be-78, ambas isoladas da Berenice, primeira paciente de Carlos Chagas, portadora do “mal de Chagas”. Ademais, essa metodologia permitiu resolver de uma vez por todas as controvérsias sobre a questão de multiclonalidade X aneuploidia para populações de *T. cruzi*. Outro aspecto investigado foi a forma de reprodução do *T. cruzi*. Devido à escassez de evidências da sexualidade em *T. cruzi*, tem sido amplamente aceito que a reprodução do parasita é essencialmente clonal, com recombinação genética pouco frequente. Baseado em marcadores nucleares e mitocondriais e parâmetros de genética populacional, analisamos, em um trabalho colaborativo com dois outros alunos de doutorado dos programas de pós-graduação em Bioinformática e Parasitologia, dois grupos de isolados de *T. cruzi*: um proveniente de diferentes regiões da América Latina e outros obtidos exclusivamente de pacientes do Estado de Minas Gerais. Nossos resultados, ao contrário daqueles majoritariamente encontrados na literatura, não suportam uma estrutura de população essencialmente clonal para *T. cruzi*, ao menos para TcII coexistindo em uma mesma área geográfica, sugerindo que as trocas genéticas entre cepas estreitamente relacionadas geograficamente são mais frequentes do que inicialmente esperado. Quanto ao variável curso clínico da doença de Chagas, o envolvimento cardíaco é a manifestação mais grave e em geral a mais frequente. O transplante de coração (HTx) é uma das poucas alternativas para fase final da doença de Chagas crônica cardíaca (DCC), ainda assim a reativação da

infecção permanece como uma das principais complicações. Nos últimos seis anos, mais de 100 HTx foram realizados no hospital da UFMG e desses, cerca de 50% foram de pacientes que portadores de DCC. Após o HTx, os pacientes são submetidos a biópsias periódicas para monitorar rejeição do transplante e reativação da doença de Chagas e, em média 50% dos pacientes chagásicos transplantados desenvolvem reativação da infecção. Como as amastigotas raramente são encontradas nas análises histopatológicas das biópsias é muito difícil obter o diagnóstico diferencial entre o processo inflamatório resultante da rejeição do enxerto e de reativação da infecção. Para contornar essas limitações foi nosso objetivo desenvolver estratégias baseadas em PCR para a identificação e caracterização do DNA de *T. cruzi* em corações explantados, biópsias de acompanhamento e outros tecidos obtidos de pacientes transplantados. No total foram até agora analisados 42 pacientes, totalizando 430 amostras. DNA de *T. cruzi* foi detectado em 120 amostras. Em 57 amostras foi identificada a presença de TcII, um caso de TcVI, um caso parcialmente identificado como TcV ou TcVI, 27 como TcII ou TcVI, uma infecção mista de TcII + TcVI e três casos com TcI. Demonstramos pela primeira vez a presença de *T. cruzi* no tecido adiposo de pacientes com DCC, sugerindo que este possa funcionar como um dos tecidos reservatórios de parasitos, contribuindo para a reativação da doença. Ainda, além das reações para genotipagem, a caracterização da diversidade genética das populações de *T. cruzi* presentes nos tecidos dos pacientes foi feita por LSSP-PCR. O polimorfismo nas assinaturas de kDNA foi demonstrado entre os parasitos de diferentes pacientes e até mesmo em diferentes secções cardíacas de um mesmo paciente, denotando a presença de mais de um clone de *T. cruzi* infectando simultaneamente um mesmo paciente. A técnica de LSSP-PCR tem sido muito utilizada para o estudo da diversidade genética de *T. cruzi*, mas após um levantamento da literatura observamos que iniciadores diferentes tem sido utilizados nas análises de polimorfismo do kDNA de *T. cruzi*, embora publicados com nomes semelhantes. Para avaliar o impacto da sequência do iniciador sobre os perfis obtidos por LSSP-PCR nós comparamos a impressão digital do kDNA de três cepas de referência de *T. cruzi* usando oito iniciadores diferentes. Os resultados mostraram claramente que mesmo pequenas modificações na sequência de oligonucleotídeos podem alterar significativamente a assinatura de kDNA de uma cepa. Finalmente, em um estudo retrospectivo e cego com nove pacientes, seis que já haviam apresentado reativação da infecção e três que até dois anos após o transplante não reativaram, demonstramos que a estratégia de diagnóstico molecular proposta neste trabalho é adequada para diferenciar precocemente casos de reativação da infecção. Resultados positivos foram detectados já nas primeiras biópsias de acompanhamento, antecedendo de 1-18 meses a reativação clínica. Esses resultados indicam que a utilização de PCR para os alvos de minicírculos e rDNA 24S α é uma boa estratégia para o diagnóstico precoce da reativação da infecção pelo *T. cruzi*, com potencial para auxiliar os médicos nas decisões de tratamento antes do início da reativação clínica da doença de Chagas.

ABSTRACT

Chagas disease is still responsible for high morbidity and mortality rates in Latin America. *Trypanosoma cruzi*, its etiological agent, is a very polymorphic species and has recently been classified into six major lineages or DTUs (TcI-VI). The epidemiological features associated with different DTUs are not well defined, but there is already evidence of association with their geographical distribution, transmission cycles and clinical aspects of the disease. However, more than a century after the discovery of Chagas disease, many questions still need to be clarified regarding its pathogenesis, diagnosis and treatment. The efforts of our research group have been focused on the development of methodologies for the characterization of *T. cruzi* and its application in the study of molecular epidemiology of Chagas disease. A few years ago we proposed the Clonal Histotropic Model of Chagas disease in attempt to explain difficulties in demonstrating tight correlation between genetic aspects of the parasite and the clinical outcome of patients. Three aspects constitute the basis of this model: natural populations of *T. cruzi* are multiclonal; distinct parasite clones have differential tissue tropisms, and conventional methods of analysis imply the *in vitro* growth of isolated parasite populations, which may favor growth of some individuals. In this work we intended to develop or optimize molecular procedures to elucidate the complexity of *T. cruzi* populations both *in vitro* and those directly present in tissues of patients whelming severe chronic Chagas heart disease. To dissect the complexity of *T. cruzi* isolates, we adapted a method originally described for analyzing single spermatozoids, to sort and to characterize the parasite single cells. This approach allowed us to completely identify the complexity of three natural *T. cruzi* isolates and to estimate the relative contribution of each subpopulation. For example, it was possible, for the first time, to identify and quantify the presence of clones similar to Be-62 inside the Be-78 strain, both isolated from Berenice, Carlos Chagas first patient carrier of "Chagas malady". Furthermore, this methodology has settled the controversy regarding multiclonality X aneuploidy for *T. cruzi* populations. Another aspect investigated was the *T. cruzi* reproduction mode. Due to the lack of evidence of sexuality in *T. cruzi*, it has been widely accepted that the parasite's reproduction is essentially clonal with infrequent genetic recombination. Based on nuclear and mitochondrial markers and population genetic parameters, we analyzed, in a collaborative work with two other students from the Bioinformatics and Parasitology PhD programs, two groups of *T. cruzi* isolates: one from different regions of Latin America and other obtained exclusively from patients belonging to the state of Minas Gerais. Our results, unlike those generally found in literature, does not support an essentially clonal population structure for *T. cruzi*, at least for TcII coexisting in the same geographic area, suggesting that genetic exchange between geographically closely related strains are more frequent than initially expected. Regarding the variable clinical course of Chagas disease, cardiac involvement is in general the most serious and frequent manifestation. Heart transplantation (HTx) is one of the few alternatives for end-stage chronic Chagas heart disease (CHD), yet the reactivation of the infection remains a major complication. In the last six years, more than 100 HTx were carried out in the UFMG hospital and of those, about 50% of patients were suffering from CHD. After HTx, patients undergo periodic biopsies to monitor transplant rejection and reactivation of Chagas disease and on average 50% of the transplanted patients develop reactivation of the infection. As amastigotes are rarely found in

histopathological analyses of the biopsies is very difficult to get differential diagnosis between the inflammatory process resulting from allograft rejection and infection reactivation. To overcome these limitations our aim was to develop PCR-based strategies for the identification and characterization of *T. cruzi* DNA in the explanted hearts, follow-up endomyocardial biopsies and other tissues obtained from the transplanted patients. A total of 42 patients were examined so far, totaling 430 samples. DNA of *T. cruzi* was detected in 120 samples. In 57 samples we found the presence of TcII, one case of TcVI, one case partially identified as TcV or TcVI, 27 as TcII or TcVI, one mixed infection of TcII + TcVI, and three samples with TcI. We demonstrated for the first time the presence of *T. cruzi* in the adipose tissue of patients with CHD, suggesting that this tissue may be functioning as reservoir, which contributes to the recrudescence of infection. Besides the genotyping, the characterization of the genetic diversity of *T. cruzi* populations presented in the patients' tissues was made by LSSP-PCR. We found polymorphisms in kDNA signatures among parasites from different patients and even in different cardiac sections of the same patient, indicating the presence of more than one *T. cruzi* clone simultaneously infecting the same patient. The LSSP-PCR technique has been widely used to study the genetic diversity of *T. cruzi*, but after a survey in the literature we found that different primers, although published with similar names, have been used for the polymorphism analyses of *T. cruzi* kDNA. To assess the impact of the primer sequence on the profiles obtained by LSSP-PCR we compared the kDNA fingerprint of three *T. cruzi* reference strains using eight different primers. The results clearly showed that even small changes in the oligonucleotides sequence could significantly alter the kDNA signature of a strain. Finally, in a retrospective and blinded study with nine patients, six who had already reactivated the infection and three that until two years after HTx have not experienced reactivation, we demonstrated that the molecular diagnosis strategy herein proposed is suitable for the early detection of infection reactivation. Positive results were detected within the first follow-up biopsies, preceding 1-18 months the clinical reactivation. These results indicate that the use of PCR targeting minicircles and rDNA 24S α is a good strategy to the early diagnosis of Chagas disease reactivation with potential to assist physicians in treatment decisions before onset of reactivation.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1.1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 2.1: Distribuição geográfica (aproximada) dos DTUs de <i>T. cruzi</i> nos ciclos doméstico e silvestre	46
Figura 3.1: Teorias sobre a origem dos DTUs de <i>T. cruzi</i>	71
Figura 4.1: Esquema do ensaio triplo utilizado para discriminar as seis linhagens principais de <i>T. cruzi</i> neste trabalho.....	106
Figura 4.2: Resultados representativos da amplificação do fragmento de 330 pb da região hipervariável do minicírculos de kDNA de <i>T. cruzi</i> diretamente dos tecidos dos pacientes.....	110
Figura 4.3: Resultados representativos das curvas de dissociação obtidas por PCR em tempo real do gene rDNA 24Sα diretamente dos tecidos dos pacientes	111
Figura 4.4: Padrões típicos de RFLP gerados a partir de produtos amplificados do gene mitocondrial COII diretamente dos tecidos dos pacientes depois da digestão com <i>AluI</i> em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata.....	116
Figura 4.5: Amplificação do espaçador intergênico dos gen33es miniexon pacientes.....	116
Figura 4.6: Perfis típicos de LSSP-PCR obtidos para os DNAs de <i>T. cruzi</i> presente em diferentes regiões cardíacas e tecidos de três pacientes.....	120
Figura 4.7: Diferenças nos perfis LSSP-PCR obtidos para o DNA de <i>T. cruzi</i> presente nos tecidos de diferentes pacientes.....	121
Quadro 4.1: Classificação funcional da insuficiência cardíaca de acordo com a <i>New York Heart Association</i> (NYHA).....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Indicações de transplante cardíaco	99
Tabela 4.2: Contraindicações absolutas e relativas para transplante cardíaco	100
Tabela 4.3: Sequências dos iniciadores utilizados neste trabalho	105
Tabela 4.4: Positividade de acordo com o método diagnóstico empregado	112
Tabela 4.5: Número de amostras positivas para o diagnóstico molecular de <i>T. cruzi</i> e porcentagem de positividade de acordo com a região cardíaca coletada	112
Tabela 4.6: Identificação de DTUs de <i>T. cruzi</i> em sangue e amostras de tecidos humanos	115
Tabela 5.1: Resultado das PCRs para diagnóstico de <i>T. cruzi</i> das seis primeiras biópsias endomiocárdicas realizadas após transplante de nove pacientes chagásicos	140
Tabela 5.2: Comparação da positividade das biópsias endomiocárdicas detectadas por PCR do kDNA e rDNA 24S α realizadas para os pacientes que reativaram clinicamente a doença de Chagas	141

LISTA DE PUBLICAÇÕES

PUBLICAÇÃO 1: Implications of <i>Trypanosoma cruzi</i> Intraspecific Diversity in the Pathogenesis of Chagas Disease	51
PUBLICAÇÃO 2: Evidence of Substantial Recombination Among <i>Trypanosoma cruzi</i> II Strains From Minas Gerais	77
PUBLICAÇÃO 3: Unequivocal Identification of Subpopulations in Putative Multiclonal <i>Trypanosoma cruzi</i> Strains by FACs Single Cell Sorting and Genotyping	87
PUBLICAÇÃO 4: Evidence for <i>Trypanosoma cruzi</i> in adipose tissue in human chronic Chagas disease	123
PUBLICAÇÃO 5: LSSP-PCR of <i>Trypanosoma cruzi</i> : how the single primer sequence affects the kDNA signature	127

LISTA DE ABREVIATURAS

BB: betabloqueador

COII: citocromo oxidase subunidade II

DCC: doença de Chagas cardíaca

DTUs: *discrete typing or taxonomic units*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorter*

HC: Hospital das Clínicas

HTx: transplante cardíaco

HW: Hardy-Weinberg

IFI: imunofluorescência indireta

ITS: espaçador intergênico

kDNA: DNA do cinetoplasto

LD: *linkage disequilibrium*

LSSP-PCR: *Low-stringency Single Specific Primer - Polymerase Chain Reaction*

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

rDNA: DNA ribossomal

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SL: *Spliced Leader*

SSP-PCR: *Simple Sequence Repeat anchored primer - PCR*

Tc: *T. cruzi*

TcBat : *T. cruzi* de morcego

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VO₂: consumo de oxigênio

VE/VCO₂: ventilação do dióxido de carbono

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE PUBLICAÇÕES	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
PREFÁCIO	xvi

CAPÍTULO 1 - Introdução

1.1. O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	19
1.2. Caracterização clínica da infecção chagásica humana	21
1.2.1. Fase aguda.....	21
1.2.2. Fase crônica.....	22
1.3. A variabilidade intraespecífica e linhagens filogenéticas em <i>T. cruzi</i>	24
1.4. Epidemiologia e implicações clínicas das linhagens de <i>T. cruzi</i>	26
1.5. Métodos diagnósticos da doença de Chagas	27
1.5.1. Diagnóstico parasitológico	27
1.5.2. Testes sorológicos	28
1.5.3. Exames histopatológicos	29
1.5.4. Diagnóstico molecular.....	29
1.6. Tratamento da doença de Chagas.....	30
1.6.1. Tratamento da doença de Chagas cardíaca crônica	31

CAPÍTULO 2 - A variabilidade intraespecífica das linhagens filogenéticas do *T. cruzi* e seu papel na patologia da doença de chagas

2.1. Classificação.....	34
2.2. Marcadores moleculares para o estudo da variabilidade em <i>T. cruzi</i>	35
2.2.1. Zimodemas ou Análises eletroforéticas de isoenzimas	35
2.2.2. Esquizodemas ou análises de tamanhos dos fragmentos de restrição do kDNA ...	36
2.2.3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) e Simple Sequence Repeat anchored primer PCR (SSR-PCR).....	36
2.2.4. Low-Stringency Single Specific Primer PCR (LSSP-PCR).....	37
2.2.5. Microssatélites	38
2.2.6. Polimorfismos dos genes miniexon e rDNA.....	39
2.2.7. Multilocus Sequence Typing (MLST)	40

2.3. Histórico da subdivisão da espécie <i>T. cruzi</i>	40
2.4. Genotipagem dos seis DTUs de <i>T. cruzi</i>	43
2.5. Epidemiologia e implicações clínicas das linhagens de <i>T. cruzi</i>	45
2.5.1. <i>T. cruzi</i> I	46
2.5.2. <i>T. cruzi</i> II, V e VI	47
2.5.3. <i>T. cruzi</i> III e IV	48
2.5.4. <i>T. cruzi</i> isolados de morcego (Tcbat).....	49
2.6. Publicação relacionada ao Capítulo.....	50

CAPÍTULO 3 - A estrutura populacional e filogenia do *T. cruzi*

3.1. Teoria da evolução clonal	69
3.2. A origem das cepas híbridas de <i>T. cruzi</i>	70
3.3. Evidência de recombinação entre cepas TcII provenientes de MG	72
3.4. Constituição Multiclinal de populações de <i>T. cruzi</i>	73
3.5. Publicações relacionadas ao capítulo.....	76

CAPÍTULO 4 - Diagnóstico molecular, genotipagem e estudo da variabilidade genética do *T. cruzi* presente em amostras de pacientes chagásicos cardiopatas transplantado

4.1. O transplante cardíaco	97
4.1.1. Avaliação do doador.....	97
4.1.2. O receptor – Indicações e contraindicações para o transplante cardíaco.....	98
4.1.3. Aspectos cirúrgicos do transplante cardíaco	100
4.2. Justificativa e objetivos.....	101
4.3. Material e Métodos	102
4.3.1. Pacientes e amostras	102
4.3.2. Preparação do DNA genômico do <i>T. cruzi</i>	104
4.3.3. Diagnóstico molecular de <i>T. cruzi</i>	104
4.3.3.1. PCR kDNA	104
4.3.3.2. PCR real time rDNA 24S α	105
4.3.4. Caracterização das subpopulações de <i>T. cruzi</i>	106
4.3.4.1. PCR-RFLP do gene mitocondrial citocromo oxidase II	107
4.3.4.2. Amplificação da região intergênica dos genes miniexon.....	107
4.3.4.3. Amplificação da região 3' do gene rDNA 24S α	107
4.3.5. Low-stringency Single Specific Primer Polymerase Chain Reaction (LSSP-PCR) ...	108
4.3.6. Análises estatísticas.....	108
4.4. Resultados e Discussão.....	109

4.4.1. Pacientes	109
4.4.2. Diagnóstico molecular de <i>T. cruzi</i>	110
4.4.3. Caracterização das subpopulações de <i>T. cruzi</i>	115
4.4.3.1. Determinação das linhagens de <i>T. cruzi</i>	115
4.4.3.2. Determinação da diversidade por LSSP-PCR	119
4.4.3.2.1. Aplicação do LSSP-PCR para estudo da variabilidade de <i>T. cruzi</i> presente nos tecidos dos pacientes	120
4.5. Publicações relacionadas ao capítulo	122
CAPÍTULO 5 - Utilização de estratégias de PCR para a identificação de DNA de <i>T. cruzi</i> nas biópsias de seguimento pós-transplante	
5.1. Reativação da doença de Chagas	135
5.1.1. Diagnóstico de reativação	136
5.1.2. Profilaxia e tratamento da reativação	136
5.2. Seguimento pós-transplante cardíaco - Biópsia endomiocárdica	137
5.3. Objetivo	138
5.4. Resultados e Discussão	138
CAPÍTULO 6 - Considerações finais	144
CAPÍTULO 7 – Referências Bibliográficas	153

PREFÁCIO

Os mecanismos patogênicos envolvidos na evolução diferencial da doença de Chagas são complexos e ainda não foram totalmente esclarecidos, mas tanto o parasito quanto o hospedeiro têm papel importante nesse desfecho. Por um lado é certo que o *Trypanosoma cruzi* desempenha um papel fundamental na patogenia durante as fases aguda e crônica da doença, mas ainda não se sabe por que alguns pacientes evoluem para as formas clínicas graves da doença de Chagas, enquanto outros permanecem na forma indeterminada. A cardiopatia chagásica é a manifestação clínica mais debilitante na fase crônica da doença, levando a perda funcional do coração ao longo dos anos. A ausência de tratamento curativo e a natureza progressiva da cardiopatia chagásica faz com que o transplante cardíaco seja em alguns casos a única alternativa para os pacientes. No entanto, a imunossupressão necessária ao controle da rejeição do transplante, configura um aspecto complicador para pacientes chagásicos, porquanto aumenta a chance de reativação da infecção. Ademais, fazer a distinção da inflamação de rejeição do transplante daquela resultante da reativação da doença de Chagas não é uma tarefa simples, visto que nem sempre o parasito é observado nos tecidos dos pacientes analisados pelas metodologias convencionais. Neste contexto, estratégias moleculares surgem como ferramentas promissoras para o diagnóstico diferencial e estudos de epidemiologia molecular da cardiopatia chagásica. Assim, o presente trabalho teve como objetivos gerais o desenvolvimento e aprimoramento de metodologias para o diagnóstico e a genotipagem do *T. cruzi* e sua aplicação no estudo da doença de Chagas cardíaca crônica, mais especificamente em pacientes transplantados.

Visando o seu melhor entendimento, o presente manuscrito foi organizado em capítulos.

O Capítulo 1 constitui uma introdução geral sobre a Doença de Chagas e seu agente etiológico. Neste capítulo são abordados também aspectos epidemiológicos, diagnóstico, tratamento e a problemática em torno das formas graves da doença de Chagas crônica com enfoque na forma cardíaca.

Os capítulos seguintes (Capítulos 2 a 5) foram estruturados com uma pequena introdução específica, abordando o estado da arte e as principais lacunas do conhecimento ainda não elucidadas, seguidos de dados obtidos durante a elaboração deste trabalho e as publicações resultantes, de acordo com cada um dos temas apresentados. Ao longo do texto,

para facilitar a sua identificação, referências a artigos desta autora e resultantes do presente trabalho são apresentados em negrito. Alguns destes manuscritos foram realizados em colaboração com outros alunos de pós-graduação. Nestes casos, menção especial a isto será adicionada.

O Capítulo 2 trata da variabilidade intraespecífica das linhagens filogenéticas em *T. cruzi* e seu papel na patogenia da doença de Chagas. Neste capítulo, foram compiladas informações sobre a evolução da classificação e nomenclatura do táxon, bem como dos métodos utilizados para a caracterização do parasito.

O Capítulo 3 aborda a estrutura populacional do *T. cruzi*. Sabe-se que a maioria das cepas naturais deste protozoário são multiclonais. No entanto, as estratégias utilizadas para a manutenção destes parasitos em laboratório tendem a diminuir a complexidade da cepa infectante. Outra discussão acerca da estrutura populacional do *T. cruzi* é a sua forma de reprodução. Ainda não está claro se sua reprodução é essencialmente clonal, como defendido desde 1990, ou se há recombinação significativa entre estes parasitos. Este tema vem sendo amplamente discutido na literatura corrente e os artigos anexados a este capítulo apresentam evidências de que ocorra mais sexo em *T. cruzi* do que o esperado e uma metodologia capaz de resolver as controvérsias sobre a questão da multiclonalidade.

Os pacientes chagásicos crônicos submetidos a transplante cardíaco no Hospital as Clínicas da UFMG são objeto de estudo dos Capítulos 4 e 5. No Capítulo 4 são apresentados os resultados do diagnóstico e genotipagem por técnicas de PCR diretamente no coração explantado destes pacientes. No Capítulo 5 são relatados o acompanhamento dos pacientes após o transplante e a busca por um diagnóstico precoce de reativação da doença de Chagas, utilizando-se ferramentas moleculares.

No Capítulo 6 são apresentadas considerações finais sobre os principais achados obtidos ao longo deste trabalho e as perspectivas resultantes.

CAPÍTULO 1 - Introdução

1.1. O *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

Em 1909, Carlos Chagas destacou-se ao descobrir o protozoário *Trypanosoma cruzi* e a tripanossomíase americana, conhecida como doença de Chagas. Já naquela época, a doença infecciosa foi descrita quanto ao patógeno, o vetor, os hospedeiros vertebrados, as manifestações clínicas, a patologia e a epidemiologia (Chagas, 1909).

Mais de um século após sua descoberta, esta enfermidade ainda representa uma ameaça para a saúde de milhões de pessoas nas Américas, sendo o encargo da doença o segundo maior entre as doenças tropicais negligenciadas (Coura and Dias, 2009; WHO, 2007). Estima-se que de 8 a 15 milhões de indivíduos em 18 países endêmicos da América Central e do Sul estão infectados, com cerca de aproximadamente 30 milhões de pessoas em situação de risco (Rassi et al., 2012; WHO, 2010). 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 terem sofrido progressiva e consistente queda ao longo destes 100 anos, 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 (Dias, 2001).

O *T. cruzi* é naturalmente transmitido aos seres humanos e outros hospedeiros suscetíveis, através do contato com as fezes de triatomíneos hematófagos infectado, também conhecido como barbeiro (Figura 1.1). A contaminação do vetor ocorre durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, o parasito ingere formas tripomastigotas sanguíneas que são conduzidas à porção anterior do estômago. Neste novo ambiente, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e no intestino começam a se multiplicar sucessivamente por divisão binária. No intestino posterior as formas epimastigotas iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicas. A contaminação de um hospedeiro vertebrado ocorre quando o barbeiro infectado pica o mamífero. Neste processo, o inseto geralmente defeca e urina, depositando sobre a pele ou mucosa do mamífero a forma tripomastigota metacíclica, que é a forma infectiva, porém não replicativa. A invasão do parasito ocorre quando o hospedeiro se coça, o que gera lesões da pele por onde o parasita pode penetrar ou quando ele entra em contato com a mucosa ou ainda com a própria ferida no local da picada.

Os tripomastigotas metacíclicos acessam a circulação sanguínea, aderindo e invadindo uma gama de células nucleadas como, por exemplo, macrófagos, células musculares e epiteliais. Inicialmente, a forma tripomastigota é fagocitada pelo macrófago, seguindo-se a formação do vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo parasitóforo, a forma tripomastigota se diferencia para a forma amastigota e ocorre a lise da membrana do vacúolo parasitóforo. No citoplasma, essa forma se multiplica por fissões binárias sucessivas, podendo tomar todo o citoplasma. Após as sucessivas divisões, as amastigotas iniciam sua diferenciação para a forma tripomastigota antes da célula hospedeira ser rompida pelo excesso de parasitos e a lise da célula hospedeira pode ocorrer antes da total diferenciação de amastigotas para tripomastigotas. No meio extracelular, os tripomastigotas e amastigotas podem infectar novas células (Teixeira et al., 2011).

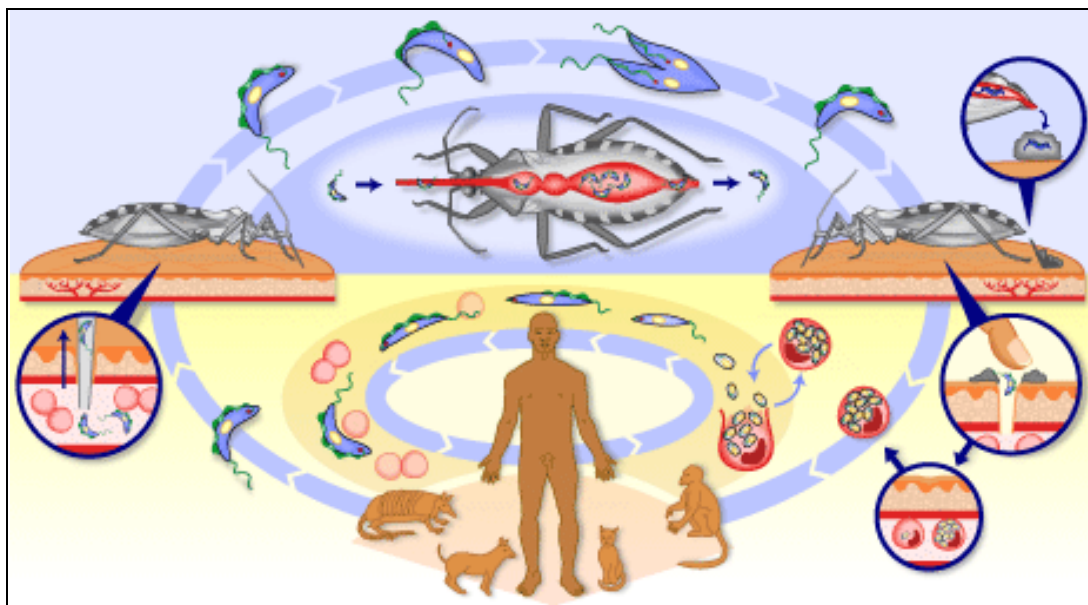


Figura 1.1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/life_cycle_trypanosoma/en/.

Desde 1990, uma série de iniciativas internacionais baseadas em controle vetorial, controle sistemático dos doadores de sangue e órgãos em todos os países endêmicos, detecção e tratamento da transmissão congênita foram lançadas a fim de controlar e eliminar a doença de Chagas. Embora com estas estratégias os programas de saúde pública nos países do Cone Sul tenham reduzido a transmissão em cerca de 70% (Moncayo and Silveira, 2009), as

transmissões por transfusão de sangue e transplante de órgãos em países não endêmicos (Rassi et al., 2009), a transmissão vertical em alguns países (Barona-Vilar et al., 2012; Gonzalez-Tome et al., 2013) e os surtos de transmissão via oral por ingestão de alimentos contaminados (Pereira et al., 2010; Rios et al., 2011) têm sido mais importantes no contexto da doença de Chagas atual.

Apesar dos inquestionáveis avanços no controle da transmissão vetorial e transfusional da infecção, cerca de 8 a 15 milhões de indivíduos permanecem infectados e 25-30% desses evoluem para formas mais graves da doença, levando à morte 14.000 indivíduos por ano (WHO, 2005). Além disso, a imigração de pessoas infectadas provenientes de países endêmicos está tornando a doença de Chagas um importante problema de saúde pública em outras regiões, incluindo Europa e os Estados Unidos (Dobarro et al., 2008; Rassi et al., 2010; Schmunis, 2007).

1.2. Caracterização clínica da infecção chagásica humana

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

1.2.1. Fase aguda

A fase inicial aguda apresenta intensidade e duração variáveis, na qual pode ocorrer exacerbada multiplicação do parasito e manifestações clínicas inespecíficas como febre, aumento do volume dos linfonodos, hepatoesplenomegalia, mialgia, sudorese e mal-estar; porém, a grande maioria dos indivíduos é assintomática. Outra evidência clínica importante desta fase da doença é a porta de entrada do parasito, denominada chagoma de inoculação no caso de lesão nodular da pele com reação inflamatória local, ou sinal de Romana, para a manifestação ocular, com edema bupalpebral unilateral e enfartamento ganglionar. Em determinadas situações, durante a fase aguda, especialmente as crianças, podem desenvolver sintomas graves cardíacos, digestivos e/ou neurológicos (Teixeira et al., 2006a).

O diagnóstico nesta fase é estabelecido em menos de 10% dos casos, provavelmente devido aos sintomas serem leves. Os achados laboratoriais são inespecíficos e incluem

leucocitose com um aumento absoluto na contagem de linfócitos (Dias and Kloetzel, 1968). Os testes sorológicos para infecção do *T. cruzi* são geralmente negativos durante as primeiras semanas, os parasitos circulantes, porém, podem ser detectados ao exame direto do sangue e xenodiagnóstico num período de um a dois meses. O eletrocardiograma pode mostrar baixa tensão, mudanças difusas no segmento ST-T e diferentes anormalidades de condução. Em mais de 95% dos pacientes ocorre recuperação espontânea dos sintomas num período de alguns meses. A mortalidade nessa fase geralmente ocorre secundária à miocardite (Punukollu et al., 2007).

1.2.2. Fase crônica

A maioria dos indivíduos sobrevive à fase aguda e evolui para a fase crônica, permanecendo infectados por toda a vida. A fase crônica da doença de Chagas pode ser assintomática ou apresentar manifestações cardíacas, digestivas e eventualmente, neurológicas. A forma assintomática ou indeterminada da doença representa aproximadamente 60-70% dos casos; os pacientes podem sobreviver sem qualquer manifestação clínica ou evoluírem para uma das formas clínicas da fase crônica em até 20 anos após o primeiro contato com o parasito (Rassi et al., 1992).

Durante a fase indeterminada, os pacientes apresentam sorologia positiva e nenhum sinal ou evidência clínica do envolvimento de órgãos (Dias, 1989). No entanto, praticamente todos os pacientes na fase latente tem um nível subclínico de envolvimento cardíaco quando avaliados com monitoramento por Holter e ecocardiograma (Barretto and Ianni, 1995). Ainda, um número significativo de pacientes apresentam hemocultura e PCR positivos para DNA de *T. cruzi*, 39 e 95%, respectivamente (Volpato, 2013).

Com o passar dos anos, aproximadamente 30-40% dos pacientes chagásicos evoluem para uma das formas clínicas da fase crônica sintomática apresentando manifestações cardíacas, digestivas e eventualmente, neurológicas (Rassi et al., 1992). A expectativa média de vida para esses pacientes, que desenvolvem sintomas clínicos, diminui cerca de nove anos (Prata, 2001).

A forma digestiva é representada por alterações estruturais e funcionais do intestino e/ou esôfago com prevalência de aproximadamente a 5-10% (Coura et al., 1983a; Cunha-Neto and

Kalil, 1995). A manifestação mais comum dessa forma são os chamados megas: megaesôfago e/ou megacólon. O cólon de pacientes chagásicos está frequentemente comprometido, podendo haver dilatação de todo o órgão, embora, mais comumente, apenas a dilatação sigmóide seja observada (da Silveira et al., 2007). Pacientes com megaesôfago podem apresentar um aumento exagerado do órgão correspondendo à cerca de 30 vezes o seu peso normal, podendo reter por volta de 2 litros de fluido (Adad et al., 1991).

A forma cardíaca é a principal e mais severa manifestação clínica da doença de Chagas, e uma das maiores causas de miocardite no mundo (Feldman and Mac Namara, 2000). Os sintomas e sinais físicos de cardiopatia chagásica crônica surgem de insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolismo. Dor torácica atípica é comum nos pacientes com esta forma da doença. A insuficiência cardíaca de etiologia chagásica é normalmente biventricular e está associada com pior prognóstico e altas taxas de mortalidade quando comparada com insuficiência cardíaca de outras causas (Bestetti and Muccillo, 1997). A disfunção cardíaca pode ser sistólica ou diastólica, sendo que esta última já foi observada na ausência de disfunção sistólica regional ou global do ventrículo esquerdo (Sousa et al., 1988). Frequentemente, ao exame cardíaco estes pacientes apresentam impulso apical proeminente, murmúrios regurgitantes das valvas mitral e tricúspide e bloqueio de ramo direito. As arritmias cardíacas podem causar palpitações, tonturas, vertigens e síncope. Além disso, tonturas e síncope também podem ser causadas por bloqueio cardíaco completo. Disfunção autonômica resulta em anormalidades acentuadas da frequência cardíaca, especialmente bradicardia.

O eletrocardiograma revela frequentes batimentos atrial ou ventricular prematuros, taquicardia ventricular não sustentada, fibrilação atrial ou graus variados de bloqueio cardíaco. Embora a gravidade das arritmias ventriculares tenda a se correlacionar com o grau de disfunção cardíaca, taquicardia ventricular ou bloqueio cardíaco completo podem ser observados em pacientes com preservação global da função ventricular esquerda (Rassi Junior et al., 1995). A maioria desses pacientes tem envolvimento cardíaco grave, incluindo aneurisma do ventrículo, o que é um achado característico da cardiopatia chagásica (Rassi Junior et al., 1995). A morte súbita é uma complicação ocasional e tem sido relatada em pacientes previamente assintomáticos (Lopes et al., 1970; Rassi Junior et al., 1995), geralmente precipitada por exercício e pode ser causada por taquicardia ventricular ou fibrilação, assistolia ou bloqueio cardíaco completo (Bestetti et al., 1993; Mendoza et al., 1986).

Trombos podem se formar nas câmaras cardíacas, resultando em tromboembolismo sistêmico ou pulmonar. Em uma revisão de 1345 autópsias, a incidência de trombos cardíacos ou tromboembolismo foi de 44% e as câmaras cardíacas direita e esquerda foram igualmente afetadas (Samuel et al., 1983). Embolia pulmonar foi responsável por 14% das mortes, embora fenômenos tromboembólicos foram mais comuns na circulação sistêmica. Cardioembolismo é a causa mais comum de acidente vascular cerebral em pacientes com cardiomiopatia chagásica (Carod-Artal et al., 2005).

Em 2-5% dos pacientes infectados observa-se tanto o comprometimento cardíaco quanto digestivo caracterizando a forma cardiodigestiva da doença. A forma nervosa, descrita por alguns autores, é rara e manifesta-se principalmente em pacientes imunossuprimidos (Cordova et al., 2010; Coura et al., 1983b; Cunha-Neto and Kalil, 1995; Py, 2011; Rassi et al., 1992; Vicco et al., 2012).

Embora ambas as formas graves da doença de Chagas, a cardíaca e a 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).

Ainda permanece inexplicável porque alguns pacientes evoluem para as diferentes formas clínicas da doença de Chagas, enquanto outros permanecem na forma indeterminada. Sabe-se, todavia, que tanto diferenças na resposta do hospedeiro à infecção, quanto à heterogeneidade genômica do *T. cruzi* estão envolvidas (Macedo and Pena, 1998). O pleomorfismo das manifestações da doença de Chagas vem, em parte, sendo atribuído à diversidade de cepas do *T. cruzi* desde 1911 pelo próprio Carlos Chagas (Chagas, 1911).

1.3. A variabilidade intraespecífica e linhagens filogenéticas em *T. cruzi*

O *T. cruzi* exibe elevado grau de polimorfismo intraespecífico, o que já foi demonstrado em diferentes níveis biológicos, bioquímicos e moleculares. Dentre os marcadores moleculares utilizados para estudar a variabilidade intraespecífica destacam-se a análise eletroforética de isoenzimas (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*); análises de tamanhos dos fragmentos de restrição das moléculas de minicírculos do kDNA (esquizodemas ou *RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism*); técnicas de impressões digitais de DNA; LSSP-PCR (*Low Stringency Single*

Primer - PCR), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); cariotipagem para detecção de polimorfismo. Ainda, ressalta-se a variabilidade observada nos perfis de microssatélites, genes de rDNA, de miniexon e mitocondriais, dentre outros (Morel et al., 1980; Pena et al., 1994; Simpson, 1987; Steindel et al., 1993; Tibayrenc et al., 1993; Vago et al., 1996b).

Até bem pouco tempo, de acordo com o marcador molecular utilizado uma nomenclatura criativa era atribuída ao parasito, refletindo a biologia complexa deste organismo. Na literatura podem-se encontrar os subgrupos de *T. cruzi* divididos em: biodemas, zimodemas, esquizodemas, cepas, clones, *clonets*, linhagens, clados, haplótipos, haplogrupos, *discrete typing or taxonomic units* (DTUs), dentre outros (Andrade, 1974; Andrade and Magalhaes, 1996; Brisse et al., 2000; Clark and Pung, 1994; Melo and Brener, 1978; Miles et al., 1978; Miles et al., 1977; Morel et al., 1980; Souto et al., 1996; Tibayrenc et al., 1986b).

Somente em 2009, durante o simpósio comemorativo do centenário da descoberta da doença de Chagas foi consensualmente oficializada a subdivisão da espécie *T. cruzi* em seis linhagens principais ou DTUs (TcI - VI) (Zingales et al., 2009).

Entretanto, nenhum marcador individual permite a resolução completa das seis linhagens. Assim, para efetivamente padronizar a caracterização de *T. cruzi*, um esquema simples e reprodutível para tipagem dos isolados em seus respectivos DTUs é necessária. Brisse e colaboradores (2001) foram os primeiros a propor um sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR) capaz de classificar os DTUs baseado no polimorfismo de amplificação de regiões dos genes miniexon, 24S α rDNA (Souto et al., 1996) e 18S rDNA (Clark and Pung, 1994). No entanto, alguns resultados basearam-se na ausência e não na presença de bandas, o que não é recomendado para um método padrão ouro de tipagem.

Até o momento, uma grande diversidade de esquemas baseados em técnicas moleculares vem sendo utilizada por diferentes laboratórios na caracterização de populações e linhagens principais de *T. cruzi* (Burgos et al., 2007; Burgos et al., 2010b; D'Avila et al., 2009; Lewis et al., 2009b; Macedo and Segatto, 2010; Rozas et al., 2007; Zingales et al., 2012). Todavia, ainda não existe um consenso sobre quantos e quais marcadores devem ser utilizados para que se tenha uma classificação mais homogênea e adequada dos isolados. Além disso, a maioria das estratégias requer quantidades elevadas de DNA dos parasitos, que somente estão disponíveis a partir de cepas cultivadas em laboratório. Esse tipo de análise pode subestimar a diversidade dos parasitos em tecidos de pacientes, que, em muitos casos, são constituídos por

vários clones pertencentes a diferentes DTUs e que podem apresentar diferentes tropismos teciduais diferentes capacidades de crescimento em meio de cultura (Burgos et al., 2010b; Macedo and Pena, 1998).

1.4. Epidemiologia e implicações clínicas das linhagens de *T. cruzi*

Uma das questões mais intrigantes na doença de Chagas relaciona-se à variação na prevalência e severidade das diferentes formas clínicas dessa infecção em diversas regiões da América Latina (Prata, 2001). As causas desta heterogeneidade epidemiológica e patológica não estão esclarecidas, mas um papel da diversidade genética de populações do *T. cruzi* e outros fatores associados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro são aventados (Andrade et al., 1999; 2002; Gomes et al., 2003; Macedo et al., 2004; Macedo and Pena, 1998; Miles et al., 1977).

Em alguns países, como o Panamá e a Venezuela, a infecção chagásica se manifesta exclusivamente na forma cardíaca. No Brasil, Argentina e Chile, as manifestações clínicas são bastante variadas (Atias, 1969; Coura et al., 1983a; Guevara et al., 1977; Mijares, 1965; Minoprio, 1966). Na Bahia, predomina a forma cardíaca; em Goiás, a forma digestiva e no estado de Minas Gerais, observa-se elevada frequência de formas mistas (cardíaca e digestiva). No Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, a maioria dos pacientes chagásicos é assintomática, mas neste último estado há grande percentagem de casos de transmissão congênita se comparados com aquela observada em Minas Gerais (Coura et al., 1983a; Valadares, 2007).

Estudos epidemiológicos demonstram que a linhagem TcII é muito mais frequentemente associada à doença de Chagas do que a linhagem *T. cruzi* I, pelo menos em países como Brasil, Chile e Argentina. Nestas regiões, casos de infecção de seres humanos por TcI são raros e normalmente assintomáticos (Briones et al., 1999; Zingales et al., 1998). Em contraste, TcI foi inicialmente identificada como única linhagem associada com a doença de Chagas humana em países como Colômbia, México, Panamá e Peru, mesmo em casos sintomáticos (Anez et al., 2004; Coura et al., 2002; Higo et al., 2004; Montilla et al., 2002; Teixeira et al., 2006b). Todavia, foi demonstrado recentemente que TcII está presente em pelo menos 10% das amostras de sangue e 25% de corações e esôfagos de indivíduos chagásicos na Colômbia, sugerindo que parasitos desta linhagem possam ter papel fundamental na morbidade e epidemiologia da doença também nesta região (Zafra et al., 2010; Zafra et al., 2008).

As cepas TcV e TcVI, por sua vez, vêm recebendo cada vez mais a atenção de investigadores, principalmente pela sua relevância clínica crescente, uma vez que pelo menos parte destas populações parece estar envolvida tanto em casos clínicos na Argentina e Bolívia, como em casos de transmissão congênita da infecção (Apt et al., 2010; Burgos et al., 2007; Valadares, 2007). Recentemente detectamos a presença de TcVI em tecido adiposo obtido de biópsias de pacientes submetidos a cirurgias para implantes de marca-passos (Ferreira et al., 2011).

Já em relação às linhagens TcIII e IV, pouco se conhece sobre estas populações. Não é sabida a real importância médica destas, embora TcIV seja apontada como a segunda linhagem mais frequente em casos humanos na Venezuela e haja a suspeita de eventual associação de TcIV com surtos de infecção oral na região amazônica brasileira (revisto por **Macedo and Segatto, 2010**).

1.5. Métodos diagnósticos da doença de Chagas

1.5.1. Diagnóstico parasitológico

Dentre as diversas técnicas, a mais simples é a da microscopia direta sobre gota fresca de sangue, examinada entre lâmina e lamínula. Também pode usar-se a técnica de gota espessa corada, como empregada para malária, mas que é bem menos sensível que o exame a fresco (Luquetti and Rassi, 2000; Siqueira-Batista et al., 1996). Na fase aguda, caso os exames diretos sejam negativos, devem ser usados métodos de concentração, tais como micro-hematócrito (centrifugação e exame do creme leucocitário) ou teste de Strout (centrifugação do soro após retirada do coágulo). Esses testes apresentam 80 a 90% de sensibilidade e são recomendados quando houver forte suspeita de doença de Chagas aguda e o teste direto a fresco resultar negativo. Em casos com presença de sintomas por mais de 30 dias, métodos de concentração devem ser a primeira escolha, devido ao declínio da parasitemia com o decorrer do tempo (Brasil, 2005).

Métodos parasitológicos indiretos são técnicas muito pouco disponíveis nos serviços comuns de atendimento médico, geralmente reservando-se a centros de referência e órgãos de pesquisa. Baseiam-se na amplificação do número de parasitos proveniente do material colhido (sangue ou líquido), em passagens por triatomíneos (“xenodiagnóstico”), meios de cultivo

(hemoculturas) ou animais sensíveis de laboratório (sub-inoculação). Via de regra esta amplificação ocorre entre 30 e 60 dias de incubação, principalmente no xenodiagnóstico e nas hemoculturas, sendo demonstrado o parasito por microscopia nas fezes dos triatomíneos, no meio de cultura ou no sangue e/ou tecidos dos animais inoculados (Luquetti and Rassi, 2000; Siqueira-Batista et al., 1996). Uma característica adicional importante para estas técnicas é que, na fase aguda, sua positividade costuma ser muito mais precoce (dez a quinze dias) e o número de parasitos é muito maior que na fase crônica o que tem sentido prático nas situações habituais. Na fase crônica, os métodos convencionais indiretos apresentam baixa sensibilidade, sendo que um exame negativo não afasta a possibilidade da infecção, mas um exame positivo tem valor diagnóstico absoluto (Dias, 1990).

1.5.2. Testes sorológicos

O diagnóstico da infecção crônica por *T. cruzi* é normalmente realizado com métodos que detectam anticorpos circulantes que se ligam a antígenos do parasito (Ferreira and de Avila, 1995). Atualmente, os testes mais utilizados baseiam-se na hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta (IFI), *Western blot* ou ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Estes testes têm sensibilidade e especificidade superiores a 90%. O diagnóstico na fase crônica é essencialmente sorológico e deve ser realizado utilizando-se um teste de elevada sensibilidade (ELISA com antígeno total ou IFI) em conjunto com outro de alta especificidade. A reação de fixação de complemento para doença de Chagas, anteriormente utilizada, tem sido abandonada, pois de uma forma geral, a sensibilidade do teste é baixa e a sua reprodutibilidade não satisfaz aos padrões atualmente exigidos (Ministério da Saúde, 2005).

Anticorpos que se ligam às formas tripomastigotas vivas em conjunto com o complemento numa reação *in vitro* foram associados a uma infecção ativa. Estes anticorpos líticos, detectados por meio de lise mediada por complemento, são produzidos após a infecção, mas não depois de ensaios de imunização com parasitas, e têm sido utilizados para avaliar a eficácia do tratamento na doença de Chagas (Cetron, 1993). O resultado negativo do teste é interpretado como ausência de parasitemia e cura (Galvao et al., 2003).

Mais recentemente, muitas proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos, extratos antigênicos brutos ou semipurificados de parasitas (a partir das fases epi, tripo ou amastigota)

utilizadas também em combinações, e várias moléculas do próprio parasita têm sido propostos como antígenos para alcançar a melhor sensibilidade e especificidade diagnóstica, mas, até hoje, nenhum antígeno tem sido aceito como o reagente para métodos sorológicos de referência em laboratórios clínicos (Lescure et al., 2010; Luquetti et al., 2003; Mateo et al., 2010; Umezawa et al., 2004).

1.5.3. Exames histopatológicos

Os exames histopatológicos não constituem rotina na prática corrente, mas podem ser úteis em algumas circunstâncias, inclusive como achados ocasionais de prospecção de casos clínicos de etiologia obscura. Trata-se da detecção do *T. cruzi* em biópsias geralmente praticadas em lesões dermatológicas em esclarecimento, em linfonodos infartados de pacientes febris ou em tecidos de pacientes suspeitos de reativação. A análise histopatológica convencional é feita através da coloração de Giemsa ou Hematoxilina/Eosina, ou por meio de imunohistoquímica específica para alguns antígenos do parasita. Resultados positivos correspondem ao achado de formas amastigotas do parasito no interior de células do sistema mononuclear fagocitário, geralmente ocorrendo infiltrado linfo-monocitário (Andrade, 2000; Dias, 1990; Rassi et al., 2000; Siqueira-Batista et al., 1996).

Já em necropsias esclarecedoras, nos casos de doença aguda geralmente são detectados o parasito e os infiltrados característicos ao nível do miocárdio, também eventualmente do sistema nervoso central (quando ocorre meningo-encefalite). Também podem detectar-se sinais ativos de comprometimento do sistema nervoso autônomo, principalmente ao nível do miocárdio e plexos intramurais do tubo digestivo, com destruição neuronal, ganglionite e periganglionite. Nos casos de suspeita de reativação da doença de Chagas em indivíduos imunossuprimidos, o parasito pode ser encontrado em lesões dermatológicas, no miocárdio e no sistema nervoso central (Andrade, 2000).

1.5.4. Diagnóstico molecular

A doença de Chagas pode ser diagnosticada com maior sensibilidade pela detecção de sequências específicas de DNA do *T. cruzi* (revisto por (Luquetti and Rassi, 2000)). O diagnóstico

molecular da doença de Chagas por PCR ou PCR acoplado à hibridização com sondas moleculares tem apresentado resultados extremamente promissores, permitindo que esta metodologia seja utilizada como teste confirmatório. Caso haja forte suspeita de fase aguda da doença de Chagas e os exames parasitológicos diretos anteriormente citados resultem negativos, o diagnóstico molecular pode ser associado a técnicas sorológicas para pesquisa de IgM (Brasil, 2005). Os dados da literatura mostram que a sensibilidade da PCR é superior à da hemocultura e do xenodiagnóstico (Gomes et al., 2009; Portela-Lindoso and Shikanai-Yasuda, 2003). O tópico diagnóstico molecular do *T. cruzi* será melhor abordado nos Capítulos 4 e 5.

1.6. Tratamento da doença de Chagas

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 (Bahia et al., 2012; Diniz et al., 2010; Urbina, 2009). 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 sanguínea ou acidental, e quando ocorre reativação da doença crônica durante condições de imunossupressão (Luquetti et al., 2005; Prata, 2001).

Na fase aguda, a quimioterapia antiparasita conduz a resultados negativos no teste de xenodiagnóstico em mais de 90% dos casos e em 80% dos testes sorológicos. No entanto, o papel da terapia antiparasitária na fase crônica da doença de Chagas não é clara e não há nenhuma evidência definitiva de que drogas tripanomicidas curam a doença cardíaca. Alguns ensaios clínicos já alocaram aleatoriamente pacientes com infecção crônica pelo *T. cruzi* sem sintomas cardíacos aos tratamentos tripanomicidas por pelo menos 30 dias em diferentes doses (Villar et al., 2002). Os desfechos relacionados ao parasito foram melhorados pela terapia administrada. No entanto, nenhuma mudança rígida de resultados clínicos foram relatados em qualquer destes ensaios (Mendez and Cowie, 2001).

Alguns autores, entretanto, acham prudente tratar pacientes com doença de Chagas crônica com a terapia antiparasitária, porque parasitemia persistente é um preditor independente de progressão da cardiopatia chagásica (Basquiera et al., 2003). Coura e Borges-

Pereira (2011) sugerem que a fase crônica da doença de Chagas deve ser tratada mais rigorosamente, com objetivo de eliminar o *T. cruzi* e evitar novos focos inflamatórios e a aumento das lesões teciduais, promover a regeneração tecidual para prevenir a fibrose, reverter a fibrose existente, prevenir cardiomiopatia, megaloesôfago e megacólon, e reduzir ou eliminar falência cardíaca e arritmias. Estes autores propõem novas estratégias para o tratamento quimioterápico da fase crônica da doença de Chagas com repetição de tratamentos de curto prazo por seis meses a um ano e combinações de drogas com diferentes mecanismos de ação, tal como benzonidazol + nifurtimox ou associação de uma destas drogas com alopurinol ou agentes antifúngicos triazólicos. Em outro estudo, crianças chagásicas tratadas com benzonidazol apresentaram uma redução significativa da parasitemia circulante, sendo o número de casos com PCR positiva no grupo de crianças tratadas com placebo 1,6 vezes maior que a do grupo tratado com o antiparasitário (Galvao et al., 2003).

Claramente, estudos randomizados e controlados são necessários para fornecer evidência experimental que apoie qualquer recomendação sobre o uso de terapia tripanomicida para melhorar os resultados clínicos na infecção crônica.

1.6.1. Tratamento da doença de Chagas cardíaca crônica

Como já mencionado ainda não há tratamento curativo para a doença de Chagas cardíaca crônica. A insuficiência cardíaca na doença de Chagas é tratada de uma forma semelhante à insuficiência cardíaca de outras causas; a terapia geralmente inclui β -bloqueadores, diuréticos, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ou bloqueadores dos receptores da angiotensina) e espironolactona (Khoury et al., 1996; Roberti et al., 1992). A dose máxima tolerada de inibidores da enzima conversora da angiotensina é geralmente menor em pacientes com insuficiência cardíaca chagásica do que para os pacientes com insuficiência cardíaca não chagásica, a razão disso poderia ser hipotensão arterial em pacientes com doença de Chagas cardíaca devido ao bloqueio progressivo de receptores alfa-adrenérgicos e o resultante prejuízo de reflexos posturais (Bestetti and Muccillo, 1997; Petkova et al., 2001). A cardiopatia congestiva chagásica também foi relatada ser o principal fator prognóstico de mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca de diferentes causas (Freitas et al., 2005).

Procedimentos paliativos, como a cardiomioplastia dinâmica e ventriculectomia parcial foram realizados em pequenos grupos de pacientes com insuficiência cardíaca intratável (Moreira et al., 1996). A eficácia destas intervenções para melhoria a longo prazo da qualidade de vida e da sobrevida ainda precisa ser definido. Quando a doença progride, o transplante cardíaco continua a ser uma das poucas e valiosas opções terapêuticas (Bocchi et al., 1996; Bocchi and Fiorelli, 2001b). No entanto, esta opção é limitada pelo pequeno número de doadores e as complicações decorrentes da terapia imunossupressora, incluindo a reativação da doença de Chagas.

Novas intervenções terapêuticas como o transplante de células têm emergido como um complemento à terapia padrão. Estudos pioneiros vêm sendo realizados em modelos murinos e em pacientes com cardiopatia chagásica crônica a fim de avaliar a segurança deste tratamento, que provou ser seguro e viável quando feita a injeção intracoronária de células mononucleares derivadas de medula óssea do próprio paciente (Freitas et al., 2005; Soares et al., 2004; Vilas-Boas et al., 2006). No entanto, ainda não foi demonstrada melhoria significativa da função ventricular esquerda ou da qualidade de vida nesses pacientes (Ribeiro Dos Santos et al., 2012).

**CAPÍTULO 2 - A variabilidade intraespecífica das linhagens
filogenéticas do *T. cruzi* e seu papel na patologia da
doença de Chagas**

Como já mencionado, o *T. cruzi* exibe alto grau de polimorfismo intraespecífico, incluindo desde aspectos morfológicos (formas delgadas, largas e intermediárias, já observadas por Carlos Chagas em 1909); diferentes graus de virulência para animais experimentais e humanos; diferentes taxas de crescimento e mortalidade; variações na sensibilidade às drogas; tropismo tissular (Andrade et al., 2010; Andrade, 1974; Andrade et al., 1985; Brener, 1980; Filardi and Brener, 1987). A variabilidade da espécie já foi demonstrada por métodos bioquímicos e até refinados marcadores moleculares descritos mais recentemente. Uma explicação para esta diversidade biológica reside no fato do *T. cruzi* ser um organismo diplóide que se multiplica predominantemente por divisão binária. Desta forma, o genoma de cada isolado evolui independentemente. Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre a classificação desta espécie, a descrição histórica de como evoluiu sua nomenclatura até os dias atuais e os métodos utilizados para a caracterização da diversidade do parasito.

2.1. Classificação

O *T. cruzi* é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae. A taxonomia mais comumente usada (Hoare, 1972) divide os tripanossomas de mamíferos em duas secções. A seção Salivaria compreende tripanossomas em que as formas infectantes são transmitidas pela saliva do inseto. A seção Stercoraria compreende espécies em que o ciclo de desenvolvimento no inseto vetor é finalizado no intestino grosso, e a transmissão ocorre através de contato com as formas infectantes presentes nas fezes. De acordo com esta taxonomia, a espécie *T. cruzi* é pertencente seção Stercoraria, subgênero *Schizotrypanum* (Hamilton and Stevens, 2011).

O subgênero *Schizotrypanum* inclui tripanossomas que são parasitos de uma gama diversificada de mamíferos, incluindo parasitos humanos: *T. cruzi* e *T. rangeli*, ambas espécies restritas ao Novo Mundo. Este subgênero também contém tripanossomas de hospedeiros quirópteros (morcegos) do Velho e do Novo (*T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii*, *T. vespertilionis*). Outros tripanossomas deste subgênero são *T. conorhini*, um tripanossoma de rato, dois tripanossomas de mamíferos terrestres africanos (Hamilton et al., 2009; Njiokou et al., 2004) e um tripanossoma de canguru australiano (Noyes et al., 1999; Stevens et al., 1999).

2.2. Marcadores moleculares para o estudo da variabilidade em *T. cruzi*

Dentre os marcadores moleculares utilizados para estudar a variabilidade intraespecífica de *T. cruzi* destacam-se a análise eletroforética de isoenzimas (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*); análises de tamanhos dos fragmentos de restrição das moléculas de minicírculos do kDNA (esquizodemas ou *RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism*); técnicas de impressões digitais de DNA; LSSP-PCR (*Low Stringency Single Primer - PCR*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); cariotipagem para detecção de polimorfismo. Ainda, ressalta-se a variabilidade observada nos perfis de microssatélites, genes de rDNA, de minixon e mitocondriais, dentre outros (Morel et al., 1980; Pena et al., 1994; Simpson, 1987; Steindel et al., 1993; Tibayrenc et al., 1993; Vago et al., 1996b).

2.2.1. Zimodemas ou Análises eletroforéticas de isoenzimas

O primeiro método molecular a demonstrar a extensa diversidade genética do *T. cruzi* foi a análise de variantes eletroforéticas de isoenzimas. Este procedimento envolve a eletroforese de extratos do parasito em gel de amido ou placas de acetato de celulose e colorações bioquímicas com substratos colorimétricos ou fluorescentes para as diferentes enzimas. Com base na variabilidade dos seis loci, Miles e cols propuseram a existência de três grupos principais chamados de zimodemas, Z1, Z2 e Z3 (Miles et al., 1978; Miles et al., 1977). Estudos epidemiológicos demonstraram que Z1 e Z3 estavam associados com o ciclo silvestre e Z2 com o ciclo doméstico de transmissão, pelo menos no Brasil. Posteriormente, Mendonça *et al.* (2002) analisando a diversidade genética entre isolados Z3 da região da Amazônia, através do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição para o RNA ribossomal, demonstraram uma dicotomia subdividindo este zimodema em Z3-A e Z3-B. Romanha *et al.* (1979; 1982), analisando um conjunto distinto de isoenzimas, identificaram quatro zimodemas (ZA, ZB, ZC e ZD).

Estudos subsequentes usando 15 isoenzimas em 121 amostras de *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 and Ayala, 1988; Tibayrenc et al., 1986a).

2.2.2. Esquizodemas ou análises de tamanhos dos fragmentos de restrição do kDNA

Os primeiros estudos sobre polimorfismos de DNA de *T. cruzi* foram publicados por Morel *et al.* (1980), que relatou sobre polimorfismos de fragmentos de restrição ou RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) de minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA). Todos os membros da ordem Kinetoplastidae são caracterizados por terem uma rede extranuclear de DNA dentro de uma única mitocôndria grande, o kDNA. Esta estrutura constitui 10-30% do DNA celular total e em *T. cruzi* compreende 5.000 a 20.000 minicírculos de 1,42 kb e 20-50 maxicírculos de 36 kb (Simpson, 1987). Cada minicírculo está organizado em quatro regiões altamente conservadas separadas por quatro regiões altamente variáveis (Degraeve *et al.*, 1988). A restrição de kDNA foi capaz de gerar padrões complexos de bandas de forma específica para cada cepa, chamados de esquizodemas (Morel *et al.*, 1980).

A técnica de RFLP, como inicialmente proposta, tem alguns inconvenientes. Depende de grande quantidade de DNA do parasito (10^8 células), o procedimento e a análise dos dados são muito trabalhosos. Com o advento da PCR, esta técnica foi simplificada. Através da amplificação do fragmento de 330pb, proveniente das regiões variáveis dos minicírculos do kDNA, seguida da digestão dos produtos com uma enzima de restrição, a técnica ficou conhecida como PCR-RFLP do kDNA, com a vantagem de requerer muito menos parasitos (Sturm *et al.*, 1989).

2.2.3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) e Simple Sequence Repeat anchored primer PCR (SSR-PCR)

A análise de polimorfismos do DNA amplificado aleatoriamente (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*) baseia-se na amplificação do DNA genômico com iniciador único, geralmente curto, de sequência arbitrária, sob baixas condições de stringência, gerando perfis complexos de bandas (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

Outra técnica menos utilizada, porém relacionada à RAPD é a PCR de repetições de sequências simples (SSP-PCR - *Simple Sequence Repeat anchored primer PCR*). Ambas as metodologias produzem padrões de bandas complexos e cepa específicos para diferentes populações de *T. cruzi* e se mostraram ferramentas úteis para o estabelecimento de relações genéticas entre os isolados, embora não tenham sido reveladas correlações com aspectos

clínicos da doença (Barnabe et al., 2000; Dias Neto et al., 1993; Oliveira et al., 1997; Steindel et al., 1993; Tibayrenc et al., 1993).

A RAPD foi amplamente utilizada para os estudos de taxonomia de *T. cruzi* e uma forte correlação entre a MLEE e os padrões de RAPD foram identificados (Revollo et al., 1998; Steindel et al., 1993; Tibayrenc et al., 1993). Além disso, os perfis de RAPD foram utilizados para corroborar na divisão taxônomica de *T. cruzi* nas principais linhagens (Souto et al., 1996; Tibayrenc, 1995).

A principal desvantagem do RAPD é que seus iniciadores, por serem inespecíficos, não podem ser utilizados para análises de material extraído diretamente dos tecidos infectados. Dessa forma a técnica não distingue entre o DNA do parasito e do hospedeiro.

2.2.4. Low-Stringency Single Specific Primer PCR (LSSP-PCR)

Em 1994, uma outra técnica, baseada na PCR, foi desenvolvida com a finalidade de detectar uma ou múltiplas mutações em um fragmento de DNA, a PCR de baixa estringência, utilizando um único iniciador, LSSP-PCR – *Low Stringency Single Specific Primer Polymerase Chain Reaction* (Pena et al., 1994). Essa metodologia foi utilizada por vários pesquisadores como ferramenta para estudar polimorfismos entre diferentes micro-organismos (Gomes et al., 1997; Lages-Silva et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Vago et al., 1996b; Villa et al., 1995). Na LSSP-PCR, amplifica-se inicialmente o segmento gênico que se deseja avaliar o polimorfismo. Este fragmento amplificado é purificado e submetido à nova PCR usando-se geralmente um dos iniciadores que o gerou, em condições de baixa estringência. Os amplicons produzidos na segunda PCR geram um perfil de bandas típico do fragmento em questão. Este perfil é tão complexo e individual que modificações em um único par de bases pode ser detectado.

Estudos posteriores, utilizando a estratégia LSSP-PCR permitiram a avaliação da variabilidade genética do kDNA de *T. cruzi*, através da amplificação do fragmento de 330pb, proveniente das regiões variáveis dos minicírculos. Os resultados obtidos produziram um padrão de bandas capaz de distinguir diferentes populações do parasito diretamente nos tecidos de animais e pacientes infectados (Vago et al., 1996b) (Andrade et al., 1999; Lages-Silva et al., 2006; Pena et al., 1994; Vago et al., 2000). Utilizando esta técnica, a ideia inicial de tropismo tecidual diferenciado desempenhando papel importante na patogênese da doença de

Chagas, proposta já em 1911 (Vianna, 1911), foi revitalizada pela demonstração de que os parasitos com diferentes perfis genéticos podem ser encontrados em tecidos distintos (esôfago e coração) de um mesmo paciente (Vago et al., 2000).

2.2.5. Microssatélites

Uma abordagem alternativa para caracterizar o *T. cruzi* diretamente em amostras biológicas surgiu com a descoberta de microssatélites polimórficos no genoma do parasito (Oliveira et al., 1998). Os microssatélites são sequências de DNA curtas, de 2 a 6 pb repetidas em *tandem*, que podem apresentar alto grau de polimorfismo fornecido por um número variável de unidade repetitivas (Henderson and Petes, 1992; Levinson and Gutman, 1987; Litt and Luty, 1989).

Estes marcadores evoluem rapidamente devido a sua maior taxa de mutação comparada à de outras regiões do genoma. Os microssatélites polimórficos representam 1% do genoma de *T. cruzi* e estão distribuídos ao longo dos cromossomos nucleares. Além disso, os microssatélites geralmente estão localizados em regiões não expressas do genoma nuclear do parasito, o que os torna insensíveis às pressões seletivas que podem ocorrer com outros marcadores clássicos. Ao contrário de outros marcadores, os microssatélites são marcadores *uni locus* e apresentam apenas uma cópia por genoma haplóide. Portanto, os microssatélites representam uma poderosa ferramenta para estudos populacionais mais refinados porque alelos presentes em cada cepa de *T. cruzi* podem ser exatamente determinados (Llewellyn et al., 2009a; Llewellyn et al., 2009b; Macedo et al., 2001; Oliveira et al., 1998; Oliveira et al., 1999).

Uma das aplicações mais interessantes desses marcadores polimórficos é determinar se a população de parasitos é mono ou policlonal (este tema será discutido mais detalhadamente no Capítulo 3). Populações monoclonais sempre apresentam um ou dois padrões de picos, indicando homo ou heterozigose para o respectivo *locus* de microssatélite. No entanto, cepas com padrão de amplificação consistente de três ou mais fragmentos de tamanhos diferentes correspondem a populações multiclonaes (Llewellyn et al., 2009b; Macedo et al., 2001; Oliveira et al., 1998).

2.2.6. Polimorfismos dos genes miniexon e rDNA

Os mRNAs de tripanosomatídeos são os únicos que são transcritos como unidade policistrônica e posteriormente separados em unidades monocistrônicas pela adição de uma sequência chamada spliced leader (SL) em sua extremidade 5'. (Borst, 1986). Esta sequência SL é codificada por genes denominados miniexon que existem em centenas de cópias em *tandem* no genoma do parasito (Ullu et al., 1996; Walder et al., 1986). O alinhamento comparativo de miniexons de cepas de *T. cruzi* diferentes mostra a presença de regiões altamente conservadas com 39 pb (éxons), regiões similares com identidade maior que 98% (íntrons), e regiões intergênicas divergentes ou ITS com similaridade menor que 59% (Murthy et al., 1992; Souto et al., 1996).

Em uma PCR multiplex desenvolvida por Souto *et al.* (1996), para amplificação do espaçador não transcrito do gene do miniexon, foi possível agrupar, inicialmente, as cepas de *T. cruzi* em dois grupos distintos de acordo com os produtos de amplificação. Assim, cepas que apresentaram produtos de 300 pb foram caracterizadas como pertencentes ao grupo 1 e as que apresentaram produtos de 350 pb foram caracterizadas como pertencentes ao grupo 2 (Souto et al., 1996). Análise subsequentes indicaram que algumas cepas correspondiam a um terceiro grupo caracterizado por inserção/deleção de 50 pb na região 5' do gene (Fernandes et al., 1998).

Outra característica peculiar dos tripanosomatídeos é a organização do rRNA. Tanto a subunidade maior, quanto a 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 sequências do gene rDNA 24S α de *T. cruzi* com outros tripanosomatídeos revelaram uma alta homologia entre as diferentes espécies avaliadas, exceto para uma região de aproximadamente 100 pb na extremidade 3' do gene de *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 grandes grupos: grupo 1, que apresenta o fragmento de 125 pb e o grupo 2, que apresenta o fragmento de 110 pb (Souto and Zingales, 1993). Com o aumento do número de amostras foi

observada a existência de um terceiro grupo de cepas que apresentava os dois fragmentos, sendo denominado grupo 1/2 (Souto et al., 1996). Posteriormente, utilizando metodologias mais sensíveis, foram identificados grupos adicionais de cepas com amplicons de 117/119 pb (Augusto-Pinto et al., 2003; Pimenta, 2002) e 120/130 pb (Brisse et al., 2001) para região divergente D7.

2.2.7. Multilocus Sequence Typing (MLST)

O *Multilocus Sequence Typing* (MLST) é um método utilizado para estudar estrutura populacional e a diversidade de patógenos (Bougnoux et al., 2003; Enright et al., 2001). A técnica envolve o sequenciamento do DNA de vários genes diferentes e comparação das sequências entre os isolados. Os dados de sequência de todos os *loci* são geralmente concatenados para produzir um perfil alélico exclusivo, com a vantagem serem facilmente acessíveis quando depositados em bases de dados internacionais como MLST.net (Aanensen and Spratt, 2005).

Um MLST específico para *T. cruzi* foi utilizado pela primeira vez por (Machado and Ayala, 2001) usando dois loci nucleares no estudo da recombinação genética em populações naturais do parasito. Essa abordagem agora está sendo expandida por outros alvos adicionais (Lewis et al., 2011; Subileau et al., 2009).

Recentemente, Yeo e cols (2011) demonstraram que a técnica permite distinguir as seis linhagens genéticas do *T. cruzi*, estabelece relações inter-DTUs e permite estudos de genética de populações em alta resolução. Nove genes de *T. cruzi* foram estudados, sendo um painel de quatro selecionados para genotipagem das linhagens e seis para estudos de diversidade genética. Os resultados deste trabalho demonstraram também subdivisões intra-DTUs e a presença de eventos de recombinação em *T. cruzi* (Yeo et al., 2011).

2.3. Histórico da subdivisão da espécie *T. cruzi*

Como já mencionado, *T. cruzi* é uma espécie polimórfica, e sua estrutura populacional global está longe de ser totalmente compreendida. A nomenclatura criativa atribuída ao

parasito reflete a biologia única deste organismo e é definida de acordo com os marcadores moleculares utilizados.

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 (Zingales et al., 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 , miniexon 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 , miniexon 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 Noia et al., 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 (Buscaglia and Di Noia, 2003; Coura et al., 2002; Teixeira et al., 2006b). 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 ocasião do encontro satélite (1999), nem todas as cepas de *T. cruzi* puderam ser devidamente agrupadas nas duas linhagens principais. Estas cepas por apresentarem características híbridas ou incongruentes permaneceram designadas somente como *T. cruzi*. Portanto, foi 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 (Anonymous, 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 de *T. cruzi* poderiam ser fracionadas em seis linhagens filogenéticas discretas referidas como DTUs I, IIa, IIb, IIc, II d 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 de *T. cruzi* I foram agrupadas em um único DTU denominado DTU I, enquanto as cepas de *T. cruzi* II foram agrupadas em um DTU heterogêneo (DTU II) subdividido em cinco sublinhagens filogenéticas (DTUs IIa-e). Cada uma destas sublinhagens foi representada por uma cepa de referência: CanIII cl1 (IIa), Esmeraldo cl3 (IIb), M5631 cl5 (IIc), MN cl2 (IIId) e CL Brener (IIe).

As cepas pertencentes ao DTU IIa e IIc são equivalentes ao Zimodema Z3 de Miles (1978) e suas respectivas subdivisões em A/B (Mendonca et al., 2002), as pertencentes a DTU IIb são as cepas classicamente tipadas como *T. cruzi* II e as cepas classificadas nas DTUs IIId 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 de *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 únicos de nucleotídeos (SNPs) dentro do gene de reparo de DNA MSH2 de *T. cruzi*, demonstraram a existência de três grupos de sequências diferentes, que denominaram MSH2a, MSH2b e MSH2c. Segundo os autores, a sequência 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 sequência diferente para este gene, MSH2c. Os autores sugeriram, então, a existência de três linhagens distintas na espécie *T. cruzi*. Freitas e cols (2006) propuseram, baseados em microssatélites, 24 S rDNA e polimorfismos no gene citocromo oxidase subunidade II (COII), que além de *T. cruzi* I e II, existiria uma terceira linhagem ancestral, chamada de *T. cruzi* III constituída por cepas pertencentes ao zimodema Z3 e correspondentes ao DTU IIc (Brisse et al., 2000; Brisse et al., 2001; Miles et al., 1978), e além destas um quarto grupo formado por cepas híbridas.

Alguns anos após o primeiro encontro, a nomenclatura proposta já não acompanhava mais a diversidade encontrada com diferentes marcadores moleculares, por diferentes grupos no mundo inteiro. Para tanto, foi acordado que deveria ocorrer uma segunda reunião satélite, um esforço para unificar a nomenclatura do *T. cruzi*. Somente em 2009, durante o simpósio comemorativo do centenário da descoberta da doença de Chagas foi consensualmente

oficializada a subdivisão da espécie *T. cruzi* em seis linhagens principais ou DTUs (Tcl - VI) (Zingales et al., 2009).

Entretanto, nenhum marcador individual permite a resolução completa das seis linhagens. E a confiança em um único alvo também é desaconselhável por causa do potencial de influência de troca genética (Zingales et al., 2012). Assim, para efetivamente padronizar a caracterização de *T. cruzi*, um esquema simples e reprodutível para tipagem dos isolados em seus respectivos DTUs é necessária.

2.4. Genotipagem dos seis DTUs de *T. cruzi*

Brisse e colaboradores (2001) foram os primeiros a propor um sistema de PCR capaz de classificar os DTUs baseado no polimorfismo de amplificação de regiões dos genes miniexon, 24S α rDNA (Souto et al., 1996) e 18S rDNA (Clark and Pung, 1994). No entanto, alguns resultados basearam-se na ausência e não na presença de bandas, o que não é recomendado para um método padrão ouro de tipagem.

Desde então, uma grande diversidade de esquemas baseados em técnicas moleculares vem sendo utilizada por diferentes laboratórios na caracterização de populações e linhagens principais de *T. cruzi*. (Burgos et al., 2007; D'Avila et al., 2009; Lewis et al., 2009b; Rozas et al., 2007).

A análise por PCR-RFLP do polimorfismo genético de 12 *loci* foi proposto por Rozas e cols para genotipagem dos DTUs (2007), diversos dos quais demonstraram diferenças inter-DTU. A combinação de um, dois ou três destes ensaios permitiram a identificação do conjunto completo de DTUs, mas a complexidade da análise e a baixa sensibilidade para aplicação direta em parasitos presentes em amostras biológicas, constituem as principais limitações dessa estratégia.

Uma estratégia de tipagem sequencial utilizando três marcadores foi sugerida por Lewis et al. (2009b) que consiste na amplificação por PCR do 24S α rDNA (Souto et al., 1996; Souto and Zingales, 1993) seguida de PCR-RFLP da proteína de choque térmico 60 (HSP60) e da glicose-6-fosfato isomerase (GPI) (Westenberger et al., 2005). A aplicação combinada dos três

marcadores foi suficiente para discriminar os seis DTUs em 45 das 48 cepas analisadas (Lewis et al., 2009b).

Outro ensaio de três passos é descrito por D'Avila *et al.* (2009). Inicialmente, as cepas são submetidas a PCR-RFLP do gene COII seguido por digestão com *AluI* (de Freitas et al., 2006), o que permite a discriminação de TcI e TcII das outras linhagens (TcIII a VI). A segunda etapa compreende uma PCR da região intergênica da sequência SL (Burgos et al., 2007) que quando aplicada a estas estirpes não classificadas, resulta em dois grupos distintos, um formado por TcIII e TcIV e outro por TcV e TcVI. O passo final consiste em uma PCR do gene rDNA 24Sα (Souto et al., 1996).

Um esquema baseado inicialmente em *nested* PCRs para amplificação de amostras biológicas e clínicas (Burgos et al., 2007; Burgos et al., 2010b; Cardinal et al., 2008; Marcet et al., 2006) vem sendo aprimorado para um sistema multiplex contendo quatro ensaios sequenciais de PCR em tempo real, utilizando sondas TaqMan (Duffy et al., 2009). Os marcadores dessas reações são fragmento nuclear A10 (Brisse et al., 2000; Burgos et al., 2007) e o espaçador intergênico dos genes de minixon (Souto et al., 1996).

Mais recentemente, uma abordagem baseada em *barcoding* utilizando fragmentos marcados com fluorescência que detecta produtos de PCR a partir de quatro domínios de rDNA foi desenvolvido (Hamilton et al., 2011). Esta técnica mostrou-se capaz de diferenciar muitas espécies de tripanossomas de mamíferos sul-americanos, inclusive Tcbat, no entanto, TcV e TcVI não puderam ser distinguidos de TcIII e TcII, respectivamente.

Outra estratégia que se mostrou eficaz na genotipagem do *T. cruzi* foi a MLST (Yeo et al., 2011). Este trabalho demonstra que a técnica permite discriminar os seis DTUs a partir do sequenciamento de quatro genes. O MLST vem sendo cotado, para um futuro próximo, como um dos prováveis padrão ouro para estudos populacionais por fornecer dados reproduzíveis e compartilháveis (Zingales et al., 2012).

Todavia, ainda foi estabelecido um consenso sobre quantos e quais marcadores devem ser utilizados para que se tenha uma classificação mais homogênea e adequada dos isolados. Assim como foi feita a padronização para a nomenclatura do *T. cruzi*, as estratégias de genotipagem devem ser melhoradas e padronizadas para comparação interlaboratorial e para melhor compreensão das implicações epidemiológicas dos DTUs.

2.5. Epidemiologia e implicações clínicas das linhagens de *T. cruzi*

A compreensão da estrutura populacional e filogenia do *T. cruzi* são fundamentais, visto que estas estão ligadas ao ciclo de transmissão e aspectos clínicos da doença. Os esforços para compreender a composição e estrutura genética das populações deste parasito são justificados por suas correlações com suas propriedades biológicas, incluindo a especificidade ao hospedeiro, distribuição geográfica e os achados clínicos da infecção. Embora nenhuma correlação global tenha sido claramente demonstrada, há muitos exemplos de associações locais entre a genética e a biologia do parasito (Campbell et al., 2004; Miles et al., 2009; Revollo et al., 1998).

É interessante notar que a distribuição geográfica das principais linhagens de *T. cruzi* relaciona-se muito bem com o grau de severidade da doença de Chagas. A linhagem *T. cruzi* I predomina nos EUA, América Central e países do norte da América do Sul. TcII, V e VI são relativamente mais abundantes no Cone Sul (Figura 2.1). TcIV é encontrado predominantemente do sul dos EUA até a Amazônia brasileira (Coura and De Castro, 2002; Martins et al., 2008), enquanto TcIII foi isolado em muitos países da América do Sul, especialmente na região Amazônica (Lewis et al., 2009b). A coincidência entre os dois gradientes levou à associação geral, mas não absoluta, de TcI com doença mais branda e transmissão no ciclo silvestre e de TcII, V e VI, e eventualmente TcIV, com doença mais grave e transmissão no ciclo doméstico (Fernandes et al., 1999; Miles et al., 2003; Miles et al., 1978; Souto et al., 1996). As exceções, no entanto, são comuns.

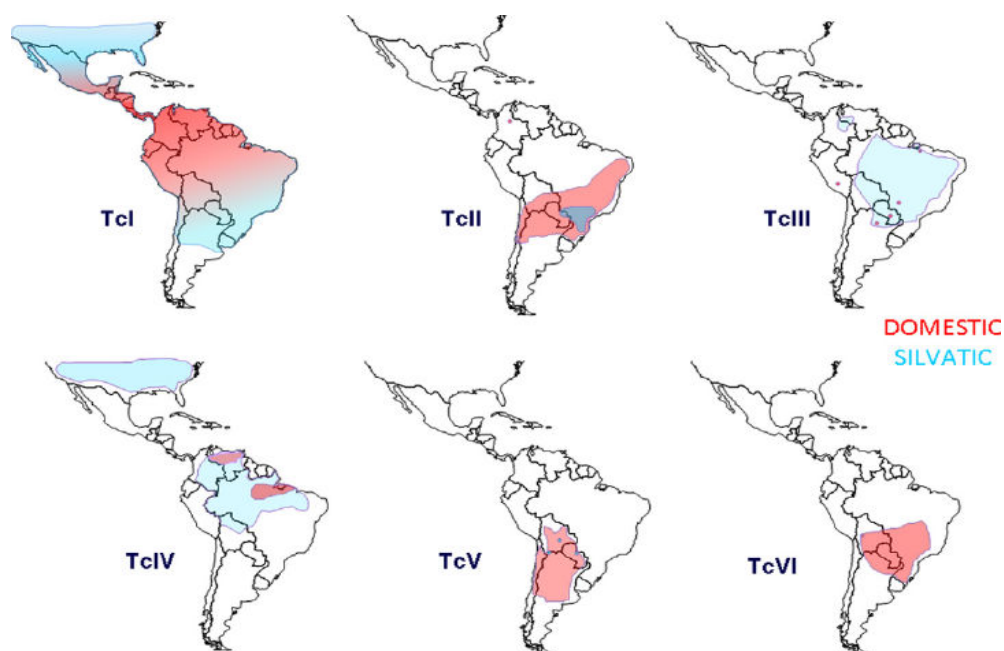


Figura 2.1: Distribuição geográfica (aproximada) dos DTUs de *T. cruzi* nos ciclos doméstico e silvestre (Fonte: Anonymous, 2012).

2.5.1. *T. cruzi* I

Nas Américas, TcI é a mais abundante e amplamente dispersa dentre todas as DTUs, sendo associada aos ciclos doméstico e silvestre. A infecção humana causada por TcI está concentrada na América Central e ao norte da América do Sul onde está associada à cardiopatia chagásica. A raridade de megaesôfago e megacólon nessas regiões tem sido atribuída à endemicidade predominante de TcI (Miles et al., 1981a). Além disso, casos de infecção humana crônica por cepas dessa linhagem são raras e geralmente assintomáticas em países do Cone Sul (Buscaglia and Di Noia, 2003; Coura and De Castro, 2002; Miles et al., 1981b).

TcI também está associado a casos agudos graves resultantes de surtos de transmissão oral e a incursão de roedores silvestres em casas (Coura, 2006; Dias et al., 2008; Luquetti et al., 1986; Shikanai-Yasuda et al., 1991; Steindel et al., 2008). Esta linhagem também está associada aos casos de reatização da doença de Chagas em indivíduos imunossuprimidos devido ao tratamento imunossupressor pós transplante de coração ou à infecção pelo vírus HIV. Curiosamente, nestes casos o TcI é frequentemente associado com complicações do sistema nervoso central e meningoencefalite (Anez et al., 2004; Burgos et al., 2008).

Tcl apresenta substancial heterogeneidade genética demonstrada inicialmente por isoenzimas (Tibayrenc et al., 1986a), e, posteriormente por outros métodos como a análise de cariótipo e hibridização com sondas para SL (Triana et al., 2006), RFLP (Jamarillo et al., 1999), LSSP-PCR (Rodriguez et al., 2009), MLEE e RAPD (Carrasco et al., 1996) e microssatélites (Llewellyn et al., 2009b; Oliveira et al., 1998). Heterogeneidade essa que é evidenciada até mesmo por estudos regionais localizados no México (Bosseno et al., 2002; Lopez-Olmos et al., 1998), Colômbia (Herrera et al., 2007; Herrera et al., 2009), Venezuela e Bolívia (Llewellyn et al., 2009b). Dessa forma, estudos atuais sugerem a subdivisão da linhagem em cinco haplótipos – Ia, Ib, Ic, Id e Ie (Cura et al., 2010; Falla et al., 2009). Resultados interessantes indicam que os haplótipos Ia e Ib são particularmente associados ao ciclo de transmissão doméstico/peridoméstico e infecção em seres humanos na Colômbia (Falla et al., 2009) e Venezuela (Llewellyn et al., 2009b). No entanto, essa subdivisão de Tcl não foi contemplada no último consenso da nomenclatura do táxon (Zingales et al., 2009). Para isto, estudos dirigidos à diversidade do Tcl devem ser projetados com uma hipótese específica em mente, biológica ou epidemiológica, e não ser realizada apenas para categorizar diversidade para interesse próprio (Zingales et al., 2012).

Apesar de uma predominância maior do que 90% de Tcl ter sido descrita para cepas isoladas de indivíduos infectados na Colômbia (Montilla et al., 2002; Widmer et al., 1985; Zafra et al., 2008), um aumento na detecção de TcII, III e V ocorreu neste país, especialmente quando foram utilizados métodos de tipagem diretamente em tecidos humanos infectados (Cuervo et al., 2002; Mantilla et al., 2010; Zafra et al., 2008). Esses dados indicam que a epidemiologia na Colômbia é muito mais complexa do que inicialmente previsto, com possíveis consequências sobre a patologia e a morbidade da doença.

2.5.2. *T. cruzi* II, V e VI

TcII é o principal agente da doença de Chagas na região Cone Sul da América do Sul, onde o *Triatoma infestans* é o principal vetor doméstico. TcV e TcVI são linhagens híbridas derivadas de eventos de hibridização entre TcII e TcIII, e assim como TcII, estas linhagens são extremamente raras no ciclo de transmissão silvestre (Zingales et al., 2009).

Casos severos da Doença de Chagas na América do Sul têm sido amplamente associados a TcII, especialmente no centro e sul do Brasil, onde as formas cardíacas, megacólon e megaesôfago são quase exclusivamente associados a esta linhagem (Freitas et al., 2005; Lages-Silva et al., 2006; Yeo et al., 2005). Não obstante, dados crescentes também implicam TcV e possivelmente TcVI como linhagens envolvidas nos infecções humanas na região do Gran Chaco e países vizinhos Bolívia, Chile, Norte da Argentina, e sul do Brasil (Cardinal et al., 2008; Diosque et al., 2003; Virreira et al., 2006b). Por exemplo, os casos de megacólon na Bolívia são predominantemente associados a TcV e em menor número a TcII (Virreira et al., 2006b).

Notavelmente, TcV está associado com a transmissão da doença de Chagas congênita na Argentina, Bolívia e no sul do Brasil (Corrales et al., 2009; Valadares, 2007; Virreira et al., 2006a; Virreira et al., 2007). A frequência de infecção congênita é muito maior (4%) em áreas onde predomina o TcV e relativamente raro (< 1%) em áreas de circulação de TcII (Valadares, 2007).

Alguns autores têm sugerido que TcVI também seja uma das principais linhagens associadas às formas graves da doença de Chagas no sul da América do Sul (Miles et al., 2009). No entanto, devido a sua estreita correlação genética e dependendo do método de tipagem utilizado, TcVI nem sempre pode ser distinguido de TcII e TcV (Burgos et al., 2007; Burgos et al., 2008; Campbell et al., 2004; Lewis et al., 2009a). Assim, ainda é difícil avaliar a contribuição específica dessa linhagem em infecções humanas.

2.5.3. *T. cruzi* III e IV

TcIII e IV estão principalmente associadas ao ciclo de transmissão silvestre. Estas linhagens estão distribuídas desde o sul dos EUA até a Argentina, sendo relativamente frequentes na região Amazônica (Clark and Pung, 1994; Coura and De Castro, 2002; Roellig et al., 2008). No entanto, a compreensão da distribuição geográfica específica de TcIII e IV é difícil pelo fato de que vários métodos de genotipagem não conseguem distinguir estas linhagens.

TcIII é raramente associada infecção humana, mas vem sendo encontrada em cães domésticos e triatomíneos no ambiente peridomiciliar no norte do Brasil (Câmara et al., 2010; Cardinal et al., 2008; Chapman et al., 1984; Marcili et al., 2009a). Recentemente, o TcIII foi identificado como agente de um surto de doença de Chagas ocorrido na Amazônia Brasileira em 2007 (Monteiro et al., 2010).

TcIV é a linhagem menos caracterizada dentre os seis DTUs. Tem sido associada como segundo agente mais frequente da doença de Chagas na Venezuela (Miles et al., 2009), mas poucas cepas foram isoladas de humanos. No entanto, TcIV foi responsável pelo primeiro surto registrado de casos agudos de doença de Chagas presumivelmente por transmissão oral em Canudos, Belém do Pará (Miles et al., 1978). Posteriormente, vários casos de transmissão oral foram registrados na região Amazônica e no Amapá (Coura and De Castro, 2002; Valente et al., 2009), possivelmente associados a essa linhagem.

2.5.4. *T. cruzi* isolados de morcego (Tcbat)

Morcegos brasileiros infectados com *T. cruzi* são encontrados desde a floresta Amazônica até em áreas urbanas das regiões Centro, Nordeste e Sudeste do Brasil (Marcili et al., 2009b). Até hoje, a maioria dos isolados de morcegos cultivados *in vitro* foram identificados como pertencentes ao subgênero *Schizotrypanum*. A identificação da espécie *T. cruzi* de morcegos requer uma análise cuidadosa, pois as espécies do subgênero *Schizotrypanum* são morfologicamente indistinguíveis (Hoare, 1972) e genericamente chamadas como *T. cruzi-like*. No entanto, o *T. cruzi* pode ser confirmado pela capacidade de infectar camundongos. Uma vez que as cepas de *T. cruzi* isoladas de mamíferos selvagens pode induzir parasitemias muito baixas nos camundongos, como é o caso para os isolados de morcego, as infecções devem ser avaliadas utilizando animais imunodeprimidos e métodos parasitológicos sensíveis tais como PCR.

A análise com marcadores SSU rDNA, gGAPDH e sequências de citocromo b permitiram a separação de *T. cruzi* dos outros tripanossomas que infectam morcegos brasileiros, incluindo *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii-like* e *T. rangeli* (Cavazzana et al., 2010; Maia da Silva et al., 2009; Marcili et al., 2009b). Tradicionais métodos de genotipagem baseadas nos marcadores SL (Fernandes et al., 2001) e LSU rDNA (Souto et al., 1996) classificaram quatro isolados de morcegos da Amazônia como *T. cruzi* I. No entanto, 11 isolados de morcego de outras regiões brasileiras renderam uma nova combinação de genótipos, com um padrão de SL TcII e um novo perfil LSU rDNA (Marcili et al., 2009b). Posteriormente, resultados obtidos com outros métodos corroboraram que este grupo de parasitos de morcego distingue-se dos seis DTUs conhecidos (Hamilton et al., 2011; Marcili et al., 2009b). Todas as análises filogenéticas, utilizando diferentes conjuntos de marcadores moleculares posicionaram esses isolados num cluster

distinto, mais próximo à linhagem TcI, mas claramente separado dos grupos formados pelos outros DTUs (Cavazzana et al., 2010; Marcili et al., 2009b). Este grupo de isolados ganhou o título provisório de 'Tcbat' e aguarda uma melhor caracterização para atribuição de um DTU definitivo, potencialmente como um sétimo DTU: TcVII (Marcili et al., 2009b).

TcBat, ao contrário dos seis DTUs, não se desenvolve em nenhuma das três espécies de vetor comumente criadas em laboratório: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*. O inseto vetor de Tcbat ainda é desconhecido. Assim, Tcbat é apenas mais um indicador da complexidade do *T. cruzi* é maior do que a atualmente definida, e vai exigir revisão de relações DTUs como mais isolados silvestres sendo genotipados.

2.6. Publicação relacionada ao Capítulo

2.6.1. PUBLICAÇÃO 1

Macedo, A.M. and **Segatto, M.** (2010). Implications of *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Diversity in the Pathogenesis of Chagas Disease. In American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research, T. Telleria, and M. Tibayrenc, eds. (London, Elsevier), pp. 498-522.

20 Implications of *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Diversity in the Pathogenesis of Chagas Disease

Andréa M. Macedo* and Marcela Segatto

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

20.1 Introduction

As will be detailed in Chapter 27, Chagas disease is characterized by a variable clinical course. Following parasite infection, there is a short acute phase characterized by abundant parasitemia but frequently mild and nonspecific symptoms make the recognition of the contagion difficult. In less than 5% of the cases, fatal neurological and/or cardiac complications are observed during the acute phase. The infection then proceeds to a chronic phase, with scarce parasitemia and an unpredictable clinical course that ranges from the absence of symptoms to severe disease with cardiovascular and/or gastrointestinal involvement (Prata, 2001; Pimenta, 2002).

Geographical variations in the prevalence of clinical forms and morbidity of Chagas disease have been reported. In Brazil, the asymptomatic or indeterminate form is the most common (60–70%) followed by the cardiac and digestive forms (20–30% and 8–10%, respectively). The cardio-digestive form is the rarest. However, in Central Brazil and Chile, the digestive form of Chagas disease predominates but is practically nonexistent in Venezuela and Central America (Luquetti et al., 1986; Dias, 1992). The reason for this geographical heterogeneity and why different patients develop different clinical forms remains unexplained, but certainly, both host and parasite factors are involved.

It is interesting to observe that the relative importance attributed to parasite versus human-related variables has changed in the evolution of pathogenetic explanations for Chagas disease. Historically, it is possible to distinguish three main phases of our pathogenetic knowledge of Chagas disease. The first, which we refer to as the “parasite phase,” corresponds to the period immediately following the

discovery of the disease when there was no questioning of the primary pathogenetic role of *T. cruzi*. In this period, there was an intense, although largely fruitless, search for biological and biochemical methods and markers capable of establishing a link between the variability of the parasite and the clinical form of the disease. The failure of these endeavors, associated with the scarcity of parasites in the blood and tissues of chronic symptomatic patients, led to the “autoimmune phase.” In this period, the pathogenetic importance of the parasite was relegated to a lower tier, except as a provider of cross-reacting epitopes capable of unleashing autoimmune reactions (Schmunis, 1987; Kalil and Cunha-Neto, 1996). More recently, the primary role of *T. cruzi* in the pathogenesis of Chagas disease has been reestablished, and we are now experiencing the third wave, which we call the “genomic phase.” Infirmary is seen as the product of the interaction of two highly variable genomes: the parasite’s and the human’s. The main purpose of this chapter is to review the parasite counterparts that have led to this genomic paradigm.

20.2 The Genomic Paradigm

In 1909, Carlos Chagas first described the disease that bears his name in a 2-year-old child from the state of Minas Gerais, Brazil (Chagas, 1909). Indeed, in 1909, Chagas had already noted a peculiar dimorphism (so-called slender and stout forms) in the bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi*, which was later amply confirmed by others (Da Silva, 1959; Brener, 1965). Today, these morphological forms are believed to emerge from epigenetic phenomena, and their pathological relevance is obscure (Howells and Chiari, 1975). At an early stage, the idea of differential tissue tropism in the origin of the pathogenesis of Chagas disease was also proposed (Vianna, 1911; Campos, 1927) and persisted despite only tenuous evidence based mostly on the parasite distribution in different tissues during the acute phase of experimentally infected animals (Taliaferro and Pizzi, 1955; Hanson and Roberson, 1974; Melo and Brener, 1978; Andrade et al., 1983; Andrade and Magalhaes, 1996).

In chronic Chagas disease, parasites are rarely found in tissues examined by routine staining techniques (Kobertle, 1968; Palacios-Pru et al., 1989). However, their presence has been unveiled by application of powerful new immunohistochemical techniques developed over the past two decades (Higuchi Mde et al., 1993). Moreover, application of the exquisitely sensitive polymerase chain reaction (PCR) to the study of Chagas disease provides reliable molecular evidence that cogently ties tissue lesions to the presence of the parasite (Jones et al., 1993; Brandariz et al., 1995; Vago et al., 1996a). These new studies highlight the primary role of *T. cruzi* in the pathogenesis of Chagas disease and set the stage to establish the notion that genomic variation of *T. cruzi* might influence the course of the disease.

20.3 The Genetic Variability of *T. cruzi*

Different studies, including biological, biochemical, and molecular ones, have demonstrated that *T. cruzi* is a heterogeneous **species** (Macedo and Pena, 1998; Macedo et al., 2001; Devera et al., 2003). In this chapter, we will recapitulate some

* E-mail: andrea@icb.ufmg.br

of these studies, with emphasis on those that have contributed to a better understanding of the *T. cruzi* population structure and its role in the pathogenesis of Chagas disease.

The creative nomenclature assigned to the various groups of *T. cruzi* reflects the unique biology of the organism, and in the literature, subgroups of *T. cruzi* are partitioned into **biodemes**, **zymodemes**, **schizodemes**, **strains**, **stock**, **clones**, **clonets**, **lineages**, **clades**, and, most recently, **discrete typing or taxonomic units (DTUs)**, **haplotypes**, and **haplogroups**. Definitions of these important concepts can be found in the glossary at the end of this chapter.

20.3.1 Zymodemes or Multilocus Enzyme Electrophoresis

The first experimental method demonstrating the extent of genetic diversity of *T. cruzi* was the analysis of electrophoretic variants of cellular enzymes (isoenzymes). This procedure involves electrophoresis of parasite extracts on starch gels or cellulose acetate plates and biochemical staining with colorimetric or fluorescent substrates for different enzymes. On the basis of the variability of six loci, Miles and others proposed the existence of two isoenzymatic clusters: zymodeme 1 (Z1), circulating mostly in the sylvan environment, and zymodeme 2 (Z2), present in the domestic cycle of the protozoan and encompassing the vast majority of the infected human hosts in Southern Cone countries (Miles et al., 1977). A third isoenzyme group of *T. cruzi* was further characterized as zymodeme 3 (Z3) (Miles et al., 1978). This enzymatic variant, originally described in the Amazon region, was also associated with the *T. cruzi* sylvatic transmission cycle and was rarely isolated from humans (Barrett et al., 1980; Miles et al., 1981b; Povoia et al., 1984). Subsequent phylogenetic analyses among Z3 isolates from the Brazilian Amazon revealed a clear dichotomy in the Z3 group, defining two groups that were named Z3A and Z3B. These findings were confirmed by three independent genetic markers (Mendonça et al., 2002). During *T. cruzi* diversity studies in Bolivia, Chile, and Paraguay, two additional and apparently hybrid zymodemes were identified and named Bolivian Z2 and Paraguayan Z2 due to their close relationship to the Brazilian Z2 zymodeme (Tibayrenc and Miles, 1983). Subsequent studies using 15 isoenzyme loci demonstrated much higher genetic diversity, and 43 genotypes or clonets were proposed for *T. cruzi* isolated from different hosts from other regions of South America (Tibayrenc et al., 1986a; Tibayrenc and Ayala, 1988). Despite the extraordinary intraspecific diversity identified in *T. cruzi* numerical taxonomic analyses, these data demonstrated the existence of two major, highly heterogeneous, phylogenetic lineages of *T. cruzi* differing in several biological properties (Tibayrenc, 1995) that were subsequently partitioned into six DTUs or major lineages: I, IIa, IIb, IIc, IId, and IIe (Brisse et al., 2000a, 2001).

20.3.2 Schizodemes or kDNA Restriction Fragment Length Polymorphisms

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis is a genotyping technique based on the existence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) within recognition sites for specific restriction enzymes. Therefore, DNA samples from different organisms (digested by the same restriction enzyme) frequently present fragments of

different lengths that can be resolved by gel electrophoresis. RFLPs are suitable for intraspecific variability studies among closely related taxa and have been largely used for *T. cruzi* genotyping approaches using both the mitochondrial and nuclear genomes.

The first studies on DNA polymorphism of *T. cruzi* were published in 1980 by Morel et al., who reported on RFLPs of kinetoplast DNA (kDNA) minicircles (Morel et al., 1980). All members of the order Kinetoplastida are characterized by the presence of a kDNA network within a single large mitochondrion. The kDNA constitutes 10–30% of the total cell DNA, and in *T. cruzi* comprises $5-20 \times 10^3$ minicircles of 1.42 kb and 20–50 maxicircles of 36 kb (Simpson, 1987). Each minicircle is organized into four 120-bp, highly conserved regions separated by four highly variable regions (Degraeve et al., 1988). Parasite populations displaying identical or similar kDNA minicircle restriction patterns are called schizodemes (Morel et al., 1980).

kDNA RFLP analyses unraveled an unexpectedly high amount of genetic diversity in *T. cruzi*. Together with cloning experiments, kDNA restriction analysis demonstrated for the first time that single strains of *T. cruzi* could contain two or more distinct clonal genotypes (Morel et al., 1980). The existence of these multiclonal *T. cruzi* strains was later confirmed by several groups using different techniques (Deane et al., 1984; De Araujo and Chiani, 1988; Carneiro et al., 1991; Macedo et al., 1992a; Oliveira et al., 1998, 1999). Schizodemes presented some correlation with the isoenzyme classification, demonstrating that linkage disequilibrium can even occur between different (nuclear and mitochondrial) genome compartments (Tibayrenc and Ayala, 1987).

The RFLP technique, however, has some drawbacks. It requires a large amount of DNA (1×10^8 parasites), and the process and analysis are labor intensive. This technique was later simplified with a previous amplification of the hypervariable regions of kDNA minicircles by PCR using primers designed from flanking conserved regions, followed by digestion of the products, a technique known as PCR-RFLP, which requires many fewer parasites (Sturm et al., 1989).

20.3.3 Random Amplified Polymorphic DNA Analysis

The PCR-based random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique and the less-used but closely related simple sequence repeat anchored primer PCR (SSR-PCR) have provided a sensitive approach for *T. cruzi* profiling and constitute useful tools for establishing genetic relationship among isolates (Dias Neto et al., 1993; Steindel et al., 1993; Tibayrenc et al., 1993; Oliveira et al., 1997; Brisse et al., 2000b). Complex and strain-specific banding patterns are evident for different *T. cruzi* populations, although no correlation with clinical aspects has been uncovered (Oliveira et al., 1997). However, when we compare the RAPD profiles of strains isolated from patients in the chronic phase of the disease with isolates from patients in the acute phase and with *T. cruzi* populations obtained from sylvatic vectors and mammals, a clear increasing gradient in variability is observed (Table 20.1). These results are compatible with the idea that not all *T. cruzi* strains are capable of establishing effective infections in *Homo sapiens* and that humans function as a filter in selecting more adapted subpopulations (Macedo and Pena, 1998; Macedo et al., 2002, 2004).

Table 20.1 Reduction of the *T. cruzi* Population Complexity During the Course of Human Infection as Revealed by the RAPD and MLMT Techniques

Strain Origin	Average Proportion of Shared Bands between Two Strains (RAPD Data Analysis)	Proportion of Strains with Two or More Peaks Per Locus (MLMT Data Analysis)
Strains isolated from nonhuman sources	22%	58%
Strains isolated from patients with acute Chagas disease	39%	ND
Strains isolated from patients with asymptomatic chronic Chagas disease	51%	ND
Strains isolated from patients with symptomatic chronic Chagas disease	53%	10%

MLMT: multilocus microsatellite typing; ND: not determined; RAPD: random amplified polymorphic DNA. Source: Adapted from Macedo et al. (2004) with modifications.

The RAPD technique is based on the amplification of genomic DNA with single, and usually short, oligonucleotide primers of arbitrary sequence, which generate complex banding profiles (Welsh and McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Essentially, any primer can be used for any organism if sufficiently low-stringency conditions are used and small amounts of biological material are required. However, this lack of specificity means that RAPD cannot be used for analyzing *T. cruzi* directly in infected tissue. Different authors have also pointed out that RAPD presents problems of reproducibility because the profile may vary according to the quality and quantity of DNA in the reaction, the composition of the buffer, and the brand of *Taq* polymerase used for PCR (Macedo et al., 1992b; Riedy et al., 1992; Oliveira et al., 1997). However, the RAPD profiles proved to be stable even after prolonged parasite cultivation (up to 100 generations of a *T. cruzi* clone), indicating that under rigidly controlled conditions, RAPD can have good reproducibility (Zingales et al., 1997).

RAPD has been largely used for *T. cruzi* numerical taxonomy studies, and strong correlations between the MLEE and the RAPD patterns have been identified (Steindel et al., 1993; Tibayrenc et al., 1993; Revollo et al., 1998). Moreover, RAPD profiling was also utilized for corroborating the *T. cruzi* taxon division into major lineages (Tibayrenc, 1995; Souto et al., 1996).

20.3.4 Low-Stringency Single Specific Primer PCR

A major drawback of RAPD (discussed earlier) is that the primers used cannot distinguish between host and parasite DNA. Thus, their use is limited to cultured

parasites, and it is not possible to examine organisms isolated directly from patients. One solution to this problem is to use a two-phased PCR protocol called low-stringency single specific primer PCR (LSSP-PCR). In LSSP-PCR, a purified DNA fragment is subjected to PCR using a single specific primer under low-stringency conditions. The primer hybridizes specifically to its complementary region and nonspecifically to multiple sites within the fragment, in a sequence-dependent manner, producing a highly complex set of reaction products that can be resolved by electrophoresis to generate "gene signatures" (Pena et al., 1994). The rationale of the approach is the use of specific primers to amplify a variable region of the parasites' DNA directly from blood samples or biopsies and then to probe the sequence variations in the amplified parasite-specific DNA fragment.

LSSP-PCR has been successfully applied to the approximately 330-bp variable DNA fragment of *T. cruzi* kDNA minicircles to produce "kDNA signatures," allowing profiling of parasites present in the tissues of chronically infected patients for the first time (Vago et al., 1996b). The initial idea of the differential tissue tropism playing fundamental importance in determining the pathogenesis of Chagas disease, proposed as early as 1911 (Vianna, 1911), was revitalized by the demonstration that parasites with different genetic profiles can be found in distinct tissues (esophagus and heart) of the same patient (Vago et al., 2000).

20.3.5 Multilocus Microsatellite Typing

An alternative approach to characterize *T. cruzi* directly in biological samples emerged with the discovery of polymorphic microsatellites in the *T. cruzi* genome (Oliveira et al., 1998). Microsatellites are polymorphic tandem repeats of 2- to 6-bp-long simple motifs that can exhibit great levels of polymorphism provided by variable numbers of repetitive units (Levinson and Gutman, 1987; Litt and Luty, 1989; Henderson and Pates, 1992). These markers evolve rapidly due to a higher mutation rate compared to that found in other regions of the genome. Polymorphic microsatellites represent approximately 1% of the *T. cruzi* genome and are distributed throughout the nuclear chromosomes. In addition, microsatellite loci are generally located in nonexpressed regions of the parasite nuclear genome, which makes them insensitive to selective pressures that can occur with other classical markers (e.g., isoenzymes or rDNA genes), and contrasting to other polymorphic DNA markers or techniques (e.g., RAPD and LSSP-PCR), the microsatellites are unilocal markers and present only one copy per haploid genome. Therefore, microsatellites provide a powerful tool to perform more refined population studies because the alleles present in each *T. cruzi* strain can be exactly determined (Oliveira et al., 1998, 1999; Macedo et al., 2001; Llewellyn et al., 2009a,b).

Presently, more than 50 polymorphic microsatellite loci, composed of di-, tri-, and tetranucleotide motifs, have been described for different *T. cruzi* genome analyses (Oliveira et al., 1998; Macedo et al., 2001, 2010; Freitas et al., 2006; Valadares et al., 2008; Llewellyn et al., 2009a). However, one of the most interesting applications of polymorphic microsatellites is to determine whether a specific parasite population is mono- or polyclonal. Monoclonal populations always present

only one or two peak patterns, indicating homo- or heterozygosity at the respective microsatellite locus. However, strains consistently presenting amplification patterns of three or more fragments of different sizes correspond to multiclonal populations (Oliveira et al., 1998; Macedo et al., 2001; Llewellyn et al., 2009b). Interestingly, microsatellite analyses indicate that the percentage of multiclonal populations decreases progressively as we compare strains isolated from the sylvatic cycle with those isolated from man, confirming the previous idea of a human filter selecting more adapted strains (Macedo and Pena, 1998). Usually less than 10% of strains isolated from humans in the chronic phase of infection are polyclonal, compared up to 58% of multiclonal populations isolated from sylvatic vectors in the Amazon (Table 20.1) (Macedo et al., 2004).

20.3.6 Minixon and rDNA Polymorphisms

The mRNA of trypanosomes is unique in that most, if not all, mature transcripts bear an identical 35-bp splicer leader (SL) at their 5'-termini (Borst, 1986). This SL is encoded in blocks of tandemly repeated units, the minixon genes (MEs). Comparative alignment of MEs from different *T. cruzi* strains shows the presence of highly conserved sequence regions of 39 bp (the exons), similar regions of 73 bp with more than 98% identity (corresponding to the introns), and divergent inter-genic regions or ITS (less than 59% similarity) (Murthy et al., 1992; Souto et al., 1996) (Figure 20.1A).

By using a multilocal PCR strategy, it was possible to cluster *T. cruzi* strains into two groups according to the amplification products. Strains that yielded 300-bp products were designated as belonging to group 1, and those that yielded 350-bp products were designated as belonging to group 2 (Souto et al., 1996). Subsequent analysis of ME sequences of Z3 strains indicated the presence of a third group (2') characterized by an approximately 50-bp insertion/deletion in the nontranscribed spacer region of the MEs (Fernandes et al., 1998). Thus, new sets of primers were designed to amplify the Z3 strains (Fernandes et al., 2001; Burgos et al., 2007).

Another singular characteristic of the trypanosomatids is their rRNA cistron organization. Both the small subunit (SSU) and the large subunit (LSU) are considerably larger than the typical eukaryotic rRNA species. Particularly interesting is the LSU, which contains two-high-molecular weight RNA (24S α /24S β) and six low-molecular-weight RNA (S1–S6) components (Leon et al., 1978; de Arruda et al., 1990; Hernandez et al., 1990). The rDNA cistron is composed of repeated sequences in which the coding regions of the SSU and the LSU are separated by two internally transcribed spacers (ITSs). ITS1 separates the coding region of the 18S subunit and the 5.8S rDNA, and ITS2 separates the 5.8S rDNA sequence from the 24S α rDNA (Figure 20.1B).

Comparison between the 24S α rRNA gene of *T. cruzi* and other trypanosomatids showed high homology, except for discrete regions. The most divergent domain (D7) is a segment of about 100 bp located at the 3' end of the *T. cruzi* gene (de Arruda et al., 1990; Souto and Zingales, 1993). Initially, PCR amplification of a sequence

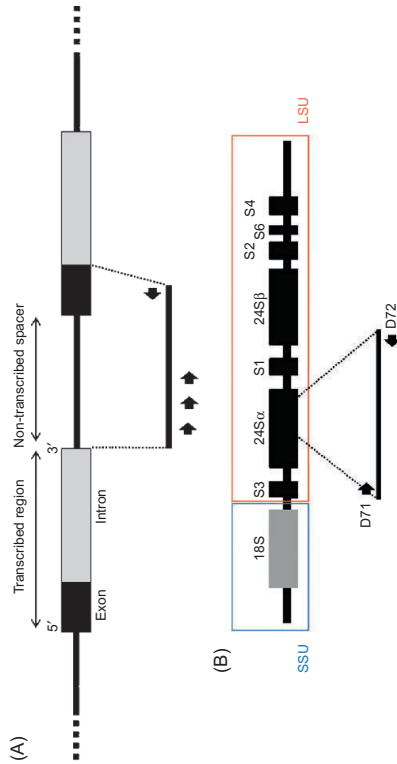


Figure 20.1 (A) Schematic representation of the *T. cruzi* ME locus. The ME locus is organized as tandem repeated units in which the exon region is conserved throughout the kinetoplastida (black boxes). Intron regions are indicated by the gray boxes, and the nontranscribed spacer is represented by the black connecting line. ME typing is based on multiplex PCR using an exon-specific primer (right arrow) and lineage-specific primers located in the spacer region.

(B) Schematic organization of *T. cruzi* rDNA cistron. The SSU is indicated by a gray box, and the LSU is indicated by black boxes. The rDNA cistron is composed of repeated sequences in which the coding regions of the SSU and the LSU are separated by two ITSs. ITS1 separates the coding region of the 18S subunit and the 5.8S rDNA, and ITS2 separates the 5.8S rDNA sequences from the 24S rDNA. rDNA typing is performed using primers D71 and D72, which amplify a dimorphic region at the 3' end of the 24S α rRNA gene. This figure is adapted and modified from Macedo et al. (2004).

from the D7 domain revealed a size dimorphism, and three different groups or lineages of *T. cruzi* strains were detected (Souto and Zingales, 1993; Souto et al., 1996). Strains from lineage 1 gave 125-bp products, and strains from lineage 2 gave 110-bp products. A third group of strains presented both PCR products and was denoted group 1/2. Later, by using more sensitive analysis methodology, additional groups of strains presenting D7 amplicons of 117/119 bp (Pimenta, 2002; Augusto-Pinto et al., 2003) or 120/130 bp (Brisse et al., 2001) were also identified.

20.3.7 Other Nuclear and Mitochondrial Gene Polymorphisms

Using two different nuclear genes (trypanothione reductase (TR) and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS)) and a region of the mitochondrial DNA partially encompassing the maxicircle-encoded genes (cytochrome oxidase subunit II (COII) and NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1)), Machado and Ayala (2001) proposed the division of *T. cruzi* strains into four different clades named A, B, C, and D. Clade A included all DNA sequences from strains belonging to zymodeme 1 (Z1). However, the DNA sequences obtained from strains of

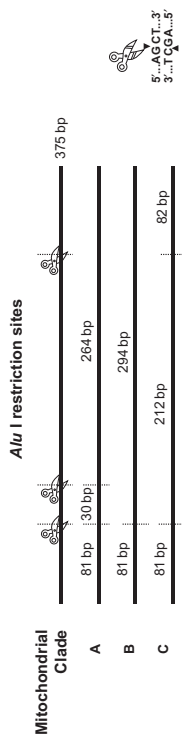


Figure 20.2 *AluI* restriction sites and RFLP patterns corresponding to the three mitochondrial haplogroups.

Z2 and Z3 were not monophyletic and were clustered into two (mitochondrial data) or three (nuclear data) distinct clades (i.e., B, C, and D).

Based on these previous results, Freitas and coworkers developed a simple PCR-RFLP method for typing the mitochondrial genome of *T. cruzi* populations. Following the PCR amplification of the 3' end of the COII regions, an *AluI* restriction reaction produces three different RFLP patterns corresponding to three mitochondrial haplogroups (Figure 20.2).

The haplogroup A encompasses the zymodeme 1, D7 rDNA 2, minixon 2 strains; haplogroup C encompasses the zymodeme 2, D7 rDNA 1, minixon 1 strains; and haplogroup B encompasses the hybrids and the zymodeme 3 strains (Freitas et al., 2006).

Similarly, Augusto-Pinto et al. (2003) cloned and sequenced the mismatch repair mutS homologue 2 (MSH2) of *T. cruzi*, which proved to be polymorphic. Examination of 13 different strains identified three clusters of sequences that could be used for dividing the taxon into three distinct clades (A, B, and C). It was shown that strains belonging to clade A correspond to those presenting D7 rDNA 2, minixon 2, and zymodeme Z1. Similarly, strains belonging to clade C correspond to those strains sharing D7 rDNA 1, minixon 1, and zymodeme Z2. Strains in clade B include the hybrid strains, such as those presenting D7 rDNA 1/2 and CL Brener or zymodemes Z3A and Z3B.

20.4 Major Lineages in *T. cruzi*

As highlighted previously, *T. cruzi* is a polymorphic species, and the overall population structure is far from being completely understood. Until the end of 1980s, the prevalent idea was that *T. cruzi* strains could not be grouped into discrete groups that represent natural taxa (Morel et al., 1980; Tibayrenc et al., 1986b). Instead, a multiclonal population structure was proposed, with the different clones evolving from an ancient ancestor, essentially by clonal reproduction (Tibayrenc et al., 1986a; Zhang et al., 1988). However, the identification of a strong correlation between different DNA markers (e.g., zymodemes, minixon, D7-24S rDNA, RAPD, microsatellites, and mitochondrial genes) generated a consensus about the existence of at least two major phylogenetic lineages within the taxon (Tibayrenc,

1995; Souto et al., 1996; Nunes et al., 1997; Zingales et al., 1998). The basic dichotomy of the species was further correlated with a plethora of epidemiological, biochemical, biological, and molecular markers (Fernandes et al., 1998; Oliveira et al., 1998; Momen, 1999; Zingales et al., 1999; Macedo et al., 2001; Henriksson et al., 2002; Buscaglia and Di Noia, 2003), but the nomenclature of the major groups became confusing.

In April 1999, during the International Symposium commemorating the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease in Rio de Janeiro, Brazil, the subdivision of *T. cruzi* into two ancestral lineages (*T. cruzi* I and *T. cruzi* II) was recognized (Anonymous, 1999). *T. cruzi* I includes the strains presenting common characteristics (e.g., zymodeme Z1, rDNA and minixon group 2, and mitochondrial clade A), whereas *T. cruzi* II includes strains presenting zymodeme Z2, rDNA and minixon group 1, and mitochondrial clade C (Momen, 1999; Machado and Ayala, 2001). However, some parasite strains could not be properly grouped into either of these two major lineages. Among these unclassified strains were those identified as belonging to zymodeme Z3 (Miles et al., 1980) and other hybrid strains, such as those characterized as 24S₀ rDNA group 1/2 (Souto et al., 1996; Stolf et al., 2003). Subsequently, other subdivisions were proposed. Based on MLEE and RAPD markers, Brisse et al. (2000a, 2001) proposed the subdivision of *T. cruzi* into two major lineages of DTUs, or DTUs I and II. The latter DTU was later subdivided into five sublineages named DTU IIa–e. DTU I and DTU IIb correspond, respectively, to the ancestral lineages *T. cruzi* I and *T. cruzi* II, whereas DTU IIc and DTU IIe encompass hybrid strains, such as the strains from rDNA group 1/2 and CL Brener (Brisse et al., 2001, 2003). Later, based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses, Freitas et al. (2006) proposed the existence of a third ancestral lineage, named *T. cruzi* III, which corresponds to DTU IIc.

Recently, during the XIII International Congress of Protistology, XXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, and the XXXVI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease held in Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brazil (August 2009), a second consensus was reached for *T. cruzi* intraspecific nomenclature. The *T. cruzi* strains are now referred to by six DTUs named *T. cruzi* I to *T. cruzi* VI. *T. cruzi* I and *T. cruzi* II correspond, basically, to the major lineages originally defined 10 years ago during the first Satellite Meeting (Anonymous, 1999). Two additional DTUs (*T. cruzi* III and *T. cruzi* IV) include the strains belonging to zymodeme Z3A and Z3B, respectively (Mendonça et al., 2002). The other two DTUs (*T. cruzi* V and *T. cruzi* VI) include hybrid strains corresponding to zymodeme Bolivian Z2 and zymodeme Paraguayan Z2, respectively (Zingales et al., 1999). The designation of these six DTUs and their equivalence to previously published nomenclature are detailed in the previous chapter, but summarized information is also presented in Table 20.2.

20.5 The Origin of the *T. cruzi* Hybrid Strains

The occurrence of genetic exchange in *T. cruzi* by homologous recombination has been controversial over the years, ranging from absolute clonality (Tibayrenc et al.,

1986b) to rare and discrete hybridization events (Westenberger et al., 2005; Freitas et al., 2006; Tomazi et al., 2009; Venegas et al., 2009) to a high-frequency, cryptic event (Carranza et al., 2009). Most of the evidence was based on the identification of putative natural hybrid strains by studies of individual genes (Bogliolo et al., 1996; Carrasco et al., 1996; Souto et al., 1996; Machado and Ayala, 2001; Brisse et al., 2003; Sturm et al., 2003). Gaunt et al. (2003), however, clearly demonstrated the formation of hybrids of *T. cruzi* in experimental infections by a nuclear fusion mechanism followed by nonmeiotic hybridization events. In this process, the two parental nuclei fuse in their diploid forms, resulting in polyploid progeny that can undergo recombination between alleles and, through subsequent chromosomal loss, eventually return to the diploid state. The length of time required for the return to diploid is unknown. This so-called parasexual pathway resembles the mechanism of genetic exchange observed in certain fungi (Heitman, 2006). Experimental hybrids of *T. cruzi* appear to be aneuploid, containing 1.65–1.72 times more DNA than the parental cells (Gaunt et al., 2003; Lewis et al., 2009a).

Gaunt et al. (2003) also showed that hybridizations in *T. cruzi* strains also occur without mitochondrial fusion. Thus, natural hybrid strains derived from the same evolutionary lineages will have the same type of mitochondrial DNA. In agreement with this premise, all identified hybrid strains share the mitochondrial DNA clade or haplotype B (Machado and Ayala, 2001; Freitas et al., 2006). Nonetheless, the phylogeny of the whole *T. cruzi* taxon is far from being completely understood. The current prevailing view is that *T. cruzi* I and *T. cruzi* II are ancient lineages, and the *T. cruzi* V and *T. cruzi* VI strains are the products of a minimum of two hybridization events occurring in the past between *T. cruzi* II and *T. cruzi* III strains (Freitas et al., 2006; Westenberger et al., 2005; Tomazi et al., 2009). Curiously, both parental strains have contributed to the constitution of the nuclear genome of the hybrids, but only *T. cruzi* III was the mitochondrial genome donor. The origins of *T. cruzi* III and *T. cruzi* IV, however, remain controversial. A possible explanation is that *T. cruzi* III and *T. cruzi* IV are ancient and closely related DTUs from which both *T. cruzi* I and *T. cruzi* II originated by long-term divergence. An equally possible alternative scenario is that *T. cruzi* III and *T. cruzi* IV are hybrid strains that originated from an early hybridization event between the *T. cruzi* I and *T. cruzi* II strains (Freitas et al., 2006; Westenberger et al., 2005; Tomazi et al., 2009). Further studies will be necessary to clarify this point.

20.6 Genotyping the Six Major Lineages of *T. cruzi*

The standardized nomenclature recently recommended for the *T. cruzi* DTUs will certainly improve communication within the scientific community and contribute to clarify the epidemiological and pathogenic aspects specifically associated with each of the six *T. cruzi* major lineages. To achieve this, however, it is also necessary to standardize a simple and reproductive genotyping strategy applicable in any basic laboratory working on *T. cruzi*.

Table 20.2 The New *T. cruzi* Nomenclature^a and its Correspondence to Previous Nomenclature Defined by Different Molecular and Biochemical Markers

Zingales et al. (2009)	Anonymous (1999)	Miles et al. (1978)	Tibayrenc et al. (1986a)	Souto et al. (1996)	Fernandes et al. (1998)	Brisse et al. (2001)	Freitas et al. (2006)	Reference Strains
<i>T. cruzi</i> I	<i>T. cruzi</i> I	Z1	1–25	Lineage 2	Lineage 2	Lineage I	<i>T. cruzi</i> I	Silvio X10, Colombian
<i>T. cruzi</i> II	<i>T. cruzi</i> II	Z2 30–34	Z3/Z1	Lineage 1	Lineage 1	Lineage IIb	<i>T. cruzi</i> II	Esmeraldo, JG
<i>T. cruzi</i> III	ND	ASAT 35–37		ND	Sublineage 2'	Lineage IIc	<i>T. cruzi</i> III	M5631, M6241
<i>T. cruzi</i> IV	ND	Z3	26–29	ND	Sublineage 2'	Lineage IIa	ND	CanIII
<i>T. cruzi</i> V	ND	Z2b	38–39	Group 1/2	Lineage 1	Lineage IId	Hybrid	MN cl2, SC43
<i>T. cruzi</i> VI	ND	ND	40–43	Lineage 1	Lineage 1	Lineage IIe	Hybrid	CL Brener

^aZingales et al. (2009).

Source: Adapted from Brisse et al. (2001).

The biological, biochemical, and genetic diversity of *T. cruzi* strains have long been recognized, and over the years, numerous approaches have been used to characterize the parasites. However, none of the individual markers described earlier allows complete DTU resolution, and, in any case, reliance on a single marker is inadvisable because of the consequent loss of resolution and the potential influence of genetic exchange on some lineages (Lewis et al., 2009b). Thus, to effectively standardize *T. cruzi* classification, a simple and reproducible schema for typing isolates into their respective DTUs is required.

Brisse and coworkers were the first to propose a multiple assay system based on a combination of minixon, 24S α rRNA (Souto et al., 1996), and 18S rRNA (Clark and Pung, 1994) PCR product size polymorphism assays suitable for *T. cruzi* assignment into each of the six DTUs (Brisse et al., 2001). However, several of the assignments were based on the absence, rather than the presence, of bands, which is not recommended for a gold standard typing method.

Rozas et al. (2007) described a multilocus PCR-RFLP (MLP) analysis of genetic polymorphism of 12 loci, most of which are involved in host-parasite relationships. Several of these PCR-RFLP assays demonstrated inter-DTU differences, and a single assay permits the typing of several DTUs in a "single shot." In the case of ambiguities, the combination of a second assay (or, if needed, a third one) allows complete typing (Rozas et al., 2007).

Recently, Miles' group proposed a simpler typing strategy using currently available markers in the form of a triple assay that employed rDNA PCR (Souto et al., 1996) and PCR-RFLP of the HSP60 (heat shock protein 60) and GPI (glucose-6-phosphate isomerase) loci (Westenberger et al., 2005). The combined application of these three PCR-RFLP markers (Figure 20.3A) is enough to discriminate all six DTUs, with only three exceptions among 48 analyzed strains (Lewis et al., 2009b). An alternative tool for simple DTU assignment, devised by Macedo and coworkers (D'Avila et al., 2009), is schematized in Figure 20.3B.

Based on this strategy, a triple step assay comprising PCR-RFLP-COII (Freitas et al., 2006), amplification of ITS leader (Burgos et al., 2007), and 24S α rRNA (Souto et al., 1996) genes, applied in that order, represents a reliable methodology for *T. cruzi* strain typing.

The utility of all these assays in practice, however, is subject to complications arising from the existence of appreciable heterogeneity within each *T. cruzi* DTU and the occurrence of mixed infections, which are already well documented in both vectors and mammal hosts, including humans (Bossono et al., 1996; Yeo et al., 2007; Cardinal et al., 2008). Depending on the parasite compositions and the typing strategy chosen, mixed genotype profiles can be clearly recognized, resulting in unequivocal DTU identification. In contrast, observation of unexpected multilocus genotypes can indicate undiscovered lineages or recombinant strains that warrant further study. Certainly, a multicentric study would be necessary to standardize and validate the different protocols for genotyping *T. cruzi* strains. To achieve this goal, comparative typing protocols should include the same representative set of reference and laboratory strains as well as a great number of field isolates.

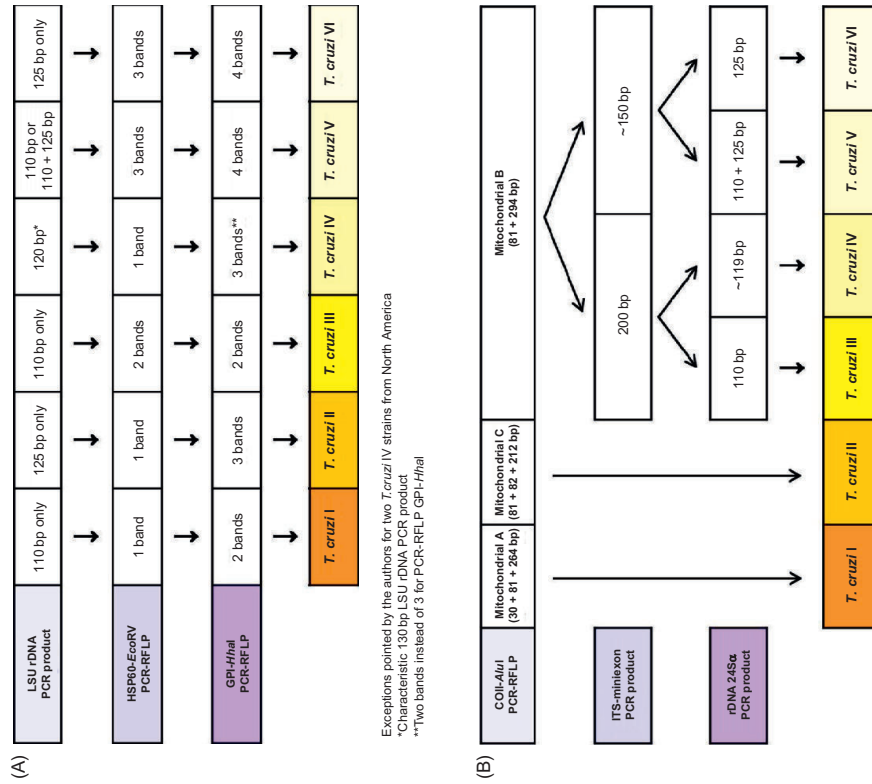


Figure 20.3 (A) Triple assay as proposed by Miles and colleagues (Lewis et al., 2009b) for *T. cruzi* DTU assignments. The strategy includes a PCR of LSU rDNA (Souto et al., 1996), followed by PCR-RFLP of the HSP60 (heat shock protein 60) gene using the restriction enzyme *EcoRV* and, finally, another PCR-RFLP using GPI (glucose-6-phosphate isomerase) as the targeted gene and *HhaI* as the restriction enzyme (Westenberger et al., 2005). (B) Triple assay as recommended by Macedo and coworkers (D'Avila et al., 2009) for discriminating the *T. cruzi* DTUs. Initially, strains should be analyzed by PCR-RFLP of the COII gene followed by digestion with *AuI* (Freitas et al., 2006), which allows the discrimination of *T. cruzi* I and *T. cruzi* II from the others (*T. cruzi* III–VI). A second step comprising ITS leader gene PCR (Burgos et al., 2007) is applied to these unclassified strains, resulting in two distinct clusters, one formed by *T. cruzi* III and *T. cruzi* IV and another by *T. cruzi* V and *T. cruzi* VI. The final step consists of rDNA 24S α PCR (Souto et al., 1996).

20.7 Epidemiological and Clinical Implications of the Major *T. cruzi* Lineages

Under natural conditions, the flagellate *T. cruzi* infects over 100 mammalian species from different orders, to which it is transmitted by dozens of infected hematophagous hemiptera from the family Reduviidae. In addition to triatomines, parasites can be transmitted by blood transfusion, laboratory accidents, organ transplantation, and contaminated foods and drinks (Coura et al., 1994; Prata, 2001; Dias, 2006). Transmission from mothers with Chagas disease to their fetuses has also been reported, with the incidence varying from less than 1% in Brazil to 4–12% in endemic areas of Argentina, Bolivia, Chile, and Paraguay (Dias, 1992; Prata, 2001).

The geographic distribution of triatomines and vertebrate hosts associated with the hematophagous vector's preferences for specific blood sources define two different transmission cycles: one related to sylvatic hemiptera and generally involving wild nonhuman vertebrate hosts (the "sylvatic" cycle) and another dependent on home-dwelling hemiptera and primarily involving humans and household animals (the "domestic/peridomestic" cycle). The connection between the two cycles is made by infected rats, mice, bats, opossums, and hemiptera that migrate to the human environment, forced by the destruction of forests and adult insects attracted to dwellings, especially to artificial light (Coura et al., 2002).

The prevalence of the *T. cruzi* major lineages in the enzootic cycle has not been fully established yet. Pioneering studies led to the identification of *T. cruzi* I as the most relevant DTU in the sylvatic transmission cycle, at least in French Guiana (Lewicka et al., 1995). In contrast, subsequent analysis of several sylvatic isolates from the Brazilian Atlantic rainforest demonstrated that both *T. cruzi* I and *T. cruzi* II are equally represented (Fernandes et al., 1999). In both cases, however, the preferential association of each major *T. cruzi* lineages with different hosts (*T. cruzi* I with marsupials and *T. cruzi* II with raccoons, monkeys, and other placental mammals) was evident (Clark and Pung, 1994; Lewicka et al., 1995; Fernandes et al., 1999; Jansen et al., 1999).

Understanding *T. cruzi* population structure and phylogeny is critical because they are connected to both transmission cycles and disease aspects. Efforts to comprehend the genetic composition and population structure of *T. cruzi* are justified by their correlations with biological properties of the parasite, including geographical distribution, host specificity, and the clinical outcome of infection. Although no global correlations have been clearly demonstrated, there are many instances of local associations between parasite genetics and biology (Revollo et al., 1998; Campbell et al., 2004; Miles et al., 2009).

Chagas disease is distributed in a range from southern North America to southern South America. Generally, this parasite is considered, more benign at the northern end of its geographical range in Mexico, Central America, and northern South America and to cause more severe heart and digestive disease at the southern end of its range in Bolivia, Brazil, Argentina, and Chile (Dias, 1992; Sturm and Campbell, 2010). It is reasonably accepted that this geographical heterogeneity is caused primarily by genetic variation of *T. cruzi* because there is no clear

correlation with any pattern of ethnic, human genetic, or environmental variation. In this chapter, a modest compilation of the major literature findings in relation to *T. cruzi* intraspecific variability and the possible correlation to epidemiological and clinical aspects are presented (Table 20.3). However, because *T. cruzi* genotyping

Table 20.3 Clinical Aspects, Transmission Cycle, and Geographical Distribution of Chagas Disease Associated with the Major *T. cruzi* DTUs

DTU	Transmission Cycle	Geographic Distribution of Chagas Disease	Major Clinical Aspects
TcI	Predominantly in sylvatic cycle	Amazon region	<ul style="list-style-type: none"> – Usually associated with milder chronic Chagas disease – Possibly associated with severe Chagas disease in Venezuela and Colombia – Associated with oral transmission and severe acute cases in Brazil – Possibly associated with neuro-encephalitis in immunocompromised patients
TcII	Predominantly in domestic cycle; rare in sylvatic cycles	Main agent in the Southern Cone region of South America	<ul style="list-style-type: none"> – Primary cause of severe acute and chronic Chagas disease – Megaesophagus and megacolon in Brazil
TcIII	Predominantly in sylvatic cycle; rare in domestic cycles	?	<ul style="list-style-type: none"> – Rarely causes human Chagas disease
TcIV	Predominantly in sylvatic cycle; rare in domestic cycles	Venezuela and Amazon region	<ul style="list-style-type: none"> – Poorly understood DTU – Few strains have been isolated from humans – Possibly associated with oral transmission and severe acute cases in Brazil
TcV	Predominantly in domestic cycle; rare in sylvatic cycles	South America	<ul style="list-style-type: none"> – Severe acute and chronic Chagas disease – Megaesophagus and megacolon in Bolivia – Possibly linked to congenital transmission in Bolivia, Argentina, and southern region of Brazil
TcVI	Predominantly in domestic cycle; rare in sylvatic cycles	South America	<ul style="list-style-type: none"> – Possibly associated with severe acute and chronic Chagas disease in the Southern Cone region

Source: Adapted from Miles et al. (2009).

methods and the major lineage nomenclature in the literature were not standardized, some uncertainties are expected for these compiled data.

It is interesting that the geographical distribution of the *T. cruzi* major lineages tracks quite well with the severity gradient of Chagas disease across this range. *T. cruzi* I predominates in the USA, Mexico, Central America, and the countries in northern South America. *T. cruzi* II and the hybrids *T. cruzi* V and *T. cruzi* VI are relatively more abundant in the Southern Cone countries. *T. cruzi* IV is found predominantly from the southern USA to the Brazilian Amazon (Coura et al., 2002; Martins et al., 2008), whereas *T. cruzi* III has been isolated in many South American countries (Lewis et al., 2009b). The coincidence between both gradients has led to the general but not absolute association of *T. cruzi* I with milder disease and transmission via the sylvatic cycle, and *T. cruzi* II, V, and possibly VI with more severe disease and the domestic transmission cycle (Miles et al., 1978, 2003; Souto et al., 1996; Fernandes et al., 1999). Exceptions, however, are common.

20.7.1 *T. cruzi* I

T. cruzi I is the predominant agent of Chagas disease in countries in the Amazon region. The rarity of megasyndromes (megaesophagus and megacolon) in these regions has been attributed to the local predominant endemicity of *T. cruzi* I (Miles et al., 1981a). Moreover, cases of chronic human infection by *T. cruzi* I strains are rare and usually asymptomatic in Southern Cone countries (Miles et al., 1981a; Zingales et al., 1999; Coura et al., 2002; Buscaglia and Di Nota, 2003). Nonetheless, disease and death due to *T. cruzi* I in regions of Venezuela, Colombia, and part of Brazil where *T. cruzi* II is rare or absent (Miles et al., 1981a; Anez et al., 2004; Teixeira et al., 2006; Zafra et al., 2008; Llewellyn et al., 2009b) indicate that pathogenesis is also an inherent property of *T. cruzi* I strains (Miles et al., 2009; Sturm and Campbell, 2010).

T. cruzi I is associated with severe acute cases resulting from oral infection outbreaks (Shikanai-Yasuda et al., 1991; Coura, 2006; Dias et al., 2008; Steindel et al., 2008) and incursion of sylvatic rodents into houses (Luquetti et al., 1986). *T. cruzi* I is also related to reactivated cases of Chagas disease in individuals seriously immunocompromised due to immunosuppressant treatment after heart transplantations or coinfection with human immunodeficiency virus (HIV). Curiously, in these cases, *T. cruzi* I is frequently associated with central nervous system complications and meningoencephalitis (Anez et al., 2004; Burgos et al., 2008).

T. cruzi I shows substantial genetic heterogeneity (Barnabé et al., 2000; Herrera et al., 2007; O'Connor et al., 2007; Spotorno et al., 2008) that is evident in localized studies from Mexico (Lopez-Olmos et al., 1998; Bosseno et al., 2002), Colombia (Herrera et al., 2007), Venezuela, and Bolivia (Llewellyn et al., 2009b). Current studies suggest four subdivisions (haplotypes Ia–d) within *T. cruzi* I (Herrera et al., 2007; Falla et al., 2009), although these have not been integrated into the nomenclature revision proposed in the Second Satellite Meeting (Zingales et al., 2009). Interesting findings indicate that haplotypes Ia and Ib (sometimes referred as domestic strains of *T. cruzi* I) are particularly associated with the

domestic/peridomestic transmission cycle and human infections in Colombia (Falla et al., 2009) and Venezuela (Llewellyn et al., 2009b).

Although a predominance greater than 90% of *T. cruzi* I was initially described in Colombia (Widmer et al., 1985; Montilla et al., 2002; Zafra et al., 2008), increasing detection of *T. cruzi* II, III, and V has occurred in this country, especially by using parasite genotyping methods directly in infected human tissues (Cuervo et al., 2002; Zafra et al., 2008; Mantilla et al., 2010). These findings indicate that the epidemiology of Chagas disease is much more complex in Colombia than initially foreseen, with possible consequences on the pathology and morbidity of the disease.

20.7.2 *T. cruzi* II, *T. cruzi* V, and *T. cruzi* VI

T. cruzi II is the main agent of Chagas disease in the Southern Cone region of South America, where *Triatoma infestans* is or was the principal domestic vector. *T. cruzi* V and *T. cruzi* VI are hybrid lineages derived from hybridization events between *T. cruzi* II and *T. cruzi* III, and similar to *T. cruzi* II, they are extremely rare in the sylvatic transmission cycle (Zingales et al., 2009).

T. cruzi II is largely associated with severe cases of Chagas disease in South America, especially in central and southern Brazil, where cardiac, megacolon, and megaesophagus forms of Chagas disease are almost exclusively associated with this DTU (Freitas et al., 2005; Yeo et al., 2005; Lages-Silva et al., 2006). Nonetheless, increasing data also implicate *T. cruzi* V and possibly *T. cruzi* VI as the major lineages involved in human infections in the Gran Chaco region and neighboring countries, including Bolivia, Chile, northern Argentina, and southern Brazil (Diosque et al., 2003; Virreira et al., 2006b; Cardinal et al., 2008). For instance, megacolon in Bolivia is associated predominantly with *T. cruzi* V and to a lesser extent with *T. cruzi* II (Virreira et al., 2006b).

Remarkably, *T. cruzi* V is associated with congenital transmission of Chagas disease in Argentina, Bolivia, and the southern region of Brazil (Virreira et al., 2006a, 2007; Valadares, 2007; Corrales et al., 2009). The frequency of congenital infection is much higher (4–12%) in areas where *T. cruzi* V predominates and relatively rare (below 1%) in *T. cruzi* II-circulating areas (Valadares et al., unpublished data). Thus far, no case of congenital infection involving any of the other four major *T. cruzi* lineages has been reported. Whether these correlations result from the intrinsic biological characteristics of these major lineages or only reflect the local abundance of the lineages remains to be demonstrated.

Aside from *T. cruzi* II and *T. cruzi* V, different authors have indicated *T. cruzi* VI as one of the major lineages associated with severe Chagas disease in southern South America (Miles et al., 2009). However, due to their close genetic relationship and depending on the method chosen for parasite genotyping, *T. cruzi* VI cannot always be distinguished from *T. cruzi* II or *T. cruzi* V in the current literature (Campbell et al., 2004; Burgos et al., 2008; Lewis et al., 2009a). Thus, the specific contribution of *T. cruzi* VI in human infections is difficult to evaluate properly.

20.7.3 *T. cruzi* III and *T. cruzi* IV

T. cruzi III and *T. cruzi* VI are primarily associated with the sylvatic transmission cycle. They are distributed throughout a vast geographical range from the southern USA to Argentina, being relatively frequent in the Amazon region (Clark and Pung, 1994; Coura et al., 2002; Roellig et al., 2008). However, understanding the specific distribution and phylogeography of *T. cruzi* III and *T. cruzi* IV is complicated by the fact that several genotyping methods used in the literature fail to distinguish these DTUs.

T. cruzi III rarely, if ever, causes human infections, but it has been recorded in domestic dogs and peridomestic triatomines in northern Brazil (Chapman et al., 1984; Cardinal et al., 2008; Marcili et al., 2009; Câmara et al., 2010), threatening to be an emergent disease agent as transmission cycles evolve (Miles et al., 2009). *T. cruzi* IV is the least characterized major *T. cruzi* lineage. Although *T. cruzi* IV is the secondary cause of Chagas disease in Venezuela (Miles et al., 2009), few strains have been isolated from humans. The reference strain CANIII is the best characterized among them. Nonetheless, *T. cruzi* IV was responsible for the first recorded outbreak of presumed orally transmitted simultaneous acute cases of Chagas disease in Canudos, Belém, Pará State, Brazil (Miles et al., 1978). Subsequently, several cases of oral transmission were confirmed in the Amazonia basin, which is currently considered an endemic area for this mode of transmission of Chagas disease (Coura et al., 2002). The coincidence of the high incidence of oral transmission and the high prevalence of *T. cruzi* IV overlapping with *T. cruzi* I in the Amazon region has given rise to the hypothesis that these major lineages are particularly associated with severe acute cases of Chagas disease caused by contaminated foods and drinks. Accordingly, *T. cruzi* I and Z3 population (likely *T. cruzi* IV) were recently implicated in an outbreak of acute Chagas disease supposedly transmitted by contaminate açai juice in Amapá State, North Brazil (Valente et al., 2009).

20.8 Clonal—Histotropic Model of Chagas Disease

Humans are considered a recent accident in the evolutionary history of *T. cruzi*. It is estimated that *T. cruzi* emerged as a species over 150 million years ago, and the first contact with human was much more recent (i.e., in the late Pleistocene, approximately 15,000 years ago) when human first settled in the Americas (Briones et al., 1999; Macedo et al., 2001). Thus, it is natural to assume that not all *T. cruzi* strains can infect humans and cause Chagas disease.

Despite the identification of a differential distribution of lineages in the wild and domiciliary cycles of *T. cruzi* transmission associated with specific aspects of Chagas disease pathology, it is still not possible to establish a precise association between the parasite's lineages or clones and the clinical form of the disease based on the current studies of the parasite's genetic diversity. For instance, as addressed earlier, it is evident that in Brazil the severe human disease is much more associated with *T. cruzi* II strains, although some *T. cruzi* I, *T. cruzi* IV, *T. cruzi* V, and probably *T. cruzi* VI could be eventually involved. However, it is not yet clear what

factors determine the different clinical forms of the disease even in close endemic areas, such as a small villa or even a single dwelling. Although, we cannot discard the influence of patient-associated factors, an important role of the parasite genetics is currently recognized (Vago et al., 1996a,b). Conversely, many studies have been unsuccessful in correlating specific elements of the variability of the parasites with the clinical characteristics of the disease (Morel et al., 1980; Macedo et al., 1992a). One possible explanation for this is that strains of *T. cruzi* represent swarms of clones that may present symbiotic relationships but also compete fiercely for available resources. In addition, due to biological polymorphism, different clones from a strain may present tropism for different tissues (e.g., cardiac muscle, myenteric plexuses in the esophagus and rectum, etc.), and thus an important factor determining the clinical course of disease might be the specific “constellation” of infecting clones in the swarm and their specific tropisms. Because most genetic profiling techniques used for the characterization of *T. cruzi* require parasite isolation from patient blood and growth in laboratory animals or cultures, there are many opportunities for clonal selection, and consequently, the trypanosome populations available for analysis may differ from those actually causing the tissue lesion. This scenario constitutes the core of what we call the “clonal—histotropic model” of Chagas disease (Figure 20.4) (Macedo and Pena, 1998; Macedo et al., 2001, 2002).

The demonstration that it is possible to achieve genetic typing of *T. cruzi* directly from clinical tissues by LSSP-PCR (Vago et al., 1996a,b, 2000; Lages-Silva et al., 2006), rDNA (Burgos et al., 2005, 2007; Freitas et al., 2005), and microsatellite analysis (Burgos et al., 2008; Valadares et al., 2008) provides invaluable tools to study the molecular epidemiology of Chagas disease. For instance, when applied to experimentally double-infected mice with JG and ColI.7G2 populations, these techniques reveal a perfect concordance between the *T. cruzi* DNA profile obtained from the hearts (JG strain pattern) and from the recta (clone ColI.7G2 signature) of the same animals and the type of lesion observed in these respective tissues (Andrade et al., 1999). Similarly, Vago et al. (2000) clearly demonstrated that different *T. cruzi* populations are associated with the heart or esophagus of single patients. Even more notable, parasites from distinct major lineages (a mixture of *T. cruzi* II/V and *T. cruzi* I in peripheral blood and *T. cruzi* I in cerebrospinal fluid) were found in different tissues of the same patient (Burgos et al., 2008). Similarly, Mantilla et al. (2010) clearly demonstrated the presence of *T. cruzi* II in the heart and *T. cruzi* I in the esophagus of the same patient in Colombia, an endemic area where *T. cruzi* I was supposedly the main agent of Chagas disease. In fact, *T. cruzi* II was detected in 25% of the hearts of patients presenting chagasic cardiomyopathy, contrasting to 9% blood samples from the same patients (Mantilla et al., 2010). Taken together, these results undoubtedly demonstrate the necessity of genotyping the parasites directly in the infected tissues for a better understanding of the pathogenesis of Chagas disease.

20.9 The Role of Host Genetics

Studies of the differential tissue distribution of the ColI.7G2 and JG *T. cruzi* populations in BALB/c mice, among others, clearly demonstrate the importance of the

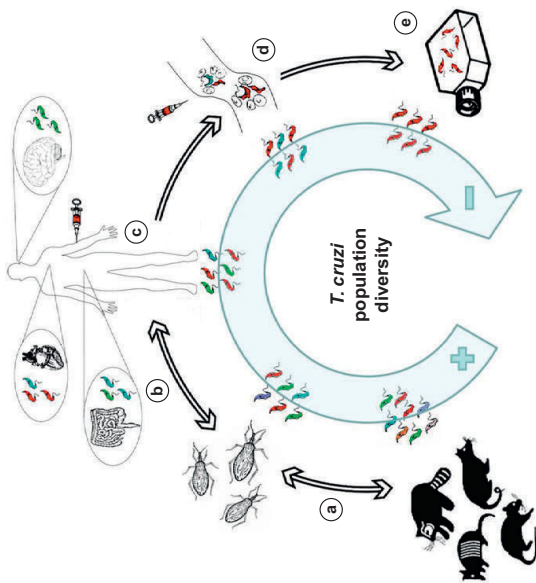


Figure 20.4 Diagram of the clonal-histotropic model of Chagas disease. Most of the natural strains of *T. cruzi* are multiclonal, and the number of clones may change drastically in different environments. (a) In the sylvatic cycle, many different animals are known to be reservoirs, and some triatomines are vectors. Thus, the same hosts may be simultaneously infected by different *T. cruzi* strains due to frequent exposures to insects and to the heterogeneous composition of the *T. cruzi* populations. (b) The passage of the multiclonal population from the invertebrate vector to a human is a particularly stressful situation (e.g., owing to host defense mechanisms). This will select against some parasite clones, thereby decreasing the complexity of the infecting strain in the acute phase. This reduction is even greater in the chronic phase of the infection owing to further elimination of clones, likely as a result of immunological factors or parasite-strain-intrinsic factors (e.g., the multiplication capability, nutritional requirements). Aside from this, different clones from a strain may present (c) tropism for different tissues (cardiac muscle, myenteric plexuses in the esophagus and rectum, etc.), and thus an important factor determining the clinical course of the disease might be the specific “constellation” of infecting clones in the swarm and their specific tropisms. Clonal selection might also occur during (d) parasite isolation and (e) maintenance *in vitro*. Thus, parasites usually submitted to molecular characterization might be different from those directly present in the infected tissues and likely more associated to the different clinical forms of the disease.

parasite genetic background in tissue tropism and lesion formation in Chagas disease (Andrade et al., 1999). Intriguingly, however, the Col1.7G2 clone (isolated from a cardiac patient) showed tropism for smooth muscles in BALB/c mice, whereas the JG strain (isolated from a patient with the digestive form of the disease) showed unequivocal cardiotropism. This could be explained as a result of parasite subpopulation selection during blood collection from the patients (which

may conceivably be different from those actually involved in the host tissue injury) and laboratory culture, as described earlier. However, it is also important to consider host genetic aspects; especially taking into account that parasitism is a result of the interaction of two varying genomes. Therefore, the behavior of parasites in distinct host may be different from each other.

Studies on experimental infection of different isogenic and outbred mice lineages with the Col1.7G2 clone and the JG strain clearly demonstrate a similar tissue distribution in BALB/c and DBA-2 mice but a different distribution in C57BL/6 and Swiss mice. Because BALB/c and DBA-2 lineages share the major histocompatibility complex (MHC) haplotype (H-2d), and the C57BL/6 lineage has a different haplotype (H-2b), it has been hypothesized that the host MHC gene region might influence the differential tissue tropism of *T. cruzi* strains in these mice (Andrade et al., 2002). This hypothesis was later confirmed using different congenic mice lineages (Freitas et al., 2009). Congenic mice are animals generated in the laboratory that present the same genetic backgrounds (BALB/c or C57BL/6 for instance) but differ from each other by a single selected gene region (MHC in this case). By using this strategy, it was irrevocably shown that the predominance of the JG or Col1.7G2 population in the hearts of the mice was dependent on the MHC genes rather than the mice's genetic background. Thus, the hearts of animals presenting the H-2b haplotype always selected for Col1.7G2, whereas the H-2d haplotype continually selected for the JG population. These observations strongly suggest that there is a significant role of host MHC and/or closely associated genes in the differential tissue tropism of *T. cruzi* strains, which in turn may also be an important factor in determining the clinical forms of the Chagas disease in human infections (Freitas et al., 2009).

Certainly, the phenomenon of differential tissue tropism is an effect of interactions between macromolecules on the surface of both parasite and host cells. Many parasite surface antigens have been described as important surface molecules involved in invasion (Burleigh and Andrews, 1995), although little is known about this parasite-host interaction. It is likely that more than one molecule is implicated in this process, and the genetic markers that are most appropriate to ascertain the major host genes determining parasite tropism and virulence remain to be discovered.

Individual variation in immune response efficiency has also been implicated in the genesis of the variability of Chagas disease in humans. Efficient immune responses control the parasite level, limiting the tissue damage, whereas inefficient responses fail to adequately control the parasite burden, thus leading to persistent inflammatory reactions and a more severe clinical condition (Tarleton, 2001).

Different authors have already suggested an influence of the genetic variability of mice in the resistance or susceptibility to *T. cruzi* infection and disease severity (Trischmann et al., 1978; Trischmann and Bloom, 1982; Wrightsman et al., 1982; Rowland et al., 1992). More recently, heterozygosity for the S180L variant of MAL/TIRAP, a gene expressing an adaptor protein in the Toll-like receptor pathway, was associated with a lower risk of humans developing chronic Chagas cardiomyopathy (Ramasamy et al., 2009). Although no specific loci have been firmly identified yet, the MHC locus (Tarleton et al., 1996; Garcia Borrás et al., 2009), production of the transcription factor NF- κ B (Hall et al., 2000), cytokine

levels, and polymorphisms (Bahia-Oliveira et al., 1998; Powell et al., 1998; Umekita and Mota, 2000; Cruz-Robles et al., 2009) have all been implicated in host modulation of *T. cruzi* infection.

Glossary

Biodemes, Biological types, Types classification of *T. cruzi* strains proposed by Andrade (1974) based on the biological parameters of the mouse–parasite interaction, such as parasitaemia, morphology, tissue tropism, and histopathologic lesions (Andrade, 1974; Andrade and Magalhães, 1996).

Clade group of strains that share a common ancestor and thus genetic similarities unraveled by analyses with different genetic markers. For example, Machado and Ayala (2001) based on sequence analyses of different mitochondrial genes defined three clades in *T. cruzi* taxon.

Clone clone is each individual of a whole population that reproduces by binary division and remains unaltered for a great number of generations until mutations occur.

Clonet all the individuals of a clonal species that share a similar profile for a particular set of genetic markers (Tibayrenc and Ayala, 1991).

Discrete typing or taxonomic units (DTUs) defined as sets of stocks that are genetically more related to each other than to any other stock and that are identifiable by common genetic, molecular, or immunological markers (Tibayrenc, 1998; Zingales et al., 2009).

Haplogroup a set of strains that share similar haplotypes.

Haplotype a group of genes within an organism that was inherited together from a single parent and is transmitted stably from generation to generation. In addition, the term "haplotype" can also refer to the inheritance of a cluster of single nucleotide polymorphisms (SNPs), which are variations at single positions in the DNA sequence among individuals.

Lineages group of strains sharing common biological and molecular characteristics that are derived from a single ancestor.

Schizodemes parasite populations displaying identical or similar kDNA minicircle restriction patterns (Morel et al., 1980).

Species the modern concept of a species is that of a population that is simultaneously a reproductive community, an ecological unit, and a genetic unit. Obviously, basically clonal asexual species such as *T. cruzi* cannot be defined in reproductive terms and thus the concept of genetic unity, in the sense of a shared genome, becomes critical.

Stock a microbial line kept in a laboratory, taken originally from a vector or host (often called isolate).

Strains isolates obtained from vectors or hosts which have already been characterized by genetic, molecular, or immunological markers.

Zymodeme a set of stocks that share an identical isoenzyme profile for a given set of enzyme systems (Godfrey and Kilgour, 1976). Zymodeme is the corresponding term for electrophoretic type in the parasitic protozoa literature.

References

Andrade, S.G., 1974. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano: contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio. Rev. Pat. Trop. 3, 65–121.

Andrade, L.O., Machado, C.R., Chiari, E., Pena, S.D., Macedo, A.M., 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. Mol. Biochem. Parasitol. 100, 163–172.

Andrade, L.O., Machado, C.R., Chiari, E., Pena, S.D., Macedo, A.M., 2002. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. Exp. Parasitol. 100, 269–275.

Andrade, S.G., Magalhães, J.B., 1996. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 30, 27–35.

Andrade, V., Brodskyn, C., Andrade, S.G., 1983. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77, 796–799.

Añez, N., Crisante, G., da Silva, F.M., Rojas, A., Carrasco, H., Umezawa, E.S., et al., 2004. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. Trop. Med. Int. Health 9, 1319–1326.

Anonymous, 1999. Recommendations from a satellite meeting. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 (Suppl. 1), 429–432.

Augusto-Pinto, L., Teixeira, S.M., Pena, S.D., Machado, C.R., 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.

Bahia-Oliveira, L.M., Gomes, J.A., Rocha, M.O., Moreira, M.C., Lemos, E.M., Luz, Z.M., et al., 1998. IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? Braz. J. Med. Biol. Res. 31, 127–131.

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

Barrett, T.V., Hoff, R.H., Mott, K.E., Miles, M.A., Godfrey, D.G., Teixeira, R., et al., 1980. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 84–90.

Bogliolo, A.R., Lauria-Prés, L., Gibson, W.C., 1996. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. Acta. Trop. 61, 31–40.

Borst, P., 1986. Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. Annu. Rev. Biochem. 55, 701–732.

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

Bosseno, M.F., Barnabé, C., Magallon Gastelum, E., Lozano Kasten, F., Ramsey, J., Espinoza, B., et al., 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. J. Clin. Microbiol. 40, 627–632.

Brandariz, S., Schijman, A., Vigliano, C., Arteman, P., Viotti, R., Beldjord, C., et al., 1995. Detection of parasite DNA in Chagas' heart disease. Lancet 346, 1370–1371.

Brener, Z., 1965. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 59, 19–26.

Briñones, M.R., Souto, R.P., Stolf, B.S., 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 has implications to pathogenicity and host specificity. Mol. Biochem. Parasitol. 104, 219–232.

- Brisse, S., Barnabé, C., Tibayrenc, M., 2000a. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.* 30, 35–44.
- Brisse, S., Dujardin, J.C., Tibayrenc, M., 2000b. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 95–105.
- Brisse, S., Verhoef, J., Tibayrenc, M., 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J. Parasitol.* 31, 1218–1226.
- Brisse, S., Henriksson, J., Barnabé, C., Douzery, E.J., Berkvens, D., Serrano, M., et al., 2003. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Genet. Evol.* 2, 173–183.
- Burgos, J.M., Begher, S.B., Freitas, J.M., Bisio, M., Duffy, T., Alcheh, J., et al., 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.
- Burgos, J.M., Alcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H.M., Seidenstein, M.E., et al., 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 37, 1319–1327.
- Burgos, J.M., Begher, S., Silva, H.M., Bisio, M., Duffy, T., Levin, M.J., et al., 2008. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 294–297.
- Burleigh, B.A., Andrews, N.W., 1995. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca(2+)-signaling factor for mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270, 5172–5180.
- Buscaglia, C.A., Di Noia, J.M., 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.* 5, 419–427.
- Câmara, A.C.J., Varela-Freire, A.A., Valadares, H.M., Macedo, A., D'Ávila, D.A., Machado, C.R., et al., 2010. Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. *Acta Trop.* 115, 205–211.
- Campbell, D.A., Westenberger, S.J., Sturm, N.R., 2004. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr. Mol. Med.* 4, 549–562.
- Campos, S., 1927. Estudo sobre uma raça neurotrópica de *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Fac. Med. Univ. São Paulo* 2, 197–201.
- Cardinal, M.V., Lauricella, M.A., Ceballos, L.A., Lanati, L., Marcet, P.L., Levin, M.J., et al., 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int. J. Parasitol.* 38, 1533–1543.
- Carneiro, M., Romanha, A.J., Chiari, E., 1991. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86, 387–393.
- Carranza, J.C., Valadares, H.M., D'Ávila, D.A., Baptista, R.P., Moreno, M., Galvão, L.M., et al., 2009. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int. J. Parasitol.* 39, 963–973.
- Carrasco, H.J., Frame, I.A., Valente, S.A., Miles, M.A., 1996. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 418–424.
- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 152–159.

- Chapman, M.D., Baggeley, R.C., Godfrey-Fausset, P.F., Malpas, T.J., White, G., Canese, J., et al., 1984. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *J. Protozool.* 31, 482–486.
- Clark, C.G., Pung, O.J., 1994. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66, 175–179.
- Corrales, R.M., Mora, M.C., Negrette, O.S., Diosque, P., Lacunza, D., Virreira, M., et al., 2009. Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 9, 278–282.
- Coura, J.R., 2006. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39 (Suppl. 3), 113–117.
- Coura, J.R., Barrett, T.V., Naranjo, M.A., 1994. Human populations attacked by wild Triatominae in the Amazonas: a new form of transmission of Chagas disease? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27, 251–254.
- Coura, J.R., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Valente, S.A., Miles, M.A., 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 18, 171–176.
- Cluz-Robles, D., Chavez-Gonzalez, J.P., Cavazos-Quero, M.M., Perez-Mendez, O., Reyes, P.A., Vargas-Alarcon, G., 2009. Association between IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms and Chagas' disease development susceptibility. *Immunol. Invest.* 38, 231–239.
- Cuervo, P., Cupolillo, E., Segura, I., Saravia, N., Fernandes, O., 2002. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 877–880.
- Da Silva, L.H.P., 1959. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo* 6, 188–192.
- D'Ávila, D.A., Macedo, A.M., Valadares, H.M., Gontijo, E.D., de Castro, A.M., Machado, C.R., et al., 2009. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1718–1725.
- De Araujo, S.M., Chiari, E., 1988. Biological characterization of clones of the Y, CL and MR strains of *Trypanosoma cruzi* in inbred C3H mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83, 175–181.
- de Arruda, M.V., Reinach, F.C., Colli, W., Zingales, B., 1990. Sequence of the 24S alpha ribosomal RNA gene and characterization of a corresponding pseudogene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40, 35–41.
- Deane, M.P., Mangia, R.H., Pereira, N.M., Momen, H., Goncalves, A.M., Morel, C.M., 1984. *Trypanosoma cruzi*: strain selection by different schedules of mouse passage of an initially mixed infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 495–497.
- Degrave, W., Fragoso, S.P., Britto, C., van Heuverswyn, H., Kidane, G.Z., Cardoso, M.A., et al., 1988. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 63–70.
- Devera, R., Fernandes, O., Coura, J.R., 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.
- Dias, J.C., 2006. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 370–375.
- Dias, J.C.P., 1992. Epidemiology of Chagas disease. Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine, International Society of Blood Transfusion, Brazil, pp. 49–80.

- Dias, J.P., Bastos, C., Araujo, E., Mascarenhas, A.V., Martins Netto, E., Grassi, F., et al., 2008. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 296–300.
- Dias Neto, E., Steindel, M., Passos, L.K., de Souza, C.P., Rollinson, D., Katz, N., et al., 1993. The use of RAPDs for the study of the genetic diversity of *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma cruzi*. *Exs* 67, 339–345.
- Diosque, P., Barnabe, C., Padilla, A.M., Marco, J.D., Cardozo, R.M., Cimino, R.O., et al., 2003. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. *Int. J. Parasitol.* 33, 997–1003.
- Falla, A., Herrera, C., Fajardo, A., Montilla, M., Vallejo, G.A., Guhl, F., 2009. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta. Trop.* 110, 15–21.
- Fernandes, O., Souto, R.P., Castro, J.A., Pereira, J.B., Fernandes, N.C., Junqueira, A.C., 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, 807–811.
- Fernandes, O., Mangia, R.H., Lisboa, C.V., Pinho, A.P., Morel, C.M., Zingales, B., et al., 1999. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 118 (Pt. 2), 161–166.
- Fernandes, O., Santos, S.S., Cupolillo, E., Mendonca, B., Derre, R., Junqueira, A.C., et al., 2001. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 97–99.
- Freitas, J.M., Lages-Silva, E., Crema, E., Pena, S.D., Macedo, A.M., 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int. J. Parasitol.* 35, 411–417.
- Freitas, J.M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Goncalves, V.F., Teixeira, S.M., et al., 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2, e24.
- Freitas, J.M., Andrade, L.O., Pires, S.F., Lima, R., Chiari, E., Santos, R.R., et al., 2009. The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting *Trypanosoma cruzi* strains. *PLoS One* 4, e5113.
- Garcia Borrás, S., Racca, L., Cotoruelo, C., Biondi, C., Beloscar, J., Racca, A., 2009. Distribution of HLA-DRB1 alleles in Argentinian patients with Chagas' disease cardiomyopathy. *Immunol. Invest.* 38, 268–275.
- Gaunt, M.W., Yeo, M., Frame, L.A., Stothard, J.R., Carrasco, H.J., Taylor, M.C., et al., 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421, 936–939.
- Godfrey, D.G., Kilgour, V., 1976. Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of *Gambian trypanosomiasis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70, 219–224.
- Hall, B.S., Tam, W., Sen, R., Pereira, M.E., 2000. Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. *Mol. Biol. Cell.* 11, 153–160.
- Hanson, W.L., Roberson, E.L., 1974. Density of parasites in various organs and the relation to numbers of trypomastigotes in the blood during acute infections of *Trypanosoma cruzi* in mice. *J. Protozool.* 21, 512–517.
- Heitman, J., 2006. Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Curr. Biol.* 16, R711–725.
- Henderson, S.T., Pets, T.D., 1992. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2749–2757.
- Henriksson, J., Dujardin, J.C., Barnabe, C., Brisse, S., Timperman, G., Venegas, J., et al., 2002. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology* 124, 277–286.
- Hernandez, R., Rios, P., Valdes, A.M., Pintero, D., 1990. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41, 207–212.
- Herrera, C., BARGUES, M.D., Fajardo, A., Montilla, M., Triana, O., Vallejo, G.A., et al., 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect. Genet. Evol.* 7, 535–539.
- Higuichi Mde, L., Gutierrez, P.S., Aiello, V.D., Palomino, S., Bocchi, E., Kalil, J., et al., 1993. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virehows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 423, 157–160.
- Howells, R.E., Chiari, C.A., 1975. Observations on two strains of *Trypanosoma cruzi* in laboratory mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 69, 435–448.
- Jansen, A.M., Santos de Pinho, A.P., Lisboa, C.V., Cupolillo, E., Mangia, R.H., Fernandes, O., 1999. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. 1), 203–204.
- Jones, E.M., Colley, D.G., Tostes, S., Lopes, E.R., Vnencak-Jones, C.L., McCurley, T.L., 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 348–357.
- Kalil, J., Cunha-Neto, E., 1996. Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitol. Today* 12, 396–399.
- Koberle, F., 1968. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 6, 63–116.
- Lages-Silva, E., Ramirez, L.E., Pedrosa, A.L., Crema, E., da Cunha Galvao, L.M., Junho Pena, S.D., et al., 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, 2167–2171.
- Leon, W., Fouts, D.L., Manning, J., 1978. Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res.* 5, 491–504.
- Levinson, G., Gutman, G.A., 1987. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/ATG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 15, 5323–5338.
- Lewicka, K., Breniere-Campaña, S.F., Barnabe, C., Dedet, J.P., Tibayrenc, M., 1995. An isoenzyme survey of *Trypanosoma cruzi* genetic variability in sylvatic cycles from French Guiana. *Exp. Parasitol.* 81, 20–28.
- Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Gaunt, M.W., Yeo, M., Carrasco, H.J., Miles, M.A., 2009a. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *Int. J. Parasitol.* 39, 1305–1317.
- Lewis, M.D., Ma, J., Yeo, M., Carrasco, H.J., Llewellyn, M.S., Miles, M.A., 2009b. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 1041–1049.

- Litt, M., Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 397–401.
- Llewellyn, M.S., Lewis, M.D., Acosta, N., Yeo, M., Carrasco, H.J., Segovia, M., et al., 2009a. *Trypanosoma cruzi* Ilc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e510.
- Llewellyn, M.S., Miles, M.A., Carrasco, H.J., Lewis, M.D., Yeo, M., Vargas, J., et al., 2009b. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog.* 5, e1000410.
- Lopez-Olmos, V., Perez-Nasser, N., Pinero, D., Ortega, E., Hernandez, R., Espinoza, B., 1998. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 69, 239–254.
- Luqueti, A.O., Miles, M.A., Rassi, A., de Rezende, J.M., de Souza, A.A., Povoia, M.M., et al., 1986. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 462–470.
- Macedo, A.M., Pena, S.D., 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today* 14, 119–124.
- Macedo, A.M., Martins, M.S., Chiari, E., Pena, S.D., 1992a. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol.* 55, 147–153.
- Macedo, A.M., Melo, M.N., Gomes, R.F., Pena, S.D., 1992b. DNA fingerprints: a tool for identification and determination of the relationships between species and strains of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53, 63–70.
- Macedo, A.M., Pimenta, J.R., Aguiar, R.S., Melo, A.I., Chiari, E., Zingales, B., et al., 2001. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 407–413.
- Macedo, A.M., Oliveira, R.P., Pena, S.D., 2002. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev. Mol. Med.* 4, 1–16.
- Macedo, A.M., Machado, C.R., Oliveira, R.P., Pena, S.D., 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 1–12.
- Macedo, A.M., Rodrigues, C.M., Oliveira, R.P., Franco, G.R., Machado, C.R., Pena, S.D.J., et al., 2010. Contribution of *Trypanosoma cruzi* polymorphic microsatellite analyses in refining epidemiology aspects of Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop. in press.*
- Machado, C.A., Ayala, F.J., 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7396–7401.
- Mantilla, J.C., Zafra, G., Macedo, A.M., González, C.I., 2010. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Hum. Pathol.* 41, 610–613.
- Marceli, A., Lima, L., Valente, V.C., Valente, S.A., Batista, J.S., Junqueira, A.C., et al., 2009. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TC1c: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect. Genet. Evol.* 9, 1265–1274.
- Martins, L.P., Marcelli, A., Castanho, R.E., Therezo, A.L., de Oliveira, J.C., Suzuki, R.B., et al., 2008. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage Ilc. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 427–434.

- Melo, R.C., Brenner, Z., 1978. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.* 64, 475–482.
- Mendonça, M.B., Nehme, N.S., Santos, S.S., Cupolillo, E., Vargas, N., Junqueira, A., et al., 2002. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology* 124, 177–184.
- Miles, M.A., Toye, P.J., Oswald, S.C., Godfrey, D.G., 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.
- Miles, M.A., Souza, A., Povoia, M., Shaw, J.J., Lainson, R., Toye, P.J., 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272, 819–821.
- Miles, M.A., Lanham, S.M., de Souza, A.A., Povoia, M., 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 221–237.
- Miles, M.A., Cedillos, R.A., Povoia, M.M., de Souza, A.A., Prata, A., Macedo, V., 1981a. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet* 1, 1338–1340.
- Miles, M.A., de Souza, A.A., Povoia, M., 1981b. Chagas' disease in the Amazon basin III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belem, Para State, Brazil. *J. Med. Entomol.* 18, 266–278.
- Miles, M.A., Feliciangeli, M.D., de Arias, A.R., 2003. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMI* 326, 1444–1448.
- Miles, M.A., Llewellyn, M.S., Lewis, M.D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., et al., 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 136, 1509–1528.
- Momen, H., 1999. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. 1), 181–184.
- Montilla, M.M., Guhl, F., Jaramillo, C., Nicholls, S., Barnabe, C., Bosseno, M.F., et al., 2002. Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 394–400.
- Morel, C., Chiari, E., Camargo, E.P., Mattei, D.M., Romanha, A.J., Simpson, L., 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6810–6814.
- Murthy, V.K., Dibbern, K.M., Campbell, D.A., 1992. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Mol. Cell. Probes* 6, 237–243.
- Nunes, L.R., de Carvalho, M.R., Buck, G.A., 1997. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86, 211–224.
- O'Connor, O., Bosseno, M.F., Barnabe, C., Douzery, E.J., Breniere, S.F., 2007. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic minixon gene sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 7, 587–593.
- Oliveira, R.P., Macedo, A.M., Chiari, E., Pena, S.D., 1997. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. *Parasitol. Today* 13, 196–200.
- Oliveira, R.P., Broude, N.E., Macedo, A.M., Cantor, C.R., Smith, C.L., Pena, S.D., 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3776–3780.

- Oliveira, R.P., Melo, A.I., Macedo, A.M., Chiari, E., Pena, S.D., 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.
- Palacios-Pru, E., Carrasco, H., Scorza, C., Espinoza, R., 1989. Ultrastructural characteristics of different stages of human chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 29–40.
- Pena, S.D., Barreto, G., Vago, A.R., De Marco, L., Reinach, F.C., Dias Neto, E., et al., 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.
- Pimenta, J.R., 2002. Análises Filogenéticas Populacionais em *T. cruzi* à Partir de Estudos de Microsatélites Polimórficos de DNA. Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 149 p.
- Povoa, M.M., de Souza, A.A., Naiff, R.D., Arias, J.R., Naiff, M.F., Biancardi, C.B., et al., 1984. Chagas' disease in the Amazon basin IV. Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the states of Amazonas and Rondonia, Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78, 479–487.
- Powell, M.R., Morgan, J., Guamer, J., Colley, D.G., 1998. Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 20, 463–471.
- Prata, A., 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* 1, 92–100.
- Ramasamy, R., Cunha-Neto, E., Fae, K.C., Borba, S.C., Teixeira, P.C., Ferreira, S.C., et al., 2009. Heterozygosity for the S180L variant of MAL/TRAP, a gene expressing an adaptor protein in the Toll-like receptor pathway, is associated with lower risk of developing chronic Chagas cardiomyopathy. *J. Infect. Dis.* 199, 1838–1845.
- Revollo, S., Oury, B., Laurent, J.P., Barnabe, C., Quesney, V., Carriere, V., et al., 1998. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp. Parasitol.* 89, 30–39.
- Riedy, M.F., Hamilton 3rd, W.J., Aquadro, C.F., 1992. Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucleic Acids Res.* 20, 918.
- Roellig, D.M., Brown, E.L., Barnabe, C., Tibayrenc, M., Steurer, F.J., Yabsley, M.J., 2008. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1123–1125.
- Rowland, E.C., Lozykowski, M.G., McCormick, T.S., 1992. Differential cardiac histopathology in inbred mouse strains chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 78, 1059–1066.
- Rozas, M., De Doncker, S., Adauí, V., Coronado, X., Barnabe, C., Tibayrenc, M., et al., 2007. Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment-length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. *J. Infect. Dis.* 195, 1381–1388.
- Schmuñis, G.A., 1987. Autoimmunity in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, 287–310.
- Shikanai-Yasuda, M.A., Marcondes, C.B., Guedes, L.A., Siqueira, G.S., Barone, A.A., Dias, J.C., et al., 1991. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 33, 351–357.
- Simpson, L., 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 363–382.
- Souto, R.P., Zingales, B., 1993. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62, 45–52.

- Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., Zingales, B., 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 141–152.
- Spotorno, O.A., Cordova, L., Solari, I.A., 2008. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* subgroups through characterization of cytochrome *b* gene sequences. *Infect. Genet. Evol.* 8, 898–900.
- Steindel, M., Dias Neto, E., de Menezes, C.L., Romanha, A.J., Simpson, A.J., 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60, 71–79.
- Steindel, M., Kramer Pacheco, L., Scholl, D., Soares, M., de Moraes, M.H., Eger, I., et al., 2008. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60, 25–32.
- Stolf, B.S., Souto, R.P., Pedrosa, A., Zingales, B., 2003. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 73–80.
- Sturm, N.R., Campbell, D.A., 2010. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 115, 35–43.
- Sturm, N.R., Degraeve, W., Morel, C., Simpson, L., 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 205–214.
- Sturm, N.R., Vargas, N.S., Westenberger, S.J., Zingales, B., Campbell, D.A., 2003. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 33, 269–279.
- Taliaferro, W.H., Pizzi, T., 1955. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotrophic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 96, 199–226.
- Tarleton, R.L., 2001. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 31, 550–554.
- Tarleton, R.L., Grusby, M.J., Postan, M., Glimcher, L.H., 1996. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int. Immunol.* 8, 13–22.
- Teixeira, A.R., Nascimento, R.J., Sturm, N.R., 2006. Evolution and pathology in chagas disease—a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 463–491.
- Tibayrenc, M., 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.* 36, 47–115.
- Tibayrenc, M., 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* 28, 85–104.
- Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 1987. High correlation between isoenzyme classification and kinetoplast DNA variability in *Trypanosoma cruzi*. *C. R. Acad. Sci. III* 304, 89–92.
- Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 1988. Isoenzyme variability of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomic and epidemiological significance. *Evolution* 42, 277–292.
- Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 1991. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol. Today* 7, 228–232.
- Tibayrenc, M., Miles, M.A., 1983. A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 76–83.
- Tibayrenc, M., Hoffmann, A., Poch, O., Echalar, L., Le Pont, F., Lemesre, J.L., et al., 1986a. Additional data on *Trypanosoma cruzi* isozymic strains encountered in Bolivian domestic transmission cycles. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 442–447.

- Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabe, C., Guerrini, F., Skarecky, D., Ayala, F.J., 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1335–1339.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., Ayala, F.J., 1986b. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multilocus structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 115–119.
- Tomazi, L., Kawashita, S.Y., Pereira, P.M., Zingales, B., Britones, M.R., 2009. Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic. *Genet. Mol. Res.* 8, 458–476.
- Trischmann, T., Tanowitz, H., Wittner, M., Bloom, B., 1978. *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 45, 160–168.
- Trischmann, T.M., Bloom, B.R., 1982. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 35, 546–551.
- Umekita, L.F., Mota, I., 2000. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 253–258.
- Vago, A.R., Macedo, A.M., Adad, S.J., Reis, D.D., Correa-Oliveira, R., 1996a. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* 348, 891–892.
- Vago, A.R., Macedo, A.M., Oliveira, R.P., Andrade, L.O., Chiari, E., Galvao, L.M., et al., 1996b. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.* 149, 2153–2159.
- Vago, A.R., Andrade, L.O., Leite, A.A., d'Avila Reis, D., Macedo, A.M., Adad, S.J., et al., 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.* 156, 1805–1809.
- Valadares, H.M., Pimenta, J.R., Freitas, J.M., Duffy, T., Bartholomeu, D.C., Oliveira Rde, P., et al., 2008. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int. J. Parasitol.* 38, 839–850.
- Valadares, H.M.S., 2007. Análises populacionais em *Trypanosoma cruzi* baseadas em microsatélites polimórficos de DNA. Phd thesis. Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 170 p.
- Valente, S.A., da Costa Valente, V., das Neves Pinto, A.Y., de Jesus Barbosa Cesar, M., dos Santos, M.P., Miranda, C.O., et al., 2009. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 291–297.
- Venegas, J., Conoepan, W., Pichuanes, S., Miranda, S., Jercic, M.L., Gajardo, M., et al., 2009. Phylogenetic analysis of microsatellite markers further supports the two hybridization events hypothesis as the origin of the *Trypanosoma cruzi* lineages. *Parasitol. Res.* 105, 191–199.
- Vianna, G., 1911. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3, 199–226.
- Virreira, M., Alonso-Vega, C., Solano, M., Jijena, J., Brutus, L., Bustamante, Z., et al., 2006a. Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 871–879.
- Virreira, M., Serrano, G., Maldonado, L., Svoboda, M., 2006b. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub)lineages in megacolon samples from Bolivian patients. *Acta Trop.* 100, 252–255.
- Virreira, M., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Brutus, L., Jijena, J., Torrico, F., et al., 2007. Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 102–106.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213–7218.
- Westenberger, S.J., Bamabe, C., Campbell, D.A., Sturm, N.R., 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171, 527–543.
- Widmer, G., Marinakelle, C.J., Guhl, F., Miles, M.A., 1985. Isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* stocks from Colombia and Ecuador. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 79, 253–257.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531–6535.
- Wrightsmann, R., Krassner, S., Watson, J., 1982. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infect. Immun.* 36, 637–644.
- Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sanchez, H., Adamson, S., Miles, G.A., et al., 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int. J. Parasitol.* 35, 225–233.
- Yeo, M., Lewis, M.D., Carrasco, H.J., Acosta, N., Llewellyn, M., da Silva Valente, S.A., et al., 2007. Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. *Int. J. Parasitol.* 37, 111–120.
- Zafra, G., Mantilla, J.C., Valadares, H.M., Macedo, A.M., Gonzalez, C.I., 2008. Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian chagasic patients. *Parasitol. Res.* 103, 731–734.
- Zhang, Q., Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 1988. Linkage disequilibrium in natural populations of *Trypanosoma cruzi* (flagellate), the agent of Chagas' disease. *J. Protozool.* 35, 81–85.
- Zingales, B., Pereira, M.E., Almeida, K.A., Umezawa, E.S., Nehme, N.S., Oliveira, R.P., et al., 1997. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener—the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 811–814.
- Zingales, B., Souto, R.P., Mangia, R.H., Lisboa, C.V., Campbell, D.A., Coura, J.R., et al., 1998. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int. J. Parasitol.* 28, 105–112.
- Zingales, B., Stolf, B.S., Souto, R.P., Fernandes, O., Britones, M.R., 1999. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. 1), 159–164.
- Zingales, B., Andrade, S.G., Britones, M.R., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., et al., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054.

**CAPÍTULO 3 - A estrutura populacional e
filogenia do *T. cruzi***

3.1. Teoria da evolução clonal

Durante muitos anos, prevaleceu a ideia de que a estrutura populacional do *T. cruzi* seria predominantemente clonal (Tibayrenc et al., 1986b), que leva as populações a evoluírem geograficamente isoladas, acumulando mutações discretas e características próprias. De acordo com esta teoria, fica implícito que troca genética é um evento ausente ou raro em *T. cruzi* e de pouca ou nenhuma importância epidemiológica (Tibayrenc and Ayala, 1991; 2002).

Análises de genética de população, baseadas em polimorfismos de proteínas e do DNA, a partir de amostras oriundas de localidades geográficas dispersas, 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, em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW). Além disso, foi observado um forte desequilíbrio de ligação (LD) entre marcadores genéticos independentes. Esses achados levaram a proposição de um modelo de estrutura predominantemente clonal para as populações de *T. cruzi* (Tibayrenc and Ayala, 2002).

Esse modelo tem sido amplamente aceito pela comunidade científica, e se baseia na ausência de panmixia nas populações estudadas, em que o *T. cruzi* se reproduz predominante por divisões binárias. Por consequência, o seu genótipo nuclear diplóide é transmitido *en bloc* para a prole, o que provavelmente resulta na presença de desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg, no desequilíbrio de ligação e no conceito de que os descendentes são geneticamente idênticos aos pais observados (Brisse et al., 2000; de Freitas et al., 2006; Macedo et al., 2001; Oliveira et al., 1998; Rougeron et al., 2010; Tibayrenc, 1995; Tibayrenc and Ayala, 1987; Tibayrenc et al., 1993; Tibayrenc et al., 1986b).

É importante ressaltar também que, embora esse tipo de reprodução em *T. cruzi* ainda seja considerado predominante, existe, nos hospedeiros invertebrados e vertebrados, uma grande diversidade de populações. A oportunidade de interação entre estes diferentes indivíduos pode favorecer o surgimento de diversidade genética entre essas populações a partir de eventos de hibridização (Macedo & Pena, 1998). A proposta da ocorrência de tais eventos tem sido considerada, desde eventos raros (de Freitas et al., 2006; Tomazi et al., 2009; Venegas et al., 2009; Westenberger et al., 2005) a, até mesmo, eventos crípticos e altamente frequentes (Carranza et al., 2009).

3.2. A origem das cepas híbridas de *T. cruzi*

A ocorrência de cepas híbridas em populações naturais de *T. cruzi* sugere que eventos sexuais definitivamente tiveram lugar pelo menos no passado e contribuíram de forma significativa para a estrutura genética das atuais populações de *T. cruzi*. A maior parte das evidências destes eventos baseava-se na identificação de cepas híbridas naturais putativas por estudos de genes individuais (Bogliolo et al., 1996; Brisse et al., 2003; Carrasco et al., 1996; Machado and Ayala, 2001; Souto et al., 1996; Sturm et al., 2003). Quando essas evidências foram descritas, concordou-se que esse modelo de reprodução assexuada determinado por estudos de genética de população, não deveriam excluir a presença de eventos de recombinação ocasional.

Em 2003, foi experimentalmente demonstrada a capacidade de *T. cruzi* de realizar trocas genéticas (Gaunt et al., 2003). Através da seleção artificial de parasitos recombinantes resistentes a drogas, foi demonstrada a fusão dos genótipos nucleares parentais via um mecanismo pouco usual de fusão nuclear; formação de uma progênie poliplóide, que pode sofrer recombinação entre alelos e que, após perda cromossômica, pode retornar ao estado diplóide (Gaunt et al., 2003; Lewis et al., 2009a). Este processo assemelha-se ao processo parassexual observado em fungos (Heitman, 2006). O período de tempo requerido para o regresso ao estado diplóide é desconhecido. Híbridos experimentais de *T. cruzi* parecem ser aneuplóides, contendo 1,65 - 1,72 vezes mais DNA do que as células parentais (Gaunt et al., 2003; Lewis et al., 2009a). Curiosamente, em todos os casos, observou-se a ausência de fusão do DNA mitocondrial, sugerindo um modelo de recombinação no qual um dos parentais é o “doador”, que contribui apenas com material nuclear e o outro o “receptor”, que mantém o seu DNA do cinetoplasto. Assim, as cepas híbridas naturais derivadas da mesma linhagem evolutiva terão o mesmo tipo de DNA mitocondrial (de Freitas et al., 2006; Machado and Ayala, 2001). Interessantemente, Freitas *et al.*, 2006 demonstraram que todas as cepas híbridas naturais, até então analisadas, eram resultantes de dois eventos distintos de hibridização, envolvendo populações das linhagens TcII e TcIII, sendo esta última sempre a população receptora, que mantém o DNA mitocondrial.

No entanto, o filogenia do taxon *T. cruzi* está longe de ser completamente entendida. Como foi o surgimento de cada uma destas linhagens, quais são ancestrais e quais são híbridas são perguntas que ainda não foram respondidas. Nesse aspecto, existem atualmente duas

teorias principais em debate na literatura. Todavia, o que se observa é que, dependendo dos marcadores moleculares utilizados e dos métodos empregados na construção das árvores filogenéticas, diferentes histórias evolucionárias são reconstruídas (de Freitas et al., 2006; Sturm et al., 2003; Westenberger et al., 2005).

A primeira teoria propõe a ocorrência de pelo menos dois grandes eventos de hibridização: o primeiro deles teria sido entre as linhagens parentais TcI e TcII, originando TcIII e TcIV; o segundo evento de hibridização teria sido entre TcII e TcIII, dando origem a TcV e TcVI (Westenberger et al., 2005) (Figura 3.1A). A segunda teoria afirma a existência de pelo menos três linhagens parentais: TcI, TcII e TcIII; e que as linhagens híbridas TcV e TcVI tenham sido geradas a partir de dois eventos de hibridização que ocorreram TcII e TcIII. Nessa proposta, a posição do DTU TcIV não foi avaliada (de Freitas et al., 2006) (Figura 3.1B).

Lewis et al. (2011) utilizando-se de análises de 35 *loci* de microssatélites e de sequências dos genes mitocondriais, obtiveram resultados que reforçam a ideia de que TcII e TcIII são as linhagens parentais dos DTUs TcV e TcVI. Nosso grupo de pesquisa, com base em análises de similaridade de sequências do genoma mitocondrial, demonstrou, recentemente, que TcI e TcII são igualmente distantes de TcIII, apoiando a hipótese de que TcIII é uma linhagem parental (Valle et al., dados não publicados). Ainda, por análises filogenéticas encontramos indícios de TcII foi a primeira linhagem a se diferenciar do ancestral comum, e que a “Eva mitocondrial” do táxon de *T. cruzi* é uma cepa TcIII.

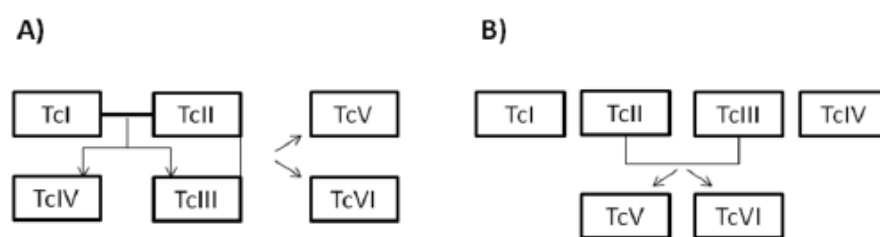


Figura 3.1: Teorias sobre a origem dos DTUs de *T. cruzi*. A) hipótese que considera duas linhagens parentais e pelo menos dois eventos de hibridização envolvendo DTUs distintos (Westenberger et al., 2005). B) hipótese que considera a existência de pelo menos três linhagens parentais e dois eventos de hibridização independentes, envolvendo os DTUs TcII e TcIII (de Freitas et al., 2006) (Valle, 2012).

Ambas as teorias têm em comum o fato de que TcV e TcVI se originaram a partir de TcII e TcIII, por eventos de hibridização. A principal diferença entre essas correntes está na origem de TcIII. A primeira teoria propõe que este DTU, assim como TcIV, é híbrida das linhagens TcI e

TcII, enquanto a segunda sugere que TcIII é um DTU ancestral, originado independentemente de TcI ou TcII. Mais estudos serão necessários para esclarecer este ponto.

3.3. Evidência de recombinação entre cepas *T. cruzi* II provenientes de Minas Gerais

Apesar do progresso considerável na genética evolutiva do *T. cruzi*, ainda há muita discussão sobre sua estrutura populacional e seu modo reprodutivo. Um ponto de nosso particular interesse é avaliar a presença de recombinação sexuada entre as cepas de *T. cruzi*.

Embora algumas observações já tenham sido feitas sobre este tipo de reprodução, muitas perguntas ainda precisam ser respondidas com objetivo de verificar a ocorrência e a frequência de recombinação no *T. cruzi*. Um fato que nos chama atenção é a detecção de um excesso de homozigotos em detrimento de heterozigotos, verificado nas diferentes populações deste parasito, que contrasta com a expectativa para populações essencialmente clonais. Em organismos assexuais diplóides, como *T. cruzi*, os dois alelos evoluem independentemente por acúmulo de mutações e tendem, portanto, a um aumento da proporção de indivíduos heterozigotos na população, efeito conhecido como “Efeito Meselson” (Macedo et al., 2004; Machado et al., 2006).

Outra dificuldade em avaliar a presença de recombinação sexuada entre as cepas de *T. cruzi* encontra-se nos desenhos experimentais. Como na maioria dos trabalhos publicados, até então, as análises realizadas partem de comparações entre populações isoladas de diferentes regiões geográficas e a possibilidade de efeito Wahlund como gerador de desequilíbrio de Hardy-Weiberg não pode ser descartada (Poulin and Morand, 1999; Wahlund, 1928). De acordo com Wahlund, havendo uma grande distância geográfica ou qualquer impedimento de encontro entre as populações analisadas, a chance de recombinação entre elas será pequena ou nula. No entanto, tendo em conta as populações de mesma linhagem e pertencentes a uma única região geográfica ou próxima, havendo uma maior probabilidade de encontro entre estas populações e possivelmente maior frequência de eventos de recombinação.

Para avaliar se o isolamento geográfico estaria mascarando ou impedindo a recombinação entre cepas de *T. cruzi*, nós nos propusemos a realizar as principais análises de genética de população, que embasam a teoria clonal, a partir dos dados obtidos com marcadores moleculares nucleares e mitocondriais de dois grupos de isolados. O primeiro

grupo amostral estudado foi composto de 88 amostras de parasitos caracterizados como TcII isolados de pacientes provenientes de diferentes estados brasileiros e países da América Latina. O segundo grupo amostral foi constituído de 75 isolados TcII de pacientes procedentes exclusivamente de Minas Gerais (MG). Os marcadores moleculares selecionados para este estudo foram 5 marcadores do genoma nuclear e 2 do genoma mitocondrial.

A hipótese nula testada foi que, se a estrutura da população era essencialmente clonal, deveríamos observar desvio do equilíbrio de HW e associação nítida entre os *clusters* obtidos através da análise de ambos os genomas (mitocondrial e nuclear) nos dois grupos amostrais, independentemente da origem geográfica dos isolados.

Os resultados demonstraram que o número de *loci* em desequilíbrio de ligação reduziu de 4 para 1 quando apenas as cepas de MG foram analisadas. Além disso, não se observou neste último grupo de isolados qualquer correlação entre os agrupamentos obtidos pela análise de *loci* nucleares e mitocondriais, sugerindo herança independente entre esses marcadores para os isolados de MG. Dessa forma nossos resultados não suportam uma estrutura populacional essencialmente clonal para o *T.cruzi* e sugerem que, pelo menos para as populações TcII coexistindo numa mesma área geográfica, as trocas genéticas entre as cepas são muito mais frequentes do que inicialmente esperado. Esses achados não foram encontrados em outros trabalhos, provavelmente, devido a composição amostral de isolados geograficamente distantes uns dos outros. Esse trabalho foi desenvolvido em colaboração com o aluno de doutorado da Bioinformática Rodrigo Baptista e de pós doutorado Daniella D'Ávila (**PUBLICAÇÃO 2**).

3.4. Constituição Multiclinal de populações de *T. cruzi*

As cepas de *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 multiclinais em hospedeiros e vetores, levando ocasionalmente ao isolamento de populações multiclinais quando crescidas em meio de cultura nos laboratórios (Macedo and Pena, 1998).

Sabe-se que grande parte das cepas naturais de *T. cruzi* são multiclonais, ou seja, composta por misturas de diferentes clones. E isso já foi demonstrado experimentalmente por diferentes métodos moleculares (Carneiro et al., 1990; De Araujo and Chiari, 1988; Deane et al., 1984; Macedo et al., 1992; Morel et al., 1980; Tibayrenc et al., 1986a). No entanto, as estratégias utilizadas para a manutenção destes parasitos em laboratório tendem a diminuir a complexidade da cepa original.

O isolamento e a caracterização de microssatélites em *T. cruzi* permitiu que a constituição multiclonal de algumas cepas deste parasito fosse mais bem 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 et al., 1997).

Baseados em análises de microssatélites, Oliveira *et al.* (1997, 1998) e Pimenta (2002) demonstraram que algumas cepas de *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. 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 de *T. cruzi* (revisado por Macedo *et al.*, 2004).

Mais ainda, a análise de microssatélites indicou que a porcentagem de populações multiclonais diminui progressivamente quando são comparadas cepas do ciclo silvestre com aquelas isoladas de humanos, apoiando a ideia de o hospedeiro humano atuar com um filtro que seleciona cepas mais adaptadas (Macedo and Pena, 1998). Normalmente menos de 10% das cepas isoladas de humano na fase crônica da infecção são policlonais, comparado a cerca de 60% de populações multiclonais isoladas de vetores silvestres da região Amazônica (Macedo et al., 2004). Também com o auxílio dos microssatélites, Llewellyn *et al.* (2011) revelaram que mesmo dentro de um único mamífero pode haver uma série notável de genótipos mistos.

Uma vez demonstrado que algumas cepas de *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 de *T. cruzi* presentes (Dvorak et al., 1982; Pinto et al., 1998; Postan et al., 1984). 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, faz com que alguns clones sejam sub-representados ou, muitas vezes, nem sejam isolados. Além da diluição limitante, outros procedimentos são utilizados como a micromanipulação e clonagem em placas de ágar sangue, mas apresentam as mesmas limitações já comentadas. Outro ponto negativo é que estas técnicas consomem muito tempo, são laboriosas e produzem um baixo número de clones.

Pimenta (2002) demonstrou que a separação de células de *T. cruzi* através do FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*) é uma tecnologia que ajuda a contornar estes problemas. O *T. cruzi* tem uma fluorescência intrínseca que permite a separação das células, uma a uma, nos poços de placas de 96 wells. Assim os isolados poderiam ser separados para análise individual e sem a necessidade de cultivo. Para testar esta estratégia, os autores analisaram populações artificialmente heterogêneas do parasito, e conseguiram identificar, indubitavelmente, os diferentes clones presentes nesta população mista.

A técnica de separação das diferentes sub-populações que compõem as cepas de *T. cruzi* por FACS é uma ferramenta poderosa que permite responder muitas perguntas até então insolúveis, tais como: Quantos clones geneticamente diferente do parasita constituem uma cepa multiclonal? Os clones que pertencem a diferentes linhagens podem coexistir em uma única cepa? Qual a porcentagem de cada clone na cepa original? A cepa avaliada é multiclonal ou trata-se, na realidade, de uma cepa aneuplóide? A resposta para todas essas perguntas abre novas perspectivas para estudos populacionais no parasita.

A fim de verificar se era possível identificar os clones presentes em isolados naturais supostamente multiclonais, nós unimos a estratégia da separação de células com FACS à

sensível abordagem de amplificação da PCR *nested* (**PUBLICAÇÃO 3**). As células foram genotipadas utilizando dois marcadores genômicos polimórficos e quatro *loci* de microsatélites. Nós avaliamos essa metodologia utilizando quatro populações de *T. cruzi*: uma população controle formada pela mistura artificial de duas populações monoclonais - Silvio X10 cl1 (Tcl) e cl3 Esmeraldo (Tcll), e três cepas naturais, uma isolada de vetor (A316A R7) e outras duas isoladas do primeiro caso humano da doença de Chagas (Berenice).

Através desta abordagem inovadora, fomos capazes de descrever com sucesso a complexidade dessas cepas naturais, revelando o seu carácter multiclinal. Além disso, nossos resultados demonstram que essas populações de *T. cruzi* são formados por mais clones do que o inicialmente esperado. O método também permitiu a estimativa da proporção de cada sub-população das cepas testadas. Esta estratégia de genotipagem de uma única célula permitiu a análise da diversidade intrapopulacional em um nível de detalhe nunca conseguido anteriormente, e surge como uma metodologia de grande utilidade para melhorar a nossa compreensão da estrutura e dinâmica populacional do *T. cruzi*. Esse trabalho foi desenvolvido em colaboração com dois outros então alunos de doutorado: Juliana Pimenta e Helder Valadares.

3.5. Publicações relacionadas ao Capítulo

3.5.1. PUBLICAÇÃO 2

Baptista RP, D'Ávila DA, **Segatto M**, Valadares HMS, Gontijo ED, Galvão LMC, Chiari E, Franco GR, Machado CR, Macedo AM. (2013) Evidence of Substantial Recombination Among *Trypanosoma cruzi* II Strains From Minas Gerais (manuscrito submetido à Infection, Genetics and Evolution).

3.5.2. PUBLICAÇÃO 3

Valadares HMS, Pimenta JR, **Segatto M**, Veloso VM, Gomes ML, et al. (2012) Unequivocal Identification of Subpopulations in Putative Multiclinal *Trypanosoma cruzi* Strains by FACS Single Cell Sorting and Genotyping. PLoS Negl Trop Dis 6(7): e1722.

Evidence of Substantial Recombination Among *Trypanosoma cruzi* II Strains From Minas Gerais

Rodrigo de Paula Baptista^a, Daniella Alchaar D'Ávila^b, Marcela Segatto^a, Glória Regina Franco^a,
Helder Magno Silva Valadares^c, Eliane Dias Gontijo^d, Lúcia Maria da Cunha Galvão^{b,e}, Sérgio
Danilo Junho Pena^a, Egler Chiari^b, Andréa Mara Macedo^{a*}, Carlos Renato Machado^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^bDepartamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais,
Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^cUniversidade Federal de São João del-Rey, Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Divinópolis, Minas
Gerais, Brazil.

^dDepartamento de Medicina Preventiva e Social, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas
Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^eCentro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do
Norte, Brazil.

*Co-corresponding authors:

Laboratório de Genética Bioquímica
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
andrea@icb.ufmg.br and crmachad@icb.ufmg.br

Abstract

Trypanosoma cruzi is currently classified into six Discrete Taxonomic Units, TcI-TcVI, in which TcII and its derived hybrids (TcV and TcVI) are associated with severe cases of Chagas disease in Southern Cone countries. Despite considerable progress made in the ecoepidemiology of these parasites, the population structure and reproductive mode of *T. cruzi* remain under considerable debate. Due to the scarcity of evidence of sexuality in *T. cruzi*, it has been gradually accepted that the parasite reproduction is essentially clonal with infrequent genetic recombination. This assumption is mainly supported by indirect evidence, such as Hardy-Weinberg imbalances, linkage disequilibrium and a strong correlation between independent sets of genetic markers of *T. cruzi* populations. However, because the analyzed populations are usually isolated from different geographic regions, the possibility of population structuring as generating these genetic marker imbalances cannot be eliminated. To investigate this possibility, we compared the allele frequencies and haplotype networks using seven different polymorphic loci (five nuclear and two mitochondrial) in two groups of TcII strains: one including 88 analyzed isolates obtained from different regions in Latin America and the other including 75 isolates obtained only from

patients of the Minas Gerais State in Brazil. The null hypothesis was that the population structure is essentially clonal; therefore, Hardy-Weinberg disequilibrium and a sharp association between the clusters generated by analyzing independent markers should be observed in both strain groups, independent of the geographic origin of the samples. Our results demonstrated that the number of microsatellite loci in linkage disequilibrium decreased from 4 to 1 when only strains from Minas Gerais were analyzed. Moreover, we did not observe any correlation between the clusters when analyzing the nuclear and mitochondrial loci, suggesting independent inheritance of these markers among the Minas Gerais strains. Taken together, our results do not support a clonal population structure for *T. cruzi*, particularly in TcII, which coexists in the same geographical area, suggesting that genetic exchanges among these strains occurred more frequently than initially expected.

1. Introduction

Trypanosoma cruzi, the casual agent of Chagas disease, is a heterogeneous species as extensively demonstrated in several biological, biochemical, and molecular studies (Devera et al., 2003; Macedo and Pena, 1998; Macedo et al., 2001). The creative nomenclature assigned to the various groups of *T. cruzi* reflects the unique biology of this parasite, and for along time in the literature, subgroups of *T. cruzi* were divided into different categories. Since 2009, to standardize the taxon nomenclature, the *T. cruzi* strains have been divided into six discrete taxonomic units (DTUs), TcI-TcVI (Zingales et al., 2009), in which TcII and its direct derived hybrids, TcV and TcVI, seem to be associated with more severe cases of Chagas disease in Southern Cone countries.

Despite considerable progress in cellular and molecular biology and in evolutionary genetics within recent decades, the debate regarding the population structure and reproductive mode of *T. cruzi* is far from being settled. The current theory, which is known as “the clonal theory of parasitic protozoa”, was proposed by Tibayrenc and Ayala in 1990, which stated that *T. cruzi* and other protozoans undergo predominant clonal propagation with very little, if any, sexuality (Tibayrenc et al., 1990). For many years, the primary basis of this theory has been the observation of large deviations from Hardy-Weinberg (H-W) expectation and the apparent linkage disequilibrium (LD) between genotypes at different loci, some of which involved genomic separate compartments, such as the nucleus and mitochondria (Tibayrenc and Ayala, 2002).

Although prevalent in the literature, the clonal hypothesis has been challenged by many authors, principally because *T. cruzi* reproduction was considered asexual in view of the absence of panmixia, and the observed diversity has been explained on the basis of clusters of multiclonal

variants (Tibayrenc et al., 1991; Tibayrenc et al., 1986). However, the absence of panmixia does not exclude genetic recombination, and different techniques can detect different levels of heterozygosity (Bastien et al., 1992).

Conflicting findings obtained by our and other groups questioned the extent of this theory. Using microsatellite markers to study *T. cruzi* populations, we observed systematic deviations between the genotypic and allelic frequency expected by Hardy-Weinberg equilibrium. However, unlike an excess of heterozygosity that is naturally expected in populations where recombination events are rare, an excess of homozygosity was observed (Balloux et al., 2003; Bengtsson, 2003; Oliveira et al., 1998). These findings were inconsistent with a population of parasites operating under an essentially clonal reproduction because asexual organisms exhibit the Meselson Effect: in the absence of sexual recombination, the two alleles of a given locus evolve independently of each other, and after a long time, the diversity between the two alleles is increased, thus increasing the heterozygosity (Mark Welch and Meselson, 2000).

Moreover, if the reproductive mode of *T. cruzi* is essentially clonal, how could one explain the origin of hybrid strains? The occurrence of genetic exchange in *T. cruzi* by homologous recombination has been controversial over the years, ranging from absolute clonality (Tibayrenc et al., 1986) to rare and discrete hybridization events (de Freitas et al., 2006; Tomazi et al., 2009; Venegas et al., 2009; Westenberger et al., 2005) to a high-frequency, cryptic event (Carranza et al., 2009). However, most of evidence was on the basis of the identification of putative natural hybrid strains in studies of individual genes (Bogliolo et al., 1996; Brisse et al., 2003; Carrasco et al., 1996; Machado and Ayala, 2001; Souto et al., 1996; Sturm et al., 2003).

In 2003, Gaunt et al. clearly demonstrated the occurrence of recombination in *T. cruzi* in vitro. Hybrid clones were obtained in co-infection studies using two TcI populations transfected with different drug-resistant markers. These studies not only demonstrated the possibility of recombination in this parasite but also showed that this event involved the fusion of nuclear genotypes, homologous recombination, allelic loss, and uniparental inheritance of mitochondrial genotypes (Gaunt et al., 2003).

More recently, using maximum likelihood and Bayesian phylogenetic approaches, Lewis et al. dated evolutionary key events in *T. cruzi* including the emergence of the hybrid lineages of TcV and TcVI, which was estimated to have occurred within the last 60,000 years. They also found evidence for a recent genetic exchange between TcIII and TcIV and between TcI and TcIV, which was not previously expected (Lewis et al., 2011).

Despite these observations, many questions remain regarding the occurrence and frequency of recombination between current assumed asexual parasites such as *T. cruzi*. Indeed,

most studies on population structures of *T. cruzi* have compared parasite populations isolated from distant geographical locations or at different times of isolation, which may have failed in detecting genetic recombination events among the strains due to bias of the sample selections. It is well known that if two or more subpopulations have different allele frequencies, the heterozygosity of the overall population is reduced, despite the subpopulations being in Hardy-Weinberg equilibrium. This is easily achieved, for example, by the existence of geographical barriers that prevent meetings and thus, the flow of genes among subpopulations, leading to a phenomenon known as the Wahlund effect (Poulin and Morand, 1999).

To verify this hypothesis, herein we compared the molecular data obtained from TcII strains isolated from both distant geographic areas throughout Latin America and only Minas Gerais, a Brazilian Southern state. In this study, our aim was to investigate whether geographical proximity would increase the probability of detecting evidence of sexual recombination among the strains. Our results were very suggestive and demonstrated that, while considering only TcII isolates from Minas Gerais, four of the five microsatellite loci entered into H-W equilibrium, suggesting that the apparent deviation observed in previous studies could be due to geographical isolation of the analyzed strains.

2. Methods

2.1 *T. cruzi* DNA samples used

A total of 88 DNA samples were analyzed in this study. Sixty of the samples were recently obtained from *T. cruzi* isolates from chronic patients, natives and people living in Minas Gerais (Southeast Brazil) and were cryopreserved in Dr. Egler Chiari's Laboratory at the Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, MG, Brazil. An additional 28 *T. cruzi* DNA samples, which were previously characterized Freitas et al. (2006), were also used in part of the experiments as controls for comparison in the calculation of H-W and LD imbalances (Table 1).

T. cruzi isolation from patients and all of the procedures were performed with the informed consent of the participants and approved by the Ethics Committee 087/99 of UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

For DNA extraction, cryopreserved parasites were cultivated in LIT medium (Liver Infusion Tryptose), washed three times in Krebs Ringer-Tris, pH 7.3, and centrifuged at 2000 g for 15 min at 4°C and then stored at -20°C until further analyses. DNA from the cultured parasites were prepared using the phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) extraction (Macedo et al., 1992) and used as a template for the PCR assays.

2.2 *T. cruzi* DTU genotyping

All of the isolates of *T. cruzi* were genotyped as TcII, using the triple assay as recommended by Macedo and colleagues (D'Avila et al., 2009) to discriminate the *T. cruzi* DTUs. Initially, the strains were analyzed using PCR-RFLP of the COII gene followed by digestion with *Alu* I (de Freitas et al., 2006), which allows the discrimination of *T. cruzi* I and *T. cruzi* II from the other strains (*T. cruzi* III-VI). The second step consists of an internally transcribed spacer leader (ITS) gene PCR (Burgos et al., 2007), which was applied to differentiate the unclassified strains, resulting in two distinct clusters; one formed by *T. cruzi* III and *T. cruzi* IV and the other by *T. cruzi* V and *T. cruzi* VI. The final step consisted of rDNA 24Sa PCR, which was then able to differentiate all six DTUs (Souto et al., 1996).

Using this typing strategy, *T. cruzi* II strains were identified as those presenting the follow genotype: COII haplotype C, ITS of 150 bp and rDNA 24Sa of 125 bp.

2.3 Mitochondrial DNA InDels characterization

Some *T. cruzi* II mitochondrial genes have been shown to consist of an NADH dehydrogenase subunit 7 (ND7) and subunit 4 (ND4/CR4) with insertion-deletions (InDels) polymorphisms. Thus, three different mitochondrial haplotypes can be identified among these parasites: haplotype C1 corresponding to a ~230 bp deletion in the ND4/CR4 gene, C2 corresponding to a 400 bp deletion in the ND7 gene region and C3 corresponding to wildtype genes (without any deletion) (de Freitas et al., 2006; Macedo et al., 1992). These InDels were typed in 47 of the 60 recently isolated *T. cruzi* II samples by PCR amplifications using Tc.MxiI.ND7.Fwd (5'-AAGAAAAGAGGGGACAAACG-3') and Tc.MxiI.ND7.Rev (5'-AAAAATCCCCTTCCAAAAGC-3') primers for ND7 (Baptista et al., 2006) and ND4. For (5'-AAACTCTATCTTTCGAAAACCC-3') and ND4.Rev (5'-GGGAAAAATAGACTTTCAAAAGTATC-3') primers for the amplification of ND4/CR4 genes as previously described (Carranza et al., 2009). The PCR products of the ND7 and ND4/CR4 genes were separated in 1% agarose gels and stained with ethidium bromide.

2.4 Nuclear microsatellite characterization

All of the 88 *T. cruzi* DNA samples, of which, 84 samples were isolated from human hosts and 4 samples were obtained from vectors (1005, 1024, GLT564 and GLT593), were subjected to a microsatellite assay using five dinucleotide repeats-based polymorphic loci (SCLE11, SCLE10, MCLE01, MCLF10 and MCLG10) (Oliveira et al., 1998; Valadares et al., 2008). PCR amplifications and microsatellite analyses were conducted as previously described

(Valadares et al., 2008) using an automated laser fluorescent DNA sequencer (GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin, USA). To determine the allele size, both external fluorescent DNA fragments of 50 to 500 bp (GE Healthcare) and internal fluorescent fragments (75, 155, 210 and 320 bp) that were added to each gel lane were used as size standards. The resulting chromatograms were analyzed using Allelelocator 1.03 software (GE Healthcare).

2.5 Population genetics parameters

The microsatellite genotypic data were used for the *T. cruzi* II population genetic analyses. Two expected microsatellite haplotypes for each *T. cruzi* population were initially estimated using PHASE (Stephens et al., 2001) and employed to reconstruct a haplotype network using the Network 4.6 software (Forster et al., 2000). Population substructuring was also inferred using STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) and the appropriate number of subpopulations was determined using the log-likelihood values (*L_n*) for *K* 1-10 and *ΔK equation* (Evanno et al., 2005). A Hardy-Weinberg (H-W) estimation and the observed versus expected heterozygosity for each microsatellite locus with a corresponding confidence interval of 95% were performed using ARLEQUIN v3.1 (Excoffier et al., 2005). To investigate the association level between the different loci, linkage disequilibrium (LD) indices between all of the potential microsatellite loci pairwise comparisons were tested using GENEPOP (Raymond and Rousset, 1995).

3. Results

3.1 Mitochondrial ND7 and ND4 InDels polymorphisms

All of the analyzed *T. cruzi* II isolates exhibited the mitochondrial haplotype C, as revealed using PCR-RFLP analysis of the COII gene. However, the ND7 and ND4/CR4 gene characterization performed in 47 of the 88 *T. cruzi* II samples revealed the presence of InDels polymorphisms: amplicons of 300 or 530 bp were identified for ND4/CR4 and amplicons of 500 or 900 bp were detected for ND7. Thus, three different ND4/ND7 haplotypes were detected in our *T. cruzi* samples: haplotype C1 (corresponding to amplicons of 300/900 bp) was observed in 7 samples, haplotype C2 (corresponding to amplicons of 530/500 bp) was observed in 24 samples and haplotype C3 (corresponding to amplicons of 530/900 bp) was observed in 16 samples (Table 2).

3.2 Nuclear microsatellite characterization

By typing the five microsatellite loci, we obtained the unique identity genotype for each analyzed strain (Table 2). For the SCLE11 and MCLE01 loci, we observed a predominance of

heterozygous profiles. In contrast, for the SCLE10, MCLF10 and MCLG10 loci, homozygous profiles were mainly found. A homozygous locus was identified by the presence of only one peak on the electrofluorogram, while a heterozygous locus was identified by the presence of two different peaks. Three or more peaks, which indicated a mixture of heterozygous strains or aneuploidy, were not observed.

3.3 TcII population structure analysis

The microsatellite profiles obtained for the 88 analyzed strains were converted into 108 allele haplotypes using the PHASE program, and these data were used to construct a haplotype network (Figure 1). This network represents the distance between both allele haplotypes of each strain on the basis of the number of mutational steps. The number of mutational steps between the diploid haplotypes from different strains varied widely: the minimum number observed was 3 for the 128a strain, and the highest was 67 for the 012B strain.

On the basis of the diversity observed in these strains, we investigated whether there was sufficient genetic variation to support a substructuring within the 47 Minas Gerais *T. cruzi* II population that were typed for ND4/ND7. The appropriate number of subpopulations in the evaluated parasitic samples was determined using the STRUCTURE program by analyzing the log-likelihood values (L_n) for K 1-10 and the ΔK parameters. Both analyses indicated the presence of three subgroups ($K=3$) within this population (Figure 2). The microsatellite (nuclear based) groups were identified as N1-3, and the mitochondrial markers were characterized as C1-3.

The F_{ST} and F_{IS} values were also estimated for the same *T. cruzi* II strains, as a measure of the genetic distance and mating among the strains. First, F_{ST} and F_{IS} analyses were separately performed for each nuclear subgroup identified by STRUCTURE (N1-3) to estimate the similarities and matings among the strains within each observed subpopulation. In this case, F_{ST} values > 0.05 for the three subgroups ($F_{ST} = 0.0661$ to 0.1786) were consistent with significant genetic differentiation among the isolates from each STRUCTURE group. However, positive F_{IS} values ($F_{IS} = 0.0540$ to 0.8455) indicated that the amount of heterozygous offspring in these subpopulations was lower than expected, most likely due to inbreeding. In fact, in the presence of significant inbreeding, the mating is nonrandom, and close relatives reproduce among themselves, and because these relatives likely have similar genes, the offspring are likely to be homozygous. Thus, taken together, both the high F_{ST} values and positive F_{IS} values observed for each STRUCTURE subpopulation (Table 3) indicated free interbreeding among the analyzed *T. cruzi* II strains of Minas Gerais.

3.4 Compelling evidence for substantial recombination within TcII

On the basis of the microsatellite genotype data, we employed two parameters to estimate the presence of genetic recombination within the parasite populations: H-W imbalance and LD (Table 4). Initially, these parameters were evaluated on the basis of the entire dataset population (strains belonging to Minas Gerais and other regions of Latin American), and then with only samples isolated from Minas Gerais. Our null hypothesis was that these *T. cruzi* II populations were in Hardy-Weinberg equilibrium and that the microsatellite loci segregate independently. For the entire dataset, most of the analyzed loci presented H-W imbalances (5/5) and LD (4/10) results with p-values < 0.05 as calculated using the Pearson's Chi square test, which indicated large deviations from the expected values for sex-reproducing organisms. These findings suggested that the genotypes were passed in blocks from generations, supporting the idea of predominant clonality in these parasites. However, when only samples from Minas Gerais were analyzed, 4/5 loci were in H-W equilibrium and 9/10 loci pairs in Linkage equilibrium (p-values > 0.05), suggesting significant recombination within this subpopulation (Table 4).

Finally, because we detected the presence of three haplotypes for mitochondrial markers (haplotypes C1, C2 and C3) and also three subgroups for nuclear markers (N1, N2, N3) as determined by STRUCTURE for the parasites isolated from Minas Gerais, we further investigated whether there was a correlation between these two independent sets of genetic markers. The presence of an association between these sets of markers might indicate that they were inherited together as expected in a clonal-based population (Zhang et al., 1988). However, no correlation was observed between the *T. cruzi* II subgroups identified by the nuclear or mitochondrial markers, as demonstrated in Figure 3: the three mitochondrial haplotypes were dispersed among the three nuclear subgroups.

Taken together, these results are indicative of the substantial genetic recombination among *T. cruzi* II strains isolated from Minas Gerais.

4. Discussion

Although sexual reproduction has been indubitably demonstrated for *T. cruzi* (Caunt et al., 2003; Ramirez et al., 2012), many questions concerning the frequency and importance of these events for the population structure and biology of these parasites are still under debate. The present study employs a new strategy to evaluate the TcII population dynamic at a local scale using nuclear and mitochondrial sets of polymorphic markers. The experimental approaches used in this study were designed to better understand why clonality was previously assumed as the predominant mechanism for *T. cruzi* reproduction (Tibayrenc and Ayala, 1987).

Thus, some of the most common parameters (Hardy-Weinberg: H-W and Linkage Disequilibrium, LD) in the literature were used to demonstrate the clonal structure of protozoa in two TcII populations: one population, which included strains isolated from a broad geographical region (different places in Latin America) and a smaller population including strains isolated from a much more restricted area (Minas Gerais, Brazil). The rationale for this approach was to evaluate the potential influence of geographical barriers in the LD and H-W imbalances that are usually detected for these parasites (Oliveira et al., 1998; Wahlund, 1928).

In this study, we detected the occurrence of LD and H-W deviations when *T. cruzi* isolated from distant geographic regions were analyzed, which could be interpreted as indicative of predominant clonal reproduction (Tibayrenc et al., 1991). However, this scenario was completely modified when we analyzed only *T. cruzi* circulating in a small geographic area. In this latter case, the LD and H-W equilibrium were restored, indicating that geographic distances and/or physical barriers may be important factors in reducing opportunities for sexual reproduction and thereby recombination rates among the *T. cruzi* strains.

Thus, our results are consistent with subpopulation structure leading to the Wahlund effect (a common phenomenon observed when individuals of a putative population are from genetically segregated subpopulations), in which the genetic marker imbalances contributed to the underestimation of the occurrence of sex and recombination in *T. cruzi*. This was particularly relevant because most, if not all, previous studies have analyzed strains isolated from a remote region (Wahlund, 1928).

The strategy selected in this study of analyzing *T. cruzi* strains isolated from the same location (Minas Gerais) and from the same lineage TcII to investigate the extension of recombination and random allele segregation among the parasites suggests that genetic exchanges among these strains were more frequent than initially expected.

5. Acknowledgements

We thank Fernanda Kehdy and Giordano Souza from the Laboratório de Diversidade de Genética Humana, Universidade Federal de Minas Gerais for their help in some of the population analyses. We also thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) for supporting this study.

6. Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RPB, DAD, GRF, AMM and CRM. Performed the experiments: RPB, DAD and MSC. Analyzed the data: RPB, MSC, AMM and CRM. Contributed to the collecting of samples and writing of the manuscript: RPB, DAD, MSC, HMSV, EDG, LMCG, SDJP, EC, AMM and CRM.

7. References

- Balloux, F., Lehmann, L., de Meuse, T., 2003. The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* 164, 1635-1644.
- Baptista, C.S., Vencio, R.Z., Abdala, S., Carranza, J.C., Westenberger, S.J., Silva, M.N., Pereira, C.A., Galvao, L.M., Gontijo, E.D., Chiari, E., Stumm, N.R., 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.
- Bastien, P., Blaneau, C., Pages, M., 1992. *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitol Today* 8, 174-177.
- Bengtsson, B.O., 2003. Genetic variation in organisms with sexual and asexual reproduction. *J Evol Biol* 16, 189-199.
- Bogliolo, A.R., Lauria-Pires, L., Gibson, W.C., 1996. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop* 61, 31-40.
- Brisse, S., Henriksson, J., Barnabe, C., Douzery, E.J., Berkvens, D., Serrano, M., De Carvalho, M.R., Buck, G.A., Dujardin, J.C., Tibayrenc, M., 2003. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol* 2, 173-183.
- Burgos, J.M., Alcheh, J., Bisio, M., Duffly, T., Valadares, H.M., Seidenstein, M.E., Piccinini, R., Freitas, J.M., Levin, M.J., Macchi, L., Macedo, A.M., Freilij, H., Schijman, A.G., 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol* 37, 1319-1327.
- Carranza, J.C., Valadares, H.M., D'Avila, D.A., Baptista, R.P., Moreno, M., Galvao, L.M., Chiari, E., Sturm, N.R., Gontijo, E.D., Macedo, A.M., Zingales, B., 2009. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol*.
- Carrasco, H.J., Frame, I.A., Valenie, S.A., Miles, M.A., 1996. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 54, 418-424.
- D'Avila, D.A., Macedo, A.M., Valadares, H.M., Gontijo, E.D., de Castro, A.M., Machado, C.R., Chiari, E., Galvao, L.M., 2009. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J Clin Microbiol* 47, 1718-1725.
- de Freitas, J.M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Goncalves, V.F., Teixeira, S.M., Chiari, E., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Macedo, A.M., Machado, C.R., Pena, S.D., 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2, e24.
- de Lana, M., da Silveira Pinto, A., Barnabe, C., Quesney, V., Noel, S., Tibayrenc, M., 1998. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol* 90, 20-25.
- Devera, R., Fernandes, O., Coura, J.R., 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.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14, 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1, 47-50.
- Forster, P., Rohlf, A., Lummemann, P., Brinkmann, C., Zierl, T., Tyler-Smith, C., Brinkmann, B., 2000. A short tandem repeat-based phylogeny for the human Y chromosome. *Am J Hum Genet* 67, 182-196.
- Gaunt, M.W., Yeo, M., Frame, I.A., Stohard, J.R., Carrasco, H.J., Taylor, M.C., Mena, S.S., Veazey, P., Miles, G.A., Acosta, N., de Arias, A.R., Miles, M.A., 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421, 936-939.
- Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Yeo, M., Acosta, N., Gaunt, M.W., Miles, M.A., 2011. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1363.
- Macedo, A.M., Martins, M.S., Chiari, E., Pena, S.D., 1992. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol* 55, 147-153.

Macedo, A.M., Pena, S.D., 1998. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today* 14, 119-124.

Macedo, A.M., Pimenta, J.R., Aguiar, R.S., Melo, A.I., Chiari, E., Zingales, B., Pena, S.D., Oliveira, R.P., 2001. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96, 407-413.

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

Mark Welch, D.B., Messelson, M., 2000. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* 288, 1211-1215.

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

Poulin, R., Morand, S., 1999. Geographical distances and the similarity among parasite communities of conspecific host populations. *Parasitology* 119 (Pt 4), 369-374.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.

Ramirez, J.D., Duque, M.C., Montilla, M., Cucunuba, Z., Guhl, F., 2012. Natural and emergent *Trypanosoma cruzi* genotypes revealed by mitochondrial (Cytb) and nuclear (SSU rDNA) genetic markers. *Exp Parasitol* 132, 487-494.

Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86, 248-249.

Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., Zingales, B., 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83, 141-152.

Stephens, M., Smith, N.J., Donnelly, P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68, 978-989.

Sturm, N.R., Vargas, N.S., Westenberger, S.J., Zingales, B., Campbell, D.A., 2003. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 33, 269-279.

Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 1987. *Trypanosoma cruzi* populations: more clonal than sexual. *Parasitol Today* 3, 189-190.

Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol* 18, 405-410.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Aumad, J., Oury, B., Breniere, S.F., Darde, M.L., Ayala, F.J., 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5129-5133.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J., 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2414-2418.

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

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

Valadares, H.M., Pimenta, J.R., de Freitas, J.M., Duffy, T., Bartholomeu, D.C., Oliveira Rde, P., Chiari, E., Moreira Mda, C., Filho, G.B., Schijman, A.G., Franco, G.R., Machado, C.R., Pena, S.D., Macedo, A.M., 2008. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int J Parasitol* 38, 839-850.

Venegas, J., Conoepan, W., Pichuanes, S., Miranda, S., Jereic, M.L., Gajardo, M., Sanchez, G., 2009. Phylogenetic analysis of microsatellite markers further supports the two hybridization events hypothesis as the origin of the *Trypanosoma cruzi* lineages. *Parasitol Res* 105, 191-199.

Wahlund, S., 1928. Zusammensetzung von Population und Korrelationserscheinung vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* 11, 65-106.

Westenberger, S.J., Barnabe, C., Campbell, D.A., Sturm, N.R., 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171, 527-543.

Zhang, O., Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 1988. Linkage disequilibrium in natural populations of *Trypanosoma cruzi* (flagellate), the agent of Chagas disease. *J Protozool* 35, 81-85.

Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 1051-1054.

Figures Legends

Figure 1. Haplotype network basing on the PHASE data, indicating the distance between different nuclear haplotypes from Tc II strains. The circle size was proportional to the number of identical haplotypes observed. Different colors referee to different ND4/7 haplotypes: blue - C1 (300/900bp), red - C2 (530/500bp), green - C3 (530/900bp) and yellow - C* (not determined).

Figure 2. Subgroup determination on the basis of the nucleic acid marker analysis. The number of subsets in our test with MG samples were determined using STRUCTURE, where (A) is the "bar plotting" graph that has been partitioned into three color segments (K = 3), and K was determined by the correlation between the log-likelihood values (Ln), where K varied from 1 to 10 (B) or by the ΔK calculation (C).

Figure 3. All three mitochondrial haplotypes (C1, C2 and C3) were dispersed among the three different nuclear subgroups (N1, N2 and N3), indicating that there is no correlation between the two markers. C*: ND4/7 haplotypes have not been determined.

Figures

Figure 1:

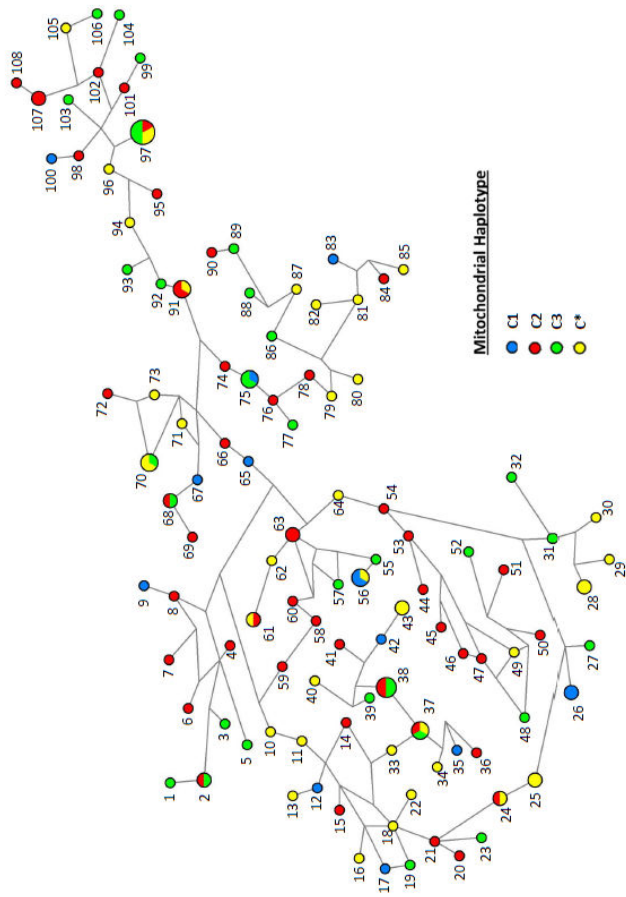


Figure 2:

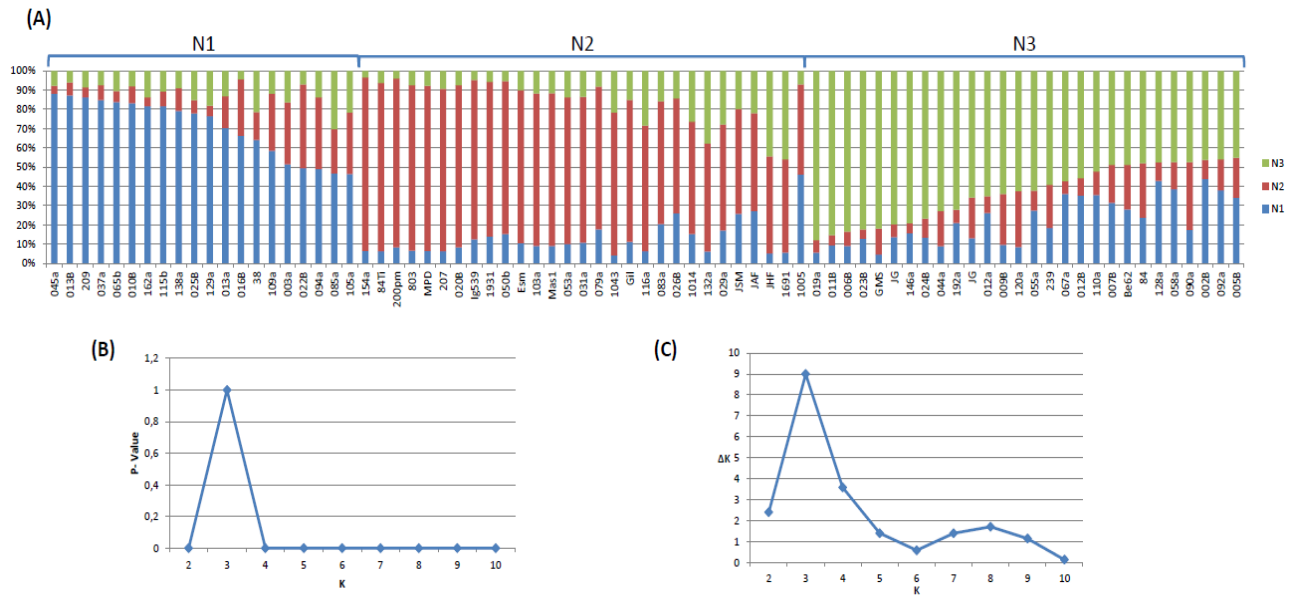
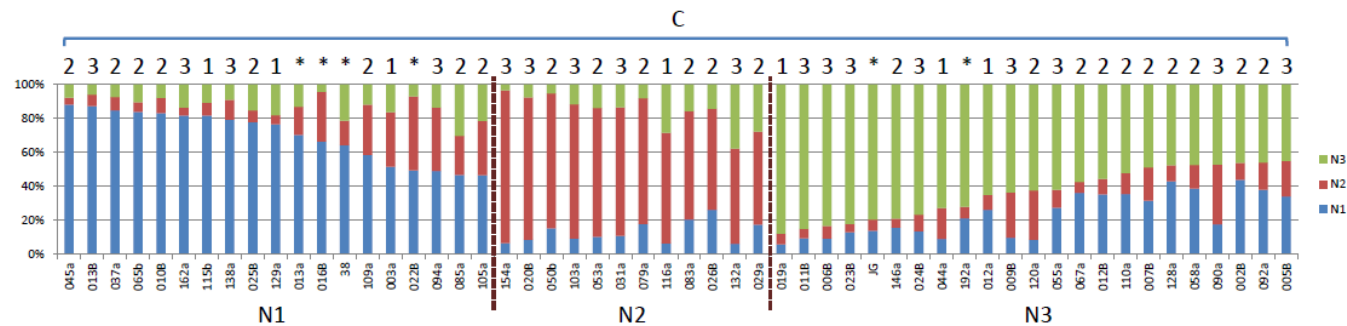


Figure 3:



Tables:
Table 1 – *Trypanosoma cruzi* II¹ strains and clones analyzed in this study.

Strain/clone ¹	Origin	Strain/clone ¹	Origin
002 B	MG/Brazil	154 a	MG/Brazil
003 a	MG/Brazil	162 a	MG/Brazil
005 B	MG/Brazil	128 a	BA/Brazil
007 B	MG/Brazil	38	MG/Brazil
009 B	MG/Brazil	013 a	MG/Brazil
010 B	MG/Brazil	016 B	MG/Brazil
011 B	MG/Brazil	192 a	MG/Brazil
012 a	MG/Brazil	JG	MG/Brazil
012 B	MG/Brazil	022 b	BA/Brazil
013 B	MG/Brazil	003 B	MG/Brazil
019 a	MG/Brazil	002 a	MG/Brazil
020 B	MG/Brazil	005 a	MG/Brazil
023 B	MG/Brazil	006 a	MG/Brazil
024 B	MG/Brazil	021 B	MG/Brazil
025 B	MG/Brazil	097 a	MG/Brazil
026 B	MG/Brazil	188 a	MG/Brazil
029 a	MG/Brazil	Be62 ²	MG/Brazil
031 a	MG/Brazil	Esmeraldo ²	MG/Brazil
037 a	MG/Brazil	GMS ²	MG/Brazil
044 a	MG/Brazil	Ig539 ²	MG/Brazil
045 a	MG/Brazil	MasI cl1 ²	MG/Brazil
050 b	MG/Brazil	MPD ²	MG/Brazil
053 a	MG/Brazil	Tula cl2 ²	MG/Brazil
055 a	MG/Brazil	84 ²	MG/Brazil
058 a	MG/Brazil	169/1 ²	MG/Brazil
065 b	MG/Brazil	200pm ²	MG/Brazil
067 a	MG/Brazil	209 ²	MG/Brazil
079 a	MG/Brazil	239 ²	MG/Brazil
083 a	MG/Brazil	803 ²	MG/Brazil
085 a	MG/Brazil	1005 ²	MG/Brazil
090 a	MG/Brazil	1014 ²	MG/Brazil
092 a	MG/Brazil	1043 ²	MG/Brazil
094 a	MG/Brazil	1931 ²	MG/Brazil
103 a	MG/Brazil	GOCH ²	GO/Brazil
105 a	MG/Brazil	577 ²	GO/Brazil
109 a	MG/Brazil	578 ²	GO/Brazil
110 a	MG/Brazil	580 ²	GO/Brazil
115 b	MG/Brazil	183744 ²	GO/Brazil
116 a	MG/Brazil	CP195/94 ²	PI/Brazil
120 a	MG/Brazil	OPS27/94 ²	PI/Brazil
129 a	MG/Brazil	GLT564 ²	RJ/Brazil
132 a	MG/Brazil	GLT593 ²	RJ/Brazil
138 a	MG/Brazil	Y ²	SP/Brazil
146 a	MG/Brazil	CP111/94 ²	Colombia

¹*T. cruzi* strains were characterized by amplification of the rDNA gene 24Sα (Souto et al., 1996), intergenic spacer from the mini-exon genes (Burgos et al., 2007) and RFLP of mitochondrial cytochrome oxidase II gene (Freitas et al. 2006), and were identified as *T. cruzi* II according to Zingales et al. (2009). ²The data of these strains were obtained from Freitas et al. (2006).

Table 2 - Mitochondrial ND4/7 haplotypes and microsatellite profiles of the *T. cruzi* II strains.

Strains/Clones	ND4/7 Haplotypes				Nuclear Microsatellite Haplotypes				
	SCE11	MCLE01	SCE10	MCLF10	MCLG10	MCLF10	MCLG10	MCLF10	MCLG10
002 B	C2	1414	1315	2626	88	88	88	88	88
003 a	C1	1517	1117	2628	88	88	711	88	711
005 B	C3	1618	1114	2536	88	88	88	88	88
007 B	C2	1616	1313	2727	88	88	1010	88	1010
009 B	C3	1114	98	2836	88	88	812	88	812
010 B	C2	1316	1111	2525	88	88	99	88	99
011 B	C3	1317	1118	2736	88	88	88	88	88
012 a	C1	1416	78	2727	88	88	1010	88	1010
012 B	C2	1317	1511	2626	88	88	88	88	88
013 B	C3	1416	1911	2626	88	88	99	88	99
019 a	C1	1317	87	2736	88	88	88	88	88
020 B	C3	1717	1319	2828	88	88	1212	88	1212
023 B	C3	1414	88	2636	88	88	88	88	88
024 B	C3	1314	77	2727	1010	1010	88	88	88
025 B	C2	1314	1119	2626	88	88	1111	88	1111
026 B	C2	1115	913	2528	88	88	813	88	813
029 a	C2	1113	1313	2628	88	88	77	88	77
031 a	C3	1717	811	2638	99	1010	88	88	88
037 a	C2	1415	1911	2828	88	1111	88	88	88
044 a	C1	1313	1217	2736	88	88	811	88	811
045 a	C2	1416	1911	2525	88	88	88	88	88
050 b	C2	1616	1113	2424	99	812	88	88	812
053 a	C2	1113	912	2525	99	77	88	88	77
055 a	C3	1421	1111	2727	88	88	88	88	88
058 a	C2	1618	1115	2536	88	88	88	88	88
065 b	C2	1416	1911	2628	88	88	810	88	810
067 a	C2	1313	1115	2626	88	88	88	88	88
079 a	C2	1315	1318	2424	88	88	99	88	99
083 a	C2	1215	99	2626	88	88	813	88	813
085 a	C2	1114	79	2528	88	88	1010	88	1010
090 a	C3	1118	99	2836	88	88	1010	88	1010
092 a	C2	1111	1113	2626	88	88	88	88	88
094 a	C3	1114	1818	2525	88	88	1010	88	1010
103 a	C3	1013	918	2628	88	88	512	88	512
105 a	C2	1416	2011	2832	88	88	88	88	88
109 a	C2	1616	1113	2528	88	88	77	88	77
110 a	C2	1416	1111	2727	1010	1010	88	88	88
115 b	C1	1515	1111	2828	88	88	88	88	88
116 a	C1	1113	97	2636	89	712	88	88	712
120 a	C2	1314	912	3131	88	88	88	88	88
129 a	C1	1414	711	2525	88	88	88	88	88
132 a	C3	1213	920	2727	88	88	67	88	67
138 a	C3	1415	1111	2526	88	88	68	88	68
146 a	C2	1314	128	2626	88	88	88	88	88
154 a	C3	1219	2119	2828	89	55	88	88	55
162 a	C3	1416	1911	2626	88	88	88	88	88
128 a	C2	1414	99	2626	88	88	88	88	88
38	C*	1414	919	2828	88	88	1010	88	1010
013 a	C*	1414	1019	2628	88	88	1010	88	1010
016 B	C*	1416	1911	2626	99	99	88	88	99
192 a	C*	1314	199	2727	88	88	88	88	88
JG	C*	1113	1112	2728	88	88	88	88	88
022 b	C*	1316	711	2525	99	99	88	88	99
003 B	C*	1416	199	NA	88	88	88	88	88
002 a	C*	1313	711	NA	NA	NA	88	88	88
005 a	C*	1414	712	NA	NA	NA	88	88	88
006 a	C*	1414	99	NA	NA	NA	88	88	88
021 B	C*	1314	119	2727	88	88	88	88	88
097 a	C*	1517	1111	2831	88	88	88	88	88
188 a	C*	1416	913	NA/NA	NA	NA	88	88	88
Be62	C*	1616	1213	2728	88	88	88	88	88
Esmeraldo	C*	1418	612	2834	78	89	88	88	88
GMS	C*	1317	711	2733	88	88	88	88	88
Ig539	C*	1415	1019	3131	99	69	88	88	69
MasI cII	C*	1414	88	2334	99	88	88	88	88
MPD	C*	1015	1313	2426	77	810	88	88	810
Tula cII	C*	1314	99	3535	88	88	88	88	88
84	C*	1516	711	2426	88	88	88	88	88
169/1	C*	1313	813	2728	79	88	88	88	88
200pm	C*	1516	1212	2929	99	89	88	88	89
209	C*	1516	1010	2528	88	88	88	88	88
239	C*	1417	1119	2628	88	88	88	88	88
803	C*	1111	1220	2631	99	811	88	88	811
1005	C*	1516	922	2828	88	88	88	88	88
1014	C*	1313	1415	2528	88	88	88	88	88
1043	C*	1717	811	2831	77	89	88	88	77
1931	C*	915	1414	2828	99	1010	88	88	1010
GOCH	C*	1518	819	2631	1010	66	88	88	66
577	C*	1416	2021	2731	1010	68	88	88	68

578	C*	13\16	9\18	31\31	10\10	8\8
580	C*	13\13	9\11	30\30	9\9	8\8
183744	C*	13\13	9\11	31\31	9\9	8\8
CP195/94	C*	13\16	6\10	29\29	9\9	8\8
OPS27/94	C*	13\18	10\12	34\39	9\9	8\8
GLT564	C*	14\14	12\12	28\28	8\8	8\10
GLT593	C*	14\14	12\12	26\33	7\7	9\11
Y	C*	15\15	9\9	27\27	8\9	8\8
CPH11/94	C*	15\15	9\9	29\39	9\9	8\8

This table shows the mitochondrial (ND4/7) and nuclear (five microsatellite loci) genetic profiles of all the samples used in this study. The mitochondrial ND4/7 haplotypes were determined combining the allele sizes for the 4 and 7 subunits of NADH dehydrogenase: haplotype C1 (300/900bp), haplotype C2 (530/500bp) or haplotype C3 (530/900bp). The microsatellite profiles were determined by the number of repetitions for each allele at each one of the five analyzed loci. C*: ND4/7 haplotype have not been determined for these isolates, but as expected for the *T. cruzi* II strains all of the mitochondrial COII profiles were haplotype C. NA: not amplified.

Table 3 - Multilocus estimates for the diploid data

Locus	Fis	Fst	Fit
SCLE11	0.0729	0.0970	0.1628
MCLE01	0.0540	0.0661	0.1165
SCLE10	0.5062	0.0943	0.5528
MCLF10	0.8455	0.1063	0.8619
MCLG10	0.7276	0.1786	0.7763
All:	0.3660	0.1074	0.4341

F_{ST} and F_{IS} analyses were separately performed for each nuclear subgroup identified by STRUCTURE (N1-3) to estimate the similarities and matings among the strains within each observed subpopulation. F_{ST} values > 0.05 were consistent with genetic differentiation among the isolates from each STRUCTURE group. Positive F_{IS} values indicated that the amount of heterozygous offspring in these subpopulations was lower than expected.

Table 4 - Statistical tests for population genetics.

A

Hardy-Weinberg Test		
Loci	P-value (World)	P-value (MG)
SCLE11	0.00057	0.05150
SCLE10	0.00000	0.06232
MCLE01	0.00000	0.06100
MCLF10	0.00000	0.00000
MCLFG10	0.00000	0.05110

B

Linkage Disequilibrium test		
Locus Pair	P-value (World)	P-value (MG)
SCLE11 & MCLE01	0.000000	0.172377
SCLE11 & SCLE10	0.17168	0.344099
MCLE01 & SCLE10	0.062400	0.142935
SCLE11 & MCLF10	0.250320	0.548089
MCLE01 & MCLF10	0.044430	0.420419
SCLE10 & MCLF10	0.000000	0.528246
SCLE11 & MCLG10	0.000000	0.026943
MCLE01 & MCLG10	0.273930	0.869349
SCLE10 & MCLG10	0.538440	0.151469
MCLF10 & MCLG10	0.060340	0.066145

Population statistical tests observed for our two sets of data. The "World" samples included all of the samples used in this study from different geographical locations. "MG" included only the samples obtained from Minas Gerais. (A) H-W *p*-values for our two sets of data and (B) LD *p*-values for each pair of loci. The null hypothesis was that the population was in Hardy-Weinberg equilibrium. For both methods, *p*-values less than 0.05 represented deviations and imbalances.

Unequivocal Identification of Subpopulations in Putative Multiclonal *Trypanosoma cruzi* Strains by FACs Single Cell Sorting and Genotyping

Helder Magno Silva Valadares^{1,2}, Juliana Ramos Pimenta¹, Marcela Segatto¹, Vanja Maria Veloso³, Mônica Lúcia Gomes⁴, Egler Chiari⁵, Kenneth John Gollob⁶, Maria Terezinha Bahia⁷, Marta de Lana³, Glória Regina Franco¹, Carlos Renato Machado¹, Sérgio Danilo Junho Pena¹, Andréa Mara Macedo^{1*}

1 Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Universidade Federal de São João del-Rey, Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil, **3** Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, **4** Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil, **5** Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **6** Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **7** Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

Abstract

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease, is a polymorphic species. Evidence suggests that the majority of the *T. cruzi* populations isolated from afflicted humans, reservoir animals, or vectors are multiclonal. However, the extent and the complexity of multiclonality remain to be established, since aneuploidy cannot be excluded and current conventional cloning methods cannot identify all the representative clones in an infection. To answer this question, we adapted a methodology originally described for analyzing single spermatozooids, to isolate and study single *T. cruzi* parasites. Accordingly, the cloning apparatus of a Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS) was used to sort single *T. cruzi* cells directly into 96-wells microplates. Cells were then genotyped using two polymorphic genomic markers and four microsatellite loci. We validated this methodology by testing four *T. cruzi* populations: one control artificial mixture composed of two monoclonal populations – Silvio X10 c11 (TcI) and Esmeraldo c13 (TcII) – and three naturally occurring strains, one isolated from a vector (A316A R7) and two others derived from the first reported human case of Chagas disease. Using this innovative approach, we were able to successfully describe the whole complexity of these natural strains, revealing their multiclonal status. In addition, our results demonstrate that these *T. cruzi* populations are formed of more clones than originally expected. The method also permitted estimating of the proportion of each subpopulation of the tested strains. The single-cell genotyping approach allowed analysis of intrapopulation diversity at a level of detail not achieved previously, and may thus improve our comprehension of population structure and dynamics of *T. cruzi*. Finally, this methodology is capable to settle once and for all controversies on the issue of multiclonality.

Citation: Valadares HMS, Pimenta JR, Segatto M, Veloso VM, Gomes ML, et al. (2012) Unequivocal Identification of Subpopulations in Putative Multiclonal *Trypanosoma cruzi* Strains by FACs Single Cell Sorting and Genotyping. PLoS Negl Trop Dis 6(7): e1722. doi:10.1371/journal.pntd.0001722

Editor: Elodie Ghedin, University of Pittsburgh, United States of America

Received: February 2, 2012; **Accepted:** May 22, 2012; **Published:** July 10, 2012

Copyright: © 2012 Valadares et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by PRONEX, CNPq, FAPEMIG, INCT NANOBIOFARM, CAPES, and WHO. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: andrea@icb.ufmg.br

Introduction

Chagas disease, an American protozoonosis caused by *Trypanosoma cruzi*, is characterized by various clinical manifestations ranging from asymptomatic to severe cardiac and/or digestive injuries. This complex ailment still afflicts 10 million people across Latin America and another 90 million are at risk of acquiring the disease [1]. A vaccine or specific treatment for large-scale public health interventions is still not available, so the main control strategy relies on prevention of transmission by controlling insect vectors and contamination by food or blood transfusion [2].

T. cruzi is a very polymorphic species, as extensively demonstrated by biological, biochemical, and molecular studies [3], and this certainly contributes to the pleomorphism of the symptoms and to the difficulty in controlling the disease [4]. *T. cruzi* was

recently subdivided into six discrete taxonomic units (DTUs) named *T. cruzi* I to *T. cruzi* VI [5], of which at least four are involved with human pathology [6].

Indirect evidence suggests that part of *T. cruzi* populations is multiclonal. This is in accordance with the theoretical expectation, since patients in endemic areas are infected by multiple contacts with different triatomines and these, in turn, may feed on different infected individuals. Most of the putative multiclonal populations were suggested based on the identification of more than two alleles for different markers [7–9]. Whether these reported populations are really multiclonal remains controversial because we cannot exclude the possibility of aneuploidy [7,8,10,11]. Thus, direct evidence for the multiclonality of sylvatic and domestic populations is lacking. Indeed, it is not possible to identify all the clones that constitute a given multiclonal population because current

Author Summary

Trypanosoma cruzi, the cause of Chagas disease, is responsible for high levels of mortality and morbidity in many countries of Latin America. This species is very polymorphic and was recently classified into six discrete typing units (TcI-VI) that are associated with different geographical distribution, transmission cycles, and varying disease symptoms. Natural parasite populations are thought to have a complex structure since in endemic areas the same hosts may be simultaneously infected by different *T. cruzi* strains due to frequent exposure to insects as well as the variety of reservoirs and vectors in the sylvatic environment and the heterogeneous composition of the parasite populations. Most of the putative multiclonal populations have been suggested based on indirect evidence, or current conventional cloning methods that may favor some individuals' growth. In an effort to elucidate the complexity of *T. cruzi* isolates we adapted a methodology originally described for analyzing single spermatozooids, to sort single parasites. This approach allowed us to completely dissect the complexity of four strains and estimate the relative contribution of each subpopulation. Knowledge about complexity of *T. cruzi* strains is essential for determining the aspects involved in differential parasite tissue tropism, clinical manifestations of the disease, and drug resistance.

conventional cloning methods (micromanipulation, limiting dilution or cloning in blood-agar plates) may favor individuals over-represented in the original population and/or presenting higher growth rates [12–15].

To answer these questions we devised a new strategy for sorting single *T. cruzi* parasites, adapted from methods originally described for analyzing single spermatozooids [16]. Using this innovative approach the results presented herein may contribute to settling the debate regarding the multiclonality of three *T. cruzi* representative strains isolated from human and vector hosts. The methodology described here is able to completely dissect the complexity of strains and estimate the relative contribution of each subpopulation, and will therefore have important implications for the study of *T. cruzi* biology and disease.

Methods

T. cruzi populations

In this study we used four multiclonal *T. cruzi* populations: one artificially composed of Esmeraldo cl3 (a standard *T. cruzi* II strain) and Silvio X10 cl1 (a standard *T. cruzi* I strain), a naturally occurring putatively multiclonal vector strain called A316A R7, and two populations derived from a naturally occurring putatively multiclonal human strain named Be-78 1B and Be-78 25B. The A316A R7 strain was isolated from a *Triatoma sordida* circulating in northwestern Paraná state, Brazil [17,18]. The Be-78 1B and Be-78 25B are two populations derived from a chronic chagasic outbred dog infected with Be-78, originally isolated from Berenice, the first patient of Carlos Chagas [19], harvested after 1 or 25 successive blood passages in mice [20].

Preparation of *T. cruzi* cells for the FACS

About 1.5 mL (10^6 cells) of *T. cruzi* epimastigotes cultured in Liver Infusion Tryptose (LIT) medium were transferred to a siliconed Vacutainer tube (Itupeva, Brazil). The culture was centrifuged at $30\times g$ for 10 minutes at 4°C to separate intact cells from cellular debris. After this centrifugation, the culture was

incubated for 10 minutes at room temperature to allow mobile epimastigotes to reach the surface. The collected cells were submitted to three washes with $1\times$ PBS pH 7.4 at 4°C sterilized using 0.22 μ M Millex GV filter (Millipore, MA, USA) and centrifuged at $1000\times g$ for 10 minutes at 4°C. After the last wash the cells were suspended in 1 mL of $1\times$ PBS pH 7.4 and fixed for 30 minutes using absolute ethanol maintained at -20°C . Finally, the fixed cells were stored at 4°C overnight, after which they were submitted to sorting on the FACS Vantage apparatus.

Calibrating the FACS and sorting of *T. cruzi* cells

To calibrate the powerful single-cell sorter FACS Vantage to achieve single *T. cruzi* specimens, we used fluorescent beads as an indirect control because bead size is similar to the epimastigote form of the parasite [21]. Fluorescent beads (Spherotech Inc., IL, USA) measuring 10.0 to 14.0 μ m in diameter were sorted in microscope slides according to the manufacturer's protocol (Becton Dickinson, CA, USA). We found that the counting of the sorted beads under fluorescence microscope always showed good correspondence with the number of beads programmed for each well. In wells programmed to contain one bead we found an occasional absence of beads, but never more than one bead.

To sort *T. cruzi* strains, small aliquots of the fixed cells were transferred to a Falcon tube (Becton Dickinson, CA, USA) for FACS counting. The solution containing the parasites was diluted in $1\times$ PBS pH 7.4 until the FACS counting indicated approximately 100 events per second. Samples were gated forward scatter (FSC) versus side scatter (SSC) to select cell populations of interest (Figure S1). The autofluorescence pattern presented by *T. cruzi* allows cell sorting without staining with fluorescent dyes or reagents. Then, the Clone Cyt apparatus (Becton Dickinson, CA, USA) was used to sort single cells directly into 96-wells plate (Sorensen BioScience, UT, USA) containing 5 μ L of 10% Triton X-100. Control wells were programmed to contain 0, 2, 5, or 10 sorted parasites from each *T. cruzi* population. After sorting, a drop of mineral oil was added to each well and the microplates were stored at -20°C until needed. Before the PCR assays, the single sorted *T. cruzi* was lysed by exposing the microplates to 80°C for 1 hour in a thermocycler.

T. cruzi single cell genotyping

Cells were genotyped by using polymorphic markers to mitochondrial (Cytochrome Oxidase subunit II- COII) and nuclear (24S α rDNA) genes and four microsatellite loci.

Polymorphism analysis of 24S α rDNA gene. A hemi-nested PCR protocol was used for the 24S α rDNA typing. Regular D75/D72 and 5'-fluorescein D71/D72 primer pairs (Table 1) were used for the first and second rounds, respectively. Both rounds of each PCR were performed in a total volume of 25 μ L containing Buffer B (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 3.5 mM MgCl₂, 0.625 U *Taq* DNA polymerase (Promega), 200 μ M of each dNTP, and 0.25 μ M of each primer. The lysed single *T. cruzi* cells were used as DNA template for the first round and 10% of the amplified products obtained from this round were used for the second. The amplification cycles for both rounds consisted of an initial denaturation step at 94°C for 1 minute, followed by 30 cycles of 94°C, 60°C, and 72°C for 30 seconds each step, followed by final extension step at 72°C for 10 min [22]. After the second round, 5 μ L of the PCR products were examined on silver stained 6% polyacrylamide gel. As PCR amplification controls we used 1 ng of DNA from *T. cruzi* populations belonging to *T. cruzi* I: Silvio X10 cl1 (rDNA type 2 – 110 bp); or *T. cruzi* II: Esmeraldo cl3 (rDNA type 1–125 bp) and *T. cruzi* V: SO3 cl5

Table 1. Primers used for amplification of the *T. cruzi* 24S α rDNA, COII, and microsatellite markers.

Primer	Sequence
D71	5'-FluoresceinAAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3'
D72	5'-TTTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'
D75	5'-CAGATCTTGGTTGGCGTAG-3'
TcMit10	5'-CCATATATTGTTGCATTATT-3'
TcMit21	5'-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3'
DsMit-F	5'-TGCATTACTCCTTCTACAG-3'
DsMit-R	5'-AACTCGTACATTGTCCATA-3'
TcAAAT8-forward	5'-FluoresceinACCTCATCGGTGTGCATGTC-3'
TcAAAT8-reverse	5'-TATTGTCCCGTGCAATTC-3'
TcAAAT8ex-forward	5'-AGAGGCGCACAGTTGTATGC-3'
TcAAAT8ex-reverse	5'-GACGCTTTATGTTGAATCA-3'
TcTAC15-forward	5'-FluoresceinGAATTTCCCATTTCCAAGC-3'
TcTAC15-reverse	5'-CGATGAGCAACAATCGCTTC-3'
TcTAC15ex-forward	5'-GGATATTTGTTACTGCTGGC-3'
TcTAC15ex-reverse	5'-CGGACATATCCCTCTAGTCG-3'
TcTAT20-forward	5'-FluoresceinGATCCTTGAGCAGCCACAA-3'
TcTAT20-reverse	5'-CAAATCCCAACGAGCAGC-3'
TcTAT20ex-forward	5'-AGGCTGATCCTTGAGCAGCC-3'
TcTAT20ex-reverse	5'-CGGCGGTCTCTTTTGTCTC-3'
TcAAAT6-forward	5'-FluoresceinGCCGTGCTCTAAAGAGCAAG-3'
TcAAAT6-reverse	5'-GGTTTTAGGCCTTTAGGTG-3'
TcAAAT6ex-forward	5'-ACGCACTCTCTTTGTTAACAG-3'
TcAAAT6ex-reverse	5'-CACATACACATTTCAATGGTT-3'

doi:10.1371/journal.pntd.0001722.t001

(rDNA type 1/2 – 110 and 125 bp). To determinate the allele sizes, 1 to 3 μ L of the PCR fluorescent products were analyzed on 6% denaturing polyacrylamide gel with an Automatic Laser Fluorescent (ALF) sequencer (GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin, USA) in comparison to fluorescent DNA fragments of 50–500 bp using Allelelocator software (GE Healthcare).

Polymorphism analysis of COII gene. COII typing was conducted using a full nested PCR protocol as described previously [23,24]. DsMit-F/DsMit-R and TcMit10/TcMit21 primer pairs (Table 1) were used for the first and the second PCR rounds, respectively. Each reaction was performed in a total volume of 25 μ L containing 2.5 μ L of Buffer IB (Phonutria, Minas Gerais, Brazil), 1 U *Taq* DNA polymerase (Promega), 250 μ M of each dNTP, and 0.3 μ M of each primer. The lysed single *T. cruzi* cells were used as DNA template for the first round and 10% of the amplified products obtained from this round were used for the second round. The cycles of PCR amplification consisted of an initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 40 cycles at 94°C for 45 seconds, 48°C for 45 seconds, and 72°C for 1 minute, followed by a final extension step at 72°C for 5 min. The amplified products were resolved on 2% agarose gel electrophoresis. Each positive PCR reaction (10 μ L) was submitted to digestion with *AclI* enzyme (Promega), according to the manufacturer's instructions. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of this gene allows the differentiation of *T. cruzi* I, II, and III-VI major lineages when resolved on silver stained 6% polyacrylamide gel. As RFLP-COII standards patterns we used 1 ng of DNA from *T. cruzi* populations belonging to *T. cruzi* I:

Silvio X10 cl1 (mitochondrial haplotype A – 30, 81, and 264 bp); *T. cruzi* II: Esmeraldo cl3 (mitochondrial haplotype C – 81, 82, and 212 bp); and *T. cruzi* V: SO3 cl5 (haplotype B – 81 and 294 bp).

Polymorphism analysis of microsatellite loci. A multiplex PCR system based on the full nested PCR strategy was designed for the microsatellite analyses. This system comprised two amplification rounds. In the first round we had a multiplex PCR containing only the external primers for all four microsatellite loci identified in diploid regions of CL Brener genome (TcTAC15, TcAAAT8, TcTAT20, and TcAAAT6) (Table 1). For the second round, four different reactions were carried out using the internal primers for each locus individually. Both PCR rounds were performed in a total volume of 25 μ L containing Buffer B (Promega), 2.5 mM MgCl₂, 1 U *Taq* DNA polymerase (Promega), 300 μ M of each dNTP, and 0.3 μ M of each primer. Lysed single *T. cruzi* cells were used as DNA template for the first round and 10% of the amplified products obtained from this round were used for the second. Amplification reactions were performed using the step-down protocol described by Valadares et al. (2008). To determinate allele sizes, 1 to 3 μ L of the PCR fluorescent products were analyzed on 6% denaturing polyacrylamide gel with an ALF sequencer (GE Healthcare).

Combining 24S α rDNA and microsatellite analyses. To investigate whether there was a correspondence between the microsatellite and rDNA profiles of the single sorted *T. cruzi*, we used a duplex PCR involving the simultaneous amplification of the 24S α rDNA and TcTAT20 markers. The reactions were conducted as specified above for the microsatellite analyses in a two-round PCR. For the first round we used a mixture of the external primers for 24S α rDNA and TcTAT20, and in the second round we used the internal primers for both markers but in two separate reactions.

Results

Conventional cloning methods have showed the existence of some natural multiclonal *T. cruzi* populations. However, a widespread understanding of the multiclonal scenario among *T. cruzi* is not possible due to the limitations of current cloning methods. We therefore wanted to devise a method that would allow us to investigate the multiclonal status of any *T. cruzi* strain and simultaneously characterize individually all the clones that compose the strains.

Single sorting of *T. cruzi* parasites using FACS Vantage

To evaluate whether the previously used bead-calibrated method could be successfully used to separate single *T. cruzi* parasites, we initially sorted an artificial mixture of two monoclonal populations: Silvio X10 cl1 (*T. cruzi* I) and Esmeraldo cl3 (*T. cruzi* II). Next, we confirmed separation by genotyping the 24S α rRNA gene of the single sorted parasites and the controls present in each well (Figure 1). In the control wells A1, A2, A3, and A4 programmed to contain 10 or 5 cells, we detected the expected amplicons of 110 and 125 bp, demonstrating that the two types of cells used in the artificial mixture were present. From the 83 wells programmed to contain the sorted single parasites, 40% (33 wells) showed the amplification of only the 125 bp or the 110 bp amplicon, therefore confirming single cell sorting. This efficiency is approximately the double that obtained with a previously published protocol [25]. Moreover, none of the wells programmed to contain a single cell showed the amplification of both fragments. These results indicate that the FACS Vantage sorting method we

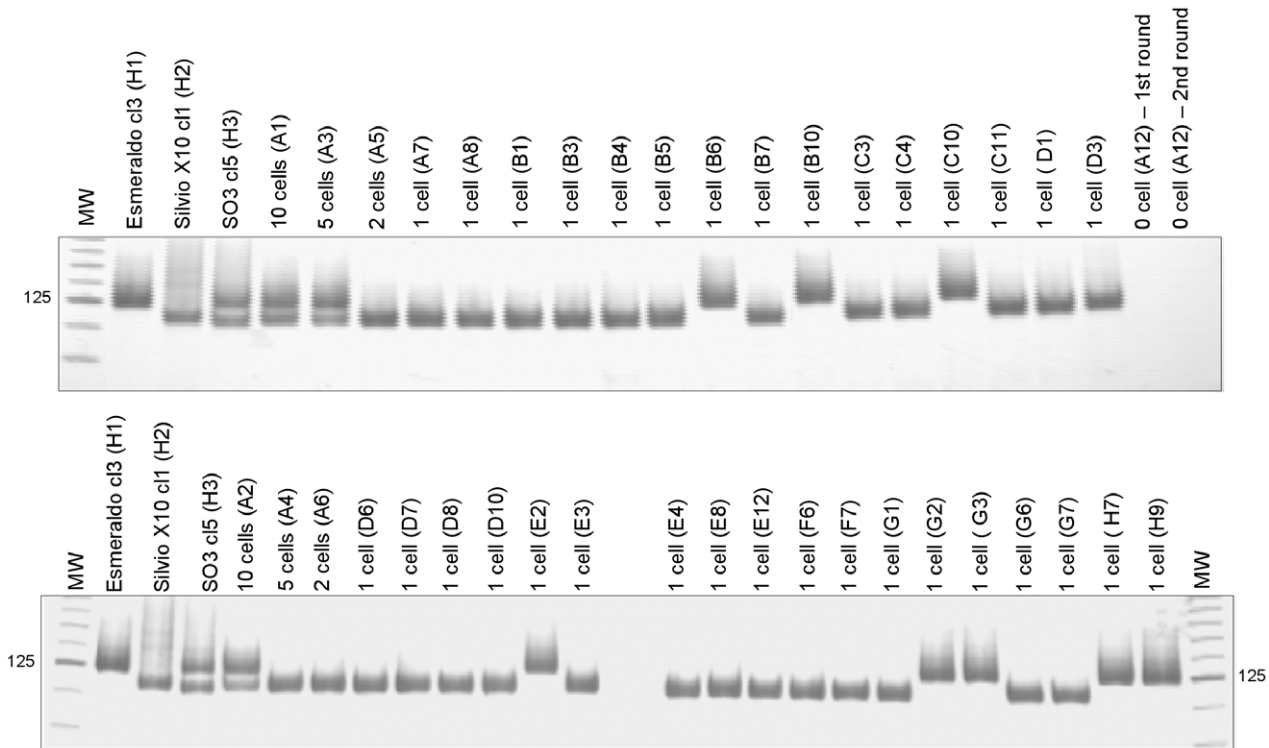


Figure 1. 245 α rDNA profiles of single parasites from the SilvioX10 c1 and Esmeraldo c13 artificial mixture. DNA from Esmeraldo c13 (125 bp), Silvio X10 c1 (110 bp), and SO3 c15 (110/125) were used as controls for rDNA type 1 (*T. cruzi* I), rDNA type 2 (*T. cruzi* II), and rDNA type 1/2 (*T. cruzi* V), respectively. Corresponding microplate wells of the positive amplifications are also indicated. Control wells were programmed to contain 0, 2, 5, or 10 parasites. MW: Molecular weight of 25 bp (Invitrogen, USA). doi:10.1371/journal.pntd.0001722.g001

modified could be used efficiently to separate single *T. cruzi* parasites.

Single parasite sorting of naturally occurring vector populations

The A316A R7 strain was isolated from a triatomine bug in Paraná, southern Brazil. Because this strain presented more than

two alleles for some of the DNA markers used during its genotyping, it was suggested that it was constituted of a mixed population [17]. However, considerable controversy persisted on whether the multiclonal status of this and other *T. cruzi* strains is real [7,8,26–28] or just reflects aneuploidy for the analyzed loci [10,11]. We therefore used the single *T. cruzi* sorting and genotyping approach proposed here to address this question. To this end, we sorted single parasites from the A316A R7 strain and

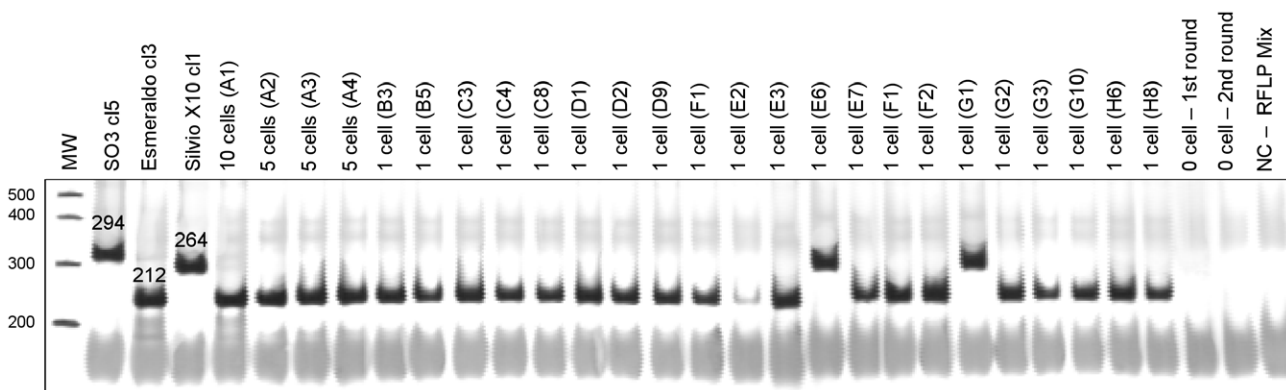


Figure 2. PCR-RFLP profiles of the COII gene from the A316A R7 single sorted parasites. After digestion with *AluI* the COII amplicons generate three RFLP patterns for *T. cruzi*: the presence of a fragment of 264 bp characterizes a mitochondria haplotype A, associated with *T. cruzi* I (e.g., Silvio X10 c1); the presence of a fragment of 212 bp characterizes a mitochondria haplotype C, associated with *T. cruzi* II (e.g., Esmeraldo c13), and the presence of a fragment of 294 bp characterizes a mitochondria haplotype B associated with *T. cruzi* III-VI DTUs (e.g., SO3 c15). Only wells that resulted in positive amplification are shown. Control wells were programmed to contain 0, 2, 5, or 10 parasites. MW: Molecular weight of 25 bp (Invitrogen, USA); NC – RFLP mix: negative control containing only the reaction mix. doi:10.1371/journal.pntd.0001722.g002

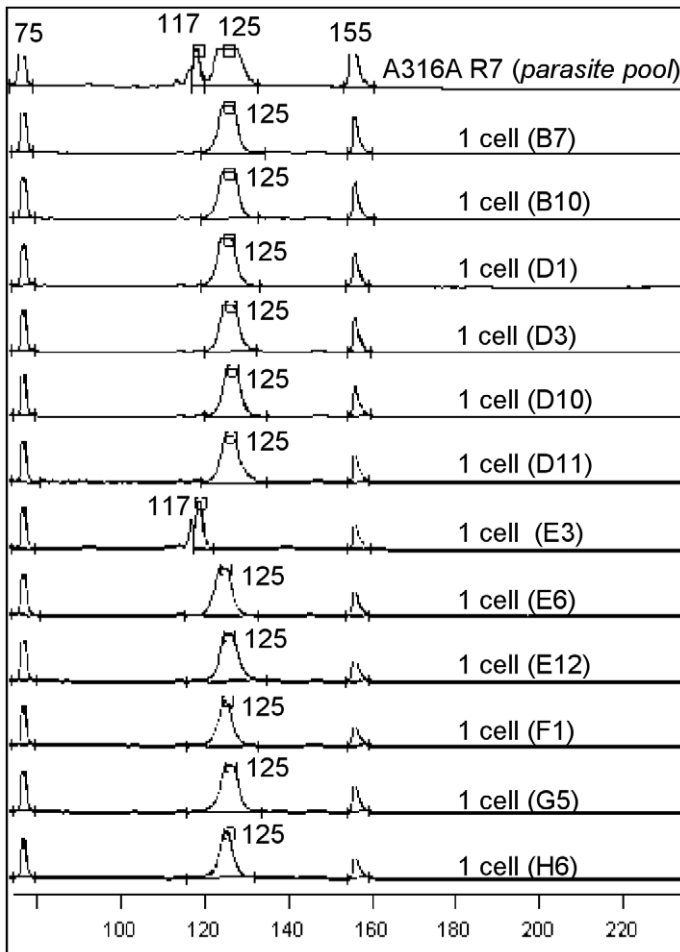


Figure 3. Electrofluorogram presenting the profiles obtained for 24S α rDNA on A316A R7 single sorted parasites. Numbers at the peaks refer to the size of the amplicons in base pairs. The peaks presenting values of 75 and 155 bp refer to internal markers used for alignment in the Allelelocator software. The wells containing single cells that showed positive amplification are also indicated. Control wells presenting DNA of the original strain pool of parasites or 10 sorted parasites were also included.
doi:10.1371/journal.pntd.0001722.g003

genotyped them by using three sets of markers: COII, 24S α rDNA, and microsatellites (Figures 2, 3, 4).

COII haplotypes. The COII profiles obtained for the single sorted parasites and controls are shown in Figure 2. On average 25% of the wells programmed to contain a single cell were positive for this marker. We detected two different RFLP profiles, demonstrating the presence of two subpopulations within the A316A R7 strain: one showing the fragment of 212 bp, which is characteristic of the mitochondrial COII haplotype C and shared by strains belonging to *T. cruzi* II, and another showing the fragment of 264 bp, which is characteristic of the mitochondrial COII haplotype A, and shared by strains belonging to *T. cruzi* I. We also estimated the relative proportion of each subpopulation within the parental A316A R7 strain and found that the *T. cruzi* II parasites were more frequent (approximately 90%) than the *T. cruzi* I (approximately 10%).

24S α rDNA profiles. Figure 3 shows that 42% of wells programmed to contain a single sorted *T. cruzi* were positive for this marker. We detected two different profiles: one presenting 125 bp, compatible with strains belonging to *T. cruzi* II lineage, and another presenting a fragment of 117 bp previously demonstrated for some non-typical *T. cruzi* I strains [29] (Figure 3). Similar to the data obtained by mitochondrial COII haplotype

analysis, we also observed that the *T. cruzi* II population predominates in the original strain (approximately 85%).

Microsatellite typing. Representative results obtained from the microsatellite analyses of the single sorted *T. cruzi* and the controls wells are shown on Figure 4. On average 34% of the wells programmed to contain a single cell were positive for the microsatellites, varying from 23 to 41% depending on the experiment and the evaluated locus. The compiled data derived from all analyzed loci are presented in Table 2. When we analyzed pools of parasites obtained from the A316A R7 strain we detected three alleles for the TcAAAT8 locus (232, 250, and 259 bp), which could be indicative of multiclonality or aneuploidy for this strain. However, the PCR analysis of the same locus performed with the single sorted cells detected two distinct subpopulations: one presenting 232 bp alleles (homozygote profile) and another showing alleles of 250 and 259 bp (heterozygote profile). Similar results were obtained for the other analyzed loci (TcTAT20, TcTAC15, and TcAAAT6). Although the analyses performed with these other loci identified profiles with only two alleles in the original A316A R7 strain, PCR using the single sorted cells allowed us to detect two distinct subpopulations. Indeed, two different but homozygous profiles for the TcTAC15 (96/96 or 99/99 bp) and the TcAAAT6 (251/251 or 275/275 bp) loci were

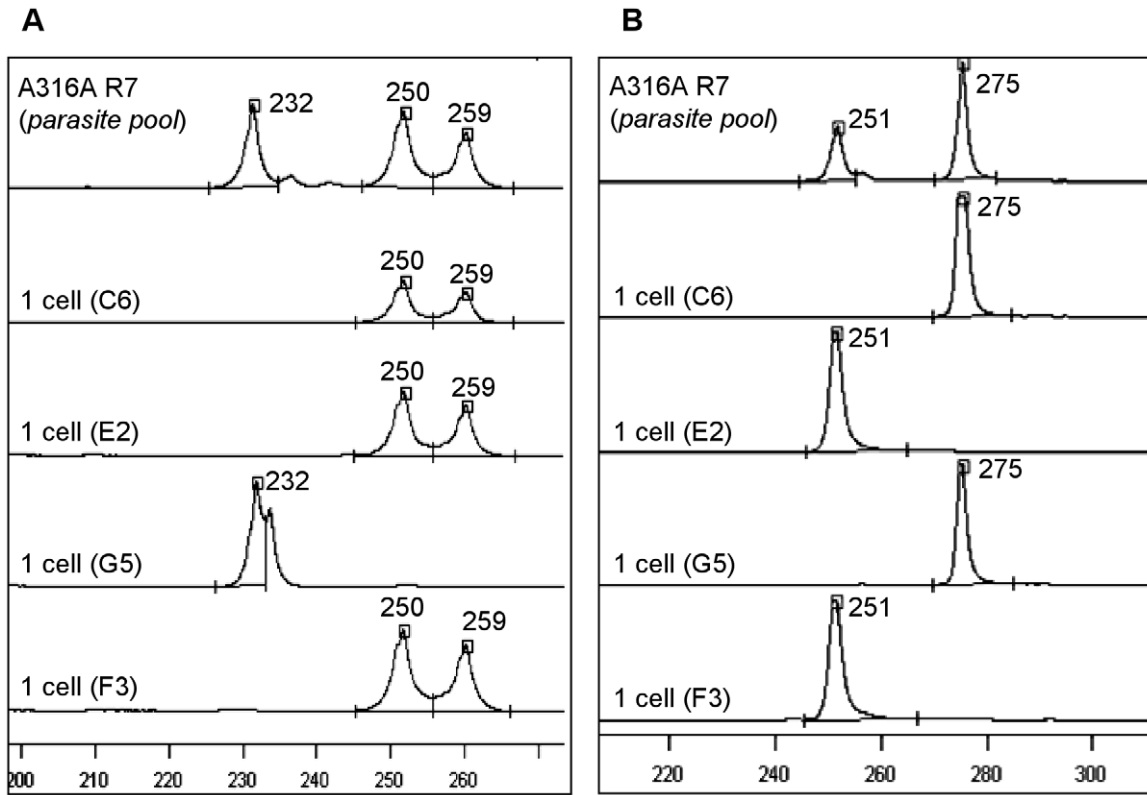


Figure 4. Electrofluorogram of TcAAT8 (A) and TcAAAT6 (B) loci for A316A R7 before and after sorting. Numbers at the peaks refer to the size of the amplicons in base pairs. The peaks presenting values of 75, 210, and 320 bp refer to internal markers used for alignment in the Allelelocator software. The wells containing single cells that showed positive amplification are also indicated. Control wells presenting DNA of the original strain pool of parasites were also included.
doi:10.1371/journal.pntd.0001722.g004

detected. Moreover, the TcTAT20 locus revealed also the presence of two subpopulations: one heterozygous, presenting the 190/238 bp alleles, and another homozygous with the 181/

181bp, which is curious given that this last allele was not detected in the original strain.

Perfect correspondence among the alleles found for each microsatellite locus confirmed the existence of two subpopulations within the A316A R7 strain presenting completely different genotypes: one characterized by the 99/99, 190/238, 250/259, and 275/275 bp alleles and another characterized by the 96/96, 181/181, 232/232, and 251/251 bp alleles for the TcTAC15, TcTAT20, TcAAT8, and TcAAAT6 microsatellite loci, respectively (Table 2). The proportion of wells presenting each of these two subpopulations was estimated as 90% and 10% respectively, a result consistently found from experiments performed using different microplates.

Correlating the microsatellite analyses with the *T. cruzi* DTUs. To determine the *T. cruzi* DTUs for the two subpopulations identified by the microsatellite analyses, we used a duplex PCR strategy designed to simultaneously amplify the TcTAT20 and the 24S α rDNA markers (Table 3). Our results demonstrated that the subpopulations presenting the 181/181 and 190/238 bp alleles for the TcTAT20 locus corresponded, respectively, to those presenting the 24S α rDNA of 117 bp and associated with the *T. cruzi* I, and the 24S α rDNA of 125 bp related to the *T. cruzi* II, both present in the original A316A R7 strain (Table 3).

Single parasite sorting of naturally occurring human populations. Be-62 and Be-78 are two *T. cruzi* strains isolated respectively in 1962 and 1978 from Berenice, the first reported human case of Chagas disease [30]. Although isolated from the same patient, these two strains displayed several biological and molecular differences [19,31–33]. However, because only two

Table 2. Allele sizes for each microsatellite locus amplified from A316A R7 single sorted cells.

Sample/Loci	TcTAC15	TcTAT20	TcAAT8	TcAAAT6
A316A R7 (strain)	99/99	190/238	232/250/259	251/275
1 cell	99/99	190/-	250/259	n.a
1 cell	99/99	190/238	-/259	n.a
1 cell	99/99	190/-	n.a	275/275
1 cell	99/99	190/238	250/259	275/275
1 cell	96/96	181/181	n.a	251/251
1 cell	99/99	190/-	n.a	275/275
1 cell	99/99	190/238	250/259	275/275
1 cell	99/99	190/-	250/259	275/275
1 cell	99/99	190/-	250/259	275/275
1 cell	99/99	190/-	250/-	275/275
1 cell	96/96	181/181	232/232	251/251

Allele sizes are presented in base pairs.
(-), Amplification failure probably due to allele drop-out effect; n.a, not amplified.

doi:10.1371/journal.pntd.0001722.t002

Table 3. Allele sizes of TcTAT20 microsatellite and 24Sα rDNA gene amplified from A316A R7 single cells.

Sample/Loci	TcTAT20	24Sα rDNA	<i>T. cruzi</i> DTU
A316A R7 (strain)	190/238	117/125	<i>T. cruzi</i> I+ <i>T. cruzi</i> II
1 cell	190/238	125	<i>T. cruzi</i> II
1 cell	190/-	125	<i>T. cruzi</i> II
1 cell	190/238	125	<i>T. cruzi</i> II
1 cell	181/181	117	<i>T. cruzi</i> I

Allele sizes are presented in base pairs.
 (-), Amplification failure probably due to allele drop-out effect. *T. cruzi* DTUs according to Zingales *et al.*, 2009.
 In this table are shown only those wells that presented positive amplification for both markers.
 doi:10.1371/journal.pntd.0001722.t003

alleles were detected for the molecular markers used in their characterization, both strains were initially supposed to be monoclonal [34]. Even so, after being inoculated in dogs and mice and re-isolated, major changes in RAPD and isoenzyme profiles were observed in the Be-78 profile, raising the question whether this strain could be indeed a multiclonal population [20]. To answer this query we used the methodology proposed here for sorting Be-78 1B and Be-78 25B, two of the isolates from the Be-78 strain obtained after passages in dog and then in mice. The microsatellite profiles obtained were compared with those observed for the original Be-62 and Be-78 strains and these data were summarized in Table 4. Surprisingly, three different subpopulations were identified: one characterized by the 99/99, 196/205, 262/268, and 271/275 bp alleles and equivalent to the original profile of Be-78; another one characterized by the 99/99, 190/208, 253/262, and 259/275 bp alleles and compatible with the original profile of Be-62; and a third one characterized by the 138/141, 181/181, 292/292, and 263/263 bp alleles for the TcTAC15, TcTAT20, TcAAT8, and TcAAAT6 microsatellite loci, respectively.

Taken together, our results confirm that the devised strategy was able to sort single parasites and reveal that the analyzed naturally occurring vector and human strains are indeed multiclonal and not aneuploid *T. cruzi* populations.

Discussion

To bring further light to the debate regarding the multiclonal status of *T. cruzi* strains, an innovative approach was successfully adapted from a method originally described to genotype single sorted spermatozooids, to separate single parasites. The evidence described herein reveals that multiclonality holds true for two representative *T. cruzi* human and vector strains. The approach we developed employed the FACS Vantage sorting method, which allowed us to estimate the relative contribution of each parasite subpopulation within the strains analyzed.

The efficiency of the approach was initially established by sorting and genotyping single parasites from an artificially composed multiclonal population and not only all the individuals present in the original mixture could be identified, but also the real proportion of each population could be assigned.

The devised method was then used to scrutinize three naturally occurring putative multiclonal populations originally isolated from a vector (A316A R7) and two derived from a patient (Be-78 1B and Be-78 25B). A long-held debate was whether *T. cruzi* strains

Table 4. Allele sizes for each microsatellite amplified from Be-78 1B and Be-78 25B single sorted cells.

Sample/Loci	TcTAC15	TcTAT20	TcAAT8	TcAAAT6
Be-62 (Strain)	99/99	190/208	253/262	259/275
Be-78 (Strain)	99/99	196/205	262/268	271/275
Be-78 1B (Isolate)	99/138/141	190/196/205	253/253	259/275
1 cell Be-78 1B	99/99	n.a	262/268	271/275
1 cell Be-78 1B	138/141	n.a	292/292	263/263
1 cell Be-78 1B	99/99	a.a	253/262	259/275
1 cell Be-78 1B	99/99	n.a	262/268	271/275
1 cell Be-78 1B	138/141	n.a	292/292	263/263
Be-78 25B (Isolate)	99/138/141	181/190/208	253/262/268/292	259/275
1 cell Be-78 25B	99/99	190/208	253/-	259/-
1 cell Be-78 25B	99/99	190/208	253/262	259/275
1 cell Be-78 25B	99/99	190/208	253/262	-/275
1 cell Be-78 25B	138/141	181/181	292/292	263/263
1 cell Be-78 25B	99/99	190/208	253/-	259/275
1 cell Be-78 25B	138/141	181/181	292/292	263/263
1 cell Be-78 25B	99/99	190/208	253/262	259/275
1 cell Be-78 25B	99/99	190/208	253/262	-/275
1 cell Be-78 25B	99/99	190/208	253/-	259/275
1 cell Be-78 25B	138/141	181/181	292/292	263/263

Allele sizes are presented in base pairs.
 (-), Amplification failure probably due to allele drop-out effect; n.a, not amplified or not analyzed.
 In this table are shown the alleles from wells derived from different experiments that presented positive amplification for at least three microsatellite loci.
 doi:10.1371/journal.pntd.0001722.t004

presenting more than two alleles for some polymorphic markers were really multiclonal or aneuploid populations [7,9,10].

Previous work suggested that the A316A R7 strain was a mixture of distinct populations [18,29]. Our new results involving the microsatellite analysis of single sorted parasites confirmed the presence of different subpopulations within this strain, ruling out aneuploidy as a possible explanation for the complex genetic patterns presented by this population.

Interesting results were observed with the human *T. cruzi* strain. Great controversy remains on whether or not Berenice, the first patient of Carlos Chagas, has been infected with a multiclonal *T. cruzi*. This was due to the fact that two different but apparently monoclonal populations (Be-62 and Be-78) were isolated from her [34]. The observation that Be-78 has changed its molecular and biochemical characteristics after passages in dogs and mice strengthened this possibility, suggesting that the passage in different hosts could have grown previously undetectable subpopulations within the original strain. Here we showed that Be-78 1B and Be-78 25B (two of the *T. cruzi* populations derived from a dog infected with Be-78 after 1 or 25 successive passages in mice) were constituted by three subpopulations: one compatible with Be62, another equivalent to the Be78, and a third one not identified before. Therefore, the complexity of this *T. cruzi* strain is even greater than originally expected.

We also detected alleles not previously reported for the analyzed strains. The probable reason they were not found before is that when alleles of less representative subpopulations are lower than

15% in the DNA artificial mixture, they cannot be detected by conventional PCR (our unpublished data).

Another remarkable result was observed regarding the TcAAAT6 profiles of the single sorted parasites. The analysis of the vector strain showed the presence of two alleles of 251 and 275 bp, initially interpreted as a typical heterozygote genotype. However, the analysis of the single parasites using this locus showed the presence of two different subpopulations both presenting homozygote profiles. This finding emphasizes the advantage of genotyping single cells instead of pools of parasites, because conventional PCR cannot distinguish between the presence of a homogeneous population presenting two different alleles, and a heterogeneous population constituted by two different and homozygous individuals. Interestingly, by using the methodology presented here we successfully identified the subpopulations presented in a multiclonal strain as well as estimate the proportion of each subpopulation.

A drawback inherent to use of a single cell is failure of amplification of one of the two alleles of some loci, a phenomenon known as allele drop-out (ADO). Due to its characteristics, ADO can be misleading as false homozygosity, as one of the alleles in heterozygote loci is undetectable [35]. Although we observed ADO in some of our analyses, it did not interfere with the single-cell genotyping because we analyzed simultaneously 96 plated cells and a variety of loci. Contrasting to real homozygosity, ADO is a random phenomenon and it does not occur in the same way in all wells and loci. Thus, the more plates and therefore the more single cells analyzed, more reliable the results will be, a possibility easily achievable by the cell sorting method devised.

In summary, by using the strategy proposed here for sorting and genotyping *T. cruzi* single cells we successfully identified the complexity of representative human and vector *T. cruzi* strains and estimated the relative contribution of each subpopulation. These

results have important implications in settling the debate regarding multiclonality versus aneuploidy in these representative strains. Moreover, our results indicate that the complexity of *T. cruzi* strains may be even greater than initially expected.

It is worth noting that the methodology described herein has the potential to close the discussion concerning multiclonality. Knowledge about complexity of *T. cruzi* strains is essential for determining the aspects involved in differential parasite tissue tropism, clinical manifestations of the disease, and drug resistance. The single-cell genotyping approach allowed the analysis of the intrapopulation diversity to a degree not achieved previously by conventional methods, and may represent a powerful and new tool for the understanding of the population structure and dynamics of *T. cruzi*.

Supporting Information

Figure S1 Dot plot captured by FACS showing the autofluorescence pattern and the gated *T. cruzi* cells. (TIFF)

Acknowledgments

We thank Neuza A. Rodrigues, Kátia B. Gonçalves, Afonso C. Viana, and Cássio M.F. Costa for expert technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AMM SDJP CRM GRF. Performed the experiments: HMSV JRP. Analyzed the data: HMSV JRP MS AMM SDJP CRM GRF. Contributed reagents/materials/analysis tools: AMM SDJP CRM GRF VMV MLG EC KJG MTB ML. Wrote the paper: HMSV MS AMM SDJP.

References

- Coura JR, Dias JC (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 31–40.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ (2002) The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 603–612.
- Macedo AM, Pena SD (1998) Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today* 14: 119–124.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, et al. (2000) Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol* 156: 1805–1809.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, et al. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051–1054.
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, et al. (2009) The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. *Parasitology* 136: 1509–1528.
- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, et al. (1998) Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3776–3780.
- Valadares HM, Pimenta JR, de Freitas JM, Duffy T, Bartholomeu DC, et al. (2008) Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int J Parasitol* 38: 839–850.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD (2004) *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 1–12.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, et al. (2003) Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421: 936–939.
- Lewis MD, Llewellyn MS, Gaunt MW, Yeo M, Carrasco HJ, et al. (2009) Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *Int J Parasitol* 39: 1305–1317.
- Dvorak JA, Hall TE, Crane MS, Engel JC, McDaniel JP, et al. (1982) *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J Protozool* 29: 430–437.
- Engel JC, Dvorak JA, Segura EL, Crane MS (1982) *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. *J Protozool* 29: 555–560.
- Postan M, McDaniel JP, 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: 236–238.
- Pinto AS, de Lana M, Bastrenta B, Barnabe C, Quesney V, et al. (1998) Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. *Parasitol Res* 84: 348–353.
- Li H CX, Arnheim N (1991) Analysis of DNA sequence variation in single cells. Abelson JN SM, editor. San Diego: Academic Press.
- Spitzner FL, de Freitas JM, Macedo AM, Toledo MJO, Araújo SM, et al. (2007) *Trypanosoma cruzi* - triatomine associations and the presence of mixed infections in single triatomine bugs in Paraná state, Brazil. *Acta Parasitologica* 52: 74–81.
- Abolis NG, Araujo SM, Toledo MJ, Fernandez MA, Gomes ML (2011) *Trypanosoma cruzi* I-III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. *Acta Trop* 120: 167–172.
- Lana M, Chiari CA (1986) [Comparative biological characterization of Berenice and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from the same patient at different times]. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 247–253.
- Veloso VM, Romanha AJ, Lana M, Murta SM, Carneiro CM, et al. (2005) Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. *Parasitol Res* 96: 382–389.
- Santelo FH, Dost CK, Albuquerque S (1998) Morphometric characterization of a strain of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93.
- Souto RP, Zingales B (1993) Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol* 62: 45–52.
- de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Goncalves VF, et al. (2006) Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2: e24.

24. Carranza JC, Valadares HM, D'Avila DA, Baptista RP, Moreno M, et al. (2009) *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol*.
25. Macedo AM, Pimenta JR, Aguiar RS, Melo AI, Chiari E, et al. (2001) Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 407–413.
26. Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ (1986) Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 115–119.
27. Carneiro M, Chiari E, Goncalves AM, da Silva Pereira AA, Morel CM, 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.
28. Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SD (1992) DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol* 55: 147–153.
29. Spitzner FL, Freitas JM, Macedo AM, Toledo MJO, Araújo SM, et al. (2007) *Trypanosoma cruzi* - triatomine associations and the presence of mixed infections in single triatomine bugs in Paraná state, Brazil. *Acta Parasitologica* 52: 74–81.
30. Chagas C (1909) Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159–152.
31. de Lana M, Chiari CA, Chiari E, Morel CM, Goncalves AM, et al. (1996) Characterization of two isolates of *Trypanosoma cruzi* obtained from the patient Berenice, the first human case of Chagas' disease described by Carlos Chagas in 1909. *Parasitol Res* 82: 257–260.
32. de Lana M, Chiari E, Tafuri WL (1992) Experimental Chagas' disease in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 59–71.
33. Araujo FM, Bahia MT, Magalhaes NM, Martins-Filho OA, Veloso VM, et al. (2002) Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. *Acta Trop* 81: 21–31.
34. Cruz RE, Macedo AM, Barnabe C, Freitas JM, Chiari E, et al. (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.
35. Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC, 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: 411–420.

**CAPÍTULO 4 - Diagnóstico molecular, genotipagem e estudo da
variabilidade genética do *T. cruzi* presente em amostras de
pacientes chagásicos cardiopatas transplantados**

4.1. O Transplante cardíaco

As manifestações cardíacas, que aparecem 10 a 30 anos após a infecção primária, durante a fase crônica da doença de Chagas, são atribuídas a causas multifatoriais, incluindo persistência do parasito no tecido, comprometimento vascular, destruição de gânglios do sistema nervoso autônomo, e autoimunidade (Kierszenbaum, 2005). Cardiomiopatia chagásica é caracterizada por infiltrado inflamatório focal ou disseminado, citólise e necrose de cardiomiócitos, e fibrose progressiva, resultando em danos à matriz extracelular e substituição de miócitos cardíacos e células vasculares por tecido fibroso, com a remodelação do miocárdio (Andrade and Andrade, 1955; Andrade and Lopes, 1963). Na ausência de um tratamento específico e eficaz, a cardiomiopatia chagásica crônica é tratada como todas as outras síndromes de insuficiência cardíaca. Quando a doença progride, o transplante cardíaco (HTx) continua a ser uma das poucas opções terapêuticas. No entanto, esta opção é limitada pelo pequeno número de doadores e pelas complicações da terapia imunossupressora, incluindo a possibilidade de reativação da doença de Chagas.

Nos grandes centros do Brasil, a doença de Chagas é a terceira razão mais comum para o transplante cardíaco. Neste aspecto, o Brasil tem ocupado cada vez mais espaço no campo dos transplantes, com destaque na América Latina, e acima de tudo como país referência no transplante cardíaco na doença de Chagas, guiando condutas que são incorporadas no mundo todo (Bacal et al., 2010).

Recentemente, foi relatado que, durante um período de 25 anos, dos 409 pacientes que foram submetidos a transplante cardíaco no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas (HC) da USP, 107 eram portadores da doença de Chagas (Fiorelli et al., 2011).

O hospital referência em transplante de coração em Minas Gerais é o HC da UFMG. Credenciado em junho de 2006 para a realização de HTx, o HC da UFMG é atualmente, o segundo maior centro transplantador do país. Nos últimos seis anos, apenas no HC da UFMG, ocorreram cerca de 120 HTx, sendo aproximadamente 50% destes pacientes chagásicos (comunicação pessoal Dra. Maria da Consolação Moreira).

4.1.1. Avaliação do doador

Para a captação de órgãos o HC da UFMG conta com a Comissão Intra-Hospitalar de Doações de Órgãos e Tecidos para Transplantes. Essa comissão é formada por profissionais de saúde preparados para o contato com a família do doador e após a constatação da morte cerebral (segundo os critérios do Conselho Regional de Medicina), essa comissão faz contato com a família do paciente para a captação.

Além de apresentar morte encefálica, o doador deve possuir o coração estruturalmente normal, sorologia negativa para HIV, HTLV I e II, hepatites e doença Chagas, não ter sepse fora do controle e ter condições hemodinâmicas e ventilatórias que permitam o procedimento de retirada do órgão. Deve também ser excluída a possibilidade do doador ter tuberculose ativa ou ser portador de neoplasias malignas, salvo os tumores restritos ao sistema nervoso central, carcinoma basocelular e carcinoma de cérvix uterino *in situ*. Se o doador tem idade superior a 45 anos deve ser feito um cateterismo para excluir a presença de doenças coronarianas (Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - <http://www.abto.org.br/>).

4.1.2. O receptor - Indicações e contraindicações para transplante cardíaco

Quando uma criteriosa seleção é utilizada para a escolha do doador e do receptor, há um significativo aumento na sobrevida, na capacidade de exercício, no retorno ao trabalho e na qualidade de vida (Luckraz et al., 2005).

Pacientes portadores de insuficiência cardíaca avançada, classes funcionais III ou IV (quadro 4.1), com sintomas graves sem alternativa de tratamento clínico e com pior prognóstico têm indicação para transplante cardíaco (Bocchi et al., 2009; Dickstein et al., 2008; Mehra et al., 2006).

Quadro 4.1: Classificação funcional da insuficiência cardíaca de acordo com a *New York Heart Association* (NYHA).

Classe funcional NYHA	
I	Sem sintomas (dispnéia) e nenhuma limitação em atividades cotidianas.
II	Leves sintomas e limitações em atividades cotidianas. Confortáveis no repouso.
III	Com limitação importante na atividade física; atividades menores que as cotidianas produzem sintomas. Confortáveis somente em repouso.
IV	Severas limitações. Sintomas presentes mesmo em repouso.

Alguns critérios de indicações e contraindicações para o transplante cardíaco têm mudado nos últimos anos, principalmente com relação à idade, teste cardiopulmonar, resistência vascular pulmonar, obesidade, câncer, diabetes melito, doença de Chagas, insuficiência renal, doença vascular periférica, e abuso de drogas (Mehra et al., 2006; Weiss et al., 2008). As indicações para o HTx estão resumidas na Tabela 4.1.

Portadores de neoplasia que têm baixo grau de malignidade podem ser aceitos. Em tumores com resposta à quimioterapia e ausência de metástase, o transplante cardíaco deve ser considerado com permissão do oncologista (Mehra et al., 2006). Doença vascular periférica é considerada uma contraindicação relativa quando limita a reabilitação e não há condições de revascularização (Odim et al., 2006). Pacientes com dependência química e tabagismo devem ter abstinência superior a 6 meses e acompanhamento da equipe multidisciplinar para indicação de transplante cardíaco. A doença de Chagas deixou de ser uma controvérsia devido aos seus bons resultados, com baixa incidência de reativação e sobrevida superior às outras etiologias (Bacal et al., 2010). As contraindicações ao HTx estão resumidas na Tabela 4.2.

Tabela 4.1: Indicações de transplante cardíaco

Classe de recomendação	Indicações
<i>Classe I</i> - Consenso sobre a indicação do procedimento/tratamento.	IC refratária na dependência de drogas inotrópicas e/ou de suporte circulatório e/ou ventilação mecânica;
	VO ₂ pico ≤ 10 ml/Kg/min;
	Doença isquêmica com angina refratária sem possibilidade de revascularização;
	Arritmia ventricular refratária;
<i>Classe IIa</i> - Evidências favorecem a indicação do procedimento/tratamento.	Classe funcional III ou IV persistente.
	Uso de BB com VO ₂ pico ≤ 12 ml/Kg/ min;
	Sem uso de BB com VO ₂ pico ≤ 14 ml/ Kg/min;
	Teste da caminhada dos 6 minutos < 300 metros;
<i>Classe III</i> - Não indicado o procedimento/tratamento.	Teste cardiopulmonar com relação VE/ VCO ₂ > 35 e VO ₂ pico ≤ 14 ml/Kg/min.
	Presença de disfunção sistólica isolada;
	Classe funcional III ou IV sem melhora terapêutica

BB - betabloqueador; VO₂ - consumo de oxigênio; VE/VCO₂ – ventilação do dióxido de carbono.
Fonte: (Bacal et al., 2010).

Tabela 4.2: Contraindicações absolutas e relativas para transplante cardíaco

Contraindicações absolutas	Doenças cerebrovascular e/ou vascular periférica graves;
	Insuficiência hepática irreversível, doença pulmonar grave;
	Incompatibilidade ABO na prova cruzada prospectiva entre receptor e doador;
	Doença psiquiátrica grave, dependência química e não aderência às recomendações da equipe.
	Resistência vascular pulmonar fixa > 5 Wood, mesmo após provas farmacológicas;
Contraindicações relativas	Idade maior do que 70 anos;
	Diabetes insulino dependente com lesões graves de órgãos-alvo;
	Comorbidades com baixa expectativa de vida;
	Obesidade mórbida;
	Infecção sistêmica ativa;
	Úlcera péptica em atividade;
	Embolia pulmonar com menos de três semanas;
	Neoplasia com liberação do oncologista;
	Diabetes melito de difícil controle;
	Insuficiência renal com <i>clearance</i> abaixo de 30 ml/min/1,73 m ² ;
	Amiloidose/sarcoidose/hemocromatose;
	Hepatite B ou C;
	Síndrome de imunodeficiência adquirida;
Painel linfocitário > 10%.	

Fonte: (Bacal et al., 2010).

4.1.3. Aspectos cirúrgicos do transplante cardíaco

A técnica clássica ou biatrial descrita inicialmente por Shumway e cols. (1966), ainda tem sido empregada no transplante cardíaco, devendo-se ter especial atenção com a preservação da geometria atrial, evitando-se distorções ou permanência de grandes cavidades. Suas principais complicações são: formação de trombos intra-atriais, arritmias e insuficiência das valvas atrioventriculares (Chacur et al., 1997).

No início da década de 1970, (Webb et al.) idealizaram a técnica bicaval, também chamada de ortotópica total. Na técnica bicaval, a secção da veia cava superior deve ser feita junto à veia ázigos; a secção da veia cava inferior deve ser feita na reflexão do diafragma; e a

secção das veias pulmonares deve ser feita na inserção com o átrio esquerdo, mantendo-se um segmento de parede atrial entre elas. No receptor, é obrigatória a canulação direta das veias cavas. A veia cava superior é seccionada na inserção com o átrio direito e um grande segmento de átrio direito adjacente é mantido junto à veia cava inferior.

Na técnica bicaval, o átrio esquerdo é totalmente removido, permanecendo apenas dois segmentos onde se inserem as veias pulmonares para sutura do átrio esquerdo. Essa variante tem, entre outras, algumas vantagens: preservar a geometria atrial, diminuir a incidência de arritmias no período pós-operatório e de insuficiência tricúspide (Aziz et al., 1999; Forni et al., 1995). A técnica utilizada para os transplantes do HC da UFMG é a bicaval.

4.2. Justificativa e objetivos

Estudos de diversidade genética do parasita em pacientes com a doença de Chagas cardíaca crônica são extremamente importantes na compreensão de sua patogênese. A maioria dos estudos que examinaram a associação de DTUs com manifestações da doença de Chagas caracterizou parasitos isolados de amostras de sangue dos pacientes, impedindo a detecção de populações naturais com tropismo diferencial, por exemplo, para o tecido cardíaco. Ainda, de uma maneira geral, os métodos de estudos de diversidade genética do *T. cruzi* dependem do isolamento e manutenção do parasito em laboratório, o que tende a selecionar clones que crescem melhor em meios de cultura, ocultando a variabilidade do isolado original. Isto poderia explicar porque, embora promissoras, as tentativas de se correlacionar a diversidade genética dos parasitos com o tropismo tecidual diferencial de cepas e as formas clínicas da doença de Chagas, até o momento não pôde ser estabelecida (Macedo et al., 2004; Macedo and Pena, 1998).

Neste contexto, foi nosso objetivo aplicar sensíveis estratégias moleculares para caracterizar as DTUs de *T. cruzi* em amostras de explantes cardíacos com miocardite e amostras de sangue periférico obtidos a partir de um grupo de pacientes em estágio final da cardiopatia chagásica crônica submetidos a transplante cardíaco. Também foram avaliadas biópsias endomiocárdicas de seguimento pós-transplante e amostras de tecidos obtidas de pacientes que tiveram reativação da doença de Chagas. Visando responder algumas questões que ainda

persistem sobre a associação entre a genética do parasito e de seu hospedeiro, e a epidemiologia molecular da doença foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a presença de *T. cruzi* em biópsias de corações explantados e outras amostras de pacientes cardiopatas chagásicos submetidos a transplante cardíaco em Belo Horizonte, Minas Gerais.
- Avaliar a distribuição do DNA de *T. cruzi* nos tecidos cardíacos explantados.
- Genotipar as amostras positivas de *T. cruzi* classificando-as das seis DTUs.
- Caracterizar subpopulações de *T. cruzi* nessas amostras por LSSP-PCR para identificar padrões genéticos possivelmente associados à forma cardíaca grave.
- Comparar o perfil genético dos parasitos isolados antes e após o transplante, em casos de reativação da doença, para avaliar se há ocorrência de subpopulações de *T. cruzi* mais associadas à reativação da doença de Chagas.

4.3. Material e Métodos

4.3.1. Pacientes e amostras

Estudos retrospectivos e prospectivos foram realizados com 42 pacientes portadores de cardiopatia chagásica que foram submetidos a transplante cardíaco no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais no período entre 2008 e 2012. O grupo controle negativo foi constituído por 6 pacientes com cardiopatia terminal, submetidos ao transplante cardíaco devido à miocardiopatia dilatada, mas com sorologia negativa para doença de Chagas. O diagnóstico de doença de Chagas foi realizado, previamente ao transplante, baseado em pelo menos duas reações sorológicas positivas, segundo recomendação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005). No HC, os métodos diagnósticos utilizados de rotina são hemaglutinação e imunofluorescência indiretas, sendo os resultados conflitantes confirmados pelo método de ELISA. Todos os pacientes receberam tratamento imunossupressor com ciclosporina A, mofetil micofenolato e prednisona, como parte do protocolo para prevenção de episódios de rejeição. Além do tratamento imunossupressor, nenhuma terapia profilática anti *T. cruzi* pré ou pós transplante foi administrada aos pacientes.

Sempre que possível o sangue dos pacientes foi coletado antes, no momento e após o transplante, para monitoramento. Parte do sangue foi destinada ao diagnóstico molecular de *T.*

cruzi e parte para hemocultura realizada de acordo com Filard e Brener, (1987). Uma amostra de DNA extraída de uma mistura de sangues de 200 indivíduos com sorologia negativa para doença de Chagas também foi utilizada como controle negativo das reações de PCR.

Após o transplante, cada coração explantado foi seccionado e seis regiões foram selecionadas para análise histológica e molecular: átrios direito e esquerdo, ventrículos direito e esquerdo, ponta do ventrículo esquerdo e septo interventricular. Parte das amostras analisadas foi obtida no banco de amostras do HC, coletadas entre 2008 e 2011, haviam sido fixadas em formaldeído tamponado com PBS e em seguida embebidas em parafina (estudo retrospectivo). Parte das amostras foi coletada no momento do transplante cardíaco, entre 2008 e 2012, e foram fixadas em etanol absoluto (estudo prospectivo).

Biópsias endomiocárdicas para pesquisa de *T. cruzi* foram feitas, periodicamente, durante o acompanhamento pós-cirúrgico de todos os pacientes, conforme as bases de protocolo de vigilância de rejeição - semanais no primeiro mês após o transplante, quinzenais no segundo mês, mensais até o sexto mês e, a seguir trimestrais até completar um ano de transplante (Protocolo do HC da UFMG).

Na presença de sinais e sintomas sugestivos de reativação da doença de Chagas cardíaca, além da biópsia endomiocárdica, amostras de sangue e dos tecidos suspeitos foram triados para pesquisa do parasito. O diagnóstico de reativação da doença de Chagas foi confirmado somente após a detecção do parasito no sangue, por pesquisa direta e/ou cultura, ou depois de achados consistentes com uma resposta inflamatória detectada por técnicas de histologia de rotina e imunohistoquímica nos tecidos suspeitos.

O tratamento com benzonidazol, na dose de 5 a 10mg/kg/dia, durante 60 dias, foi instituído apenas para os pacientes que tiveram diagnóstico de reativação da doença de Chagas.

Os pacientes participantes deste estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. Os objetivos e procedimentos constantes deste projeto foram submetidos e aprovados pelo CONEP (1570/2002) e COEP/UFMG (0564/2011).

4.3.2. Preparação do DNA genômico do *T. cruzi*

Cinco mL de sangue periférico foram misturados imediatamente após a coleta com igual volume de solução de hidrocloreto de guanidina (6M) e 0,2 M de EDTA (pH 8,0). Após uma semana, as amostras foram imersas em banho fervente por 15 min e posteriormente o DNA foi extraído pelo método fenol/clorofórmio (Schijman et al., 2011). As câmaras cardíacas fixadas em etanol foram individualmente cortadas em pedaços bem pequenos com auxílio de bisturi. Para extração de DNA os tecidos cardíacos frescos foram processados utilizando o kit QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen, Valencia, CA). Para manipulação dos tecidos parafinados foram realizadas de 5 a 10 secções de 10 µm de espessura cada, nos blocos de parafina contendo fragmentos das câmaras cardíacas. Estes fragmentos foram processados com o Kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Valencia, CA) para extração do DNA, segundo as orientações do fabricante.

O controle dos procedimentos de extração, bem como a verificação da integridade dos DNAs extraídos, foi realizado por amplificação de uma região polimórfica do tipo InDel do DNA humano, utilizando o iniciador MID-768 (Weber et al., 2002) (Tabela 4.3). Como controle positivo desta PCR foi utilizado DNA extraído de *pool* de sangue humano pelo método fenol/clorofórmio e como controle negativo os reagentes da PCR sem adição de DNA.

4.3.3. Diagnóstico molecular de *T. cruzi*

4.3.3.1. PCR kDNA

A detecção do DNA do *T. cruzi* nos tecidos foi inicialmente realizada por amplificação específica do fragmento de 330 pb correspondente à região variável do minicírculo do kDNA. A PCR foi realizada para volume final de 20 µL contendo 1,5 mM MgCl₂, tampão *Green Go Taq* pH 8.5 (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 250 mM de dNTPs, iniciadores 121 e 122 (Wincker et al., 1994) (Tabela 4.3) a 1 mM, 1 U de *Go Taq Flexi* DNA polimerase (Promega) e 3 µL do total da amostra extraída diretamente do tecido do paciente. A reação de amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificação com anelamento a 60°C, extensão a 72°C, e desnaturação a 94°C durante 1 minuto cada etapa. Ao final, a etapa de extensão foi prorrogada para 10 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados gel de poliacrilamida 6% corados pela prata (Santos et al., 1993).

Tabela 4.3: Sequências dos iniciadores utilizados neste trabalho.

Técnica	Iniciador	Sequência	Referência
Controle de extração de DNA	MID-768-F	5'-CATTACCAGTAGAGTGGGGA-3'	Weber <i>et al.</i> , 2002
	MID-768-R	5'-CTATGCCCTACTGGATCTAGG-3'	
PCR-kDNA	121-direto	5'-AAATAATGTACGGGKAGATGCATGA-3'	Wincker <i>et al.</i> , 1994
	122-reverso	5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA-3'	
LSSP-PCR	S35G	5'-AAATAATGTACGGGGGAGAT-3'	
PCR-RFLP COII	DsMit-direto	5'-TGCATTACTCCTTTCTACAG-3'	Freitas <i>et al.</i> , 2006
	DsMit-reverso	5'-AACTCGCTACATTGTCCATA-3'	
	Tcmit-10	5'-CCATATATTGTTGCATTATT-3'	
	Tcmit-21	5'-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3'	
PCR rDNA 24S α	D71-direto	5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3'	Souto <i>et al.</i> , 1993
	D72-reverso	5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'	
	D75-direto	5'-CAGATCTTGGTTGGCGTAG-3'	
PCR ITS-miniexon	TCac-direto	5'-CTCCCCAGTGTGGCCTGGG-3'	Burgos <i>et al.</i> , 2007
	UTCC-reverso	5'-CGTACCAATATAGTACAGAACTG-3'	

4.3.3.2. PCR Real time rDNA 24S α

Como um segundo teste diagnóstico molecular do *T. cruzi*, foi realizado uma hemi *nested* PCR do gene do rRNA 24 S α seguida da identificação dos produtos a partir das curvas de dissociação por PCR em tempo real (Freitas *et al.*, 2005). Além de método diagnóstico, esta técnica já permite a identificação das DTUs TcI versus TcII-TcVI diretamente nos tecidos humanos cronicamente infectados.

Para isso, cinco μ L do produto da extração obtido a partir das amostras de tecido foram usados como molde da primeira etapa de amplificação utilizando os iniciadores D75 e D72 (Tabela 4.3). As reações da segunda etapa de amplificação foram realizadas em aparelho de PCR em tempo real (ABI7900-Applied Biosystems) utilizando SYBR Green[®] PCR Master Mix Master (Applied Biosystems), os iniciadores D71 e D72 e 2 μ L de produto da primeira PCR, como molde.

Como controles positivos das reações de amplificação, utilizamos DNA de cepas ou clones que representam as DTUs TcI (clone Col1.7G2, $T_M \sim 81^\circ\text{C}$) e TcII (cepa JG, $T_M \sim 76^\circ\text{C}$). Além destes, controles negativos (pool sangue humano soronegativo para doença de Chagas e brancos – mix sem DNA) foram utilizados em cada etapa de reação.

4.3.4. Caracterização das subpopulações de *T. cruzi*

As amostras positivas para a reação de amplificação do kDNA e/ou rDNA 24S α foram submetidas à caracterização molecular a fim de classificar cada isolado de *T. cruzi* como uma das seis linhagens ou DTUs principais (TcI a TcVI) (Zingales et al., 2009). Visto que nenhum marcador individual permite uma resolução completa de todos os DTUs, uma estratégia simples e reprodutível baseada em três marcadores disponíveis sob a forma de um ensaio sequencial inicialmente proposta por D'Ávila et al. (2009) foi utilizada neste trabalho. Os marcadores selecionados compreendem o gene COII (de Freitas et al., 2006), o espaçador intergênico dos genes de minixon (Burgos et al., 2007) e o gene rDNA 24S α (Souto et al., 1996) (Figura 4.1).

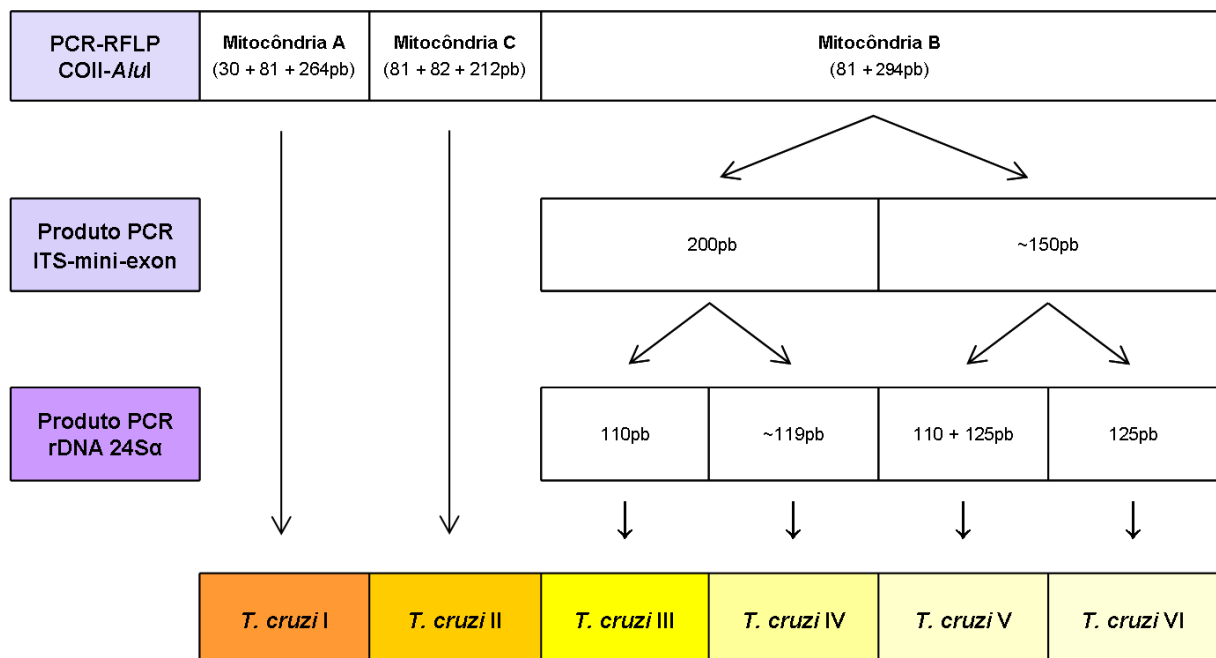


Figura 4.1: Esquema do ensaio tripla utilizado para discriminar as seis linhagens principais de *T. cruzi* neste trabalho. Fonte: (Macedo and Segatto, 2010).

4.3.4.1. PCR-RFLP do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II

Para permitir a amplificação do marcador mitocondrial COII diretamente de tecidos de pacientes, a técnica inicialmente proposta por Freitas *et al.* (2006), teve que ser adaptada para inclusão de uma etapa adicional de *full nested* PCR (Valadares *et al.*, 2008). A análise do perfil dos fragmentos de restrição do gene COII permite a discriminação de TcI e TcII, mas não diferencia as demais linhagens (TcIII, IV, V e VI). Os pares de iniciadores DsMit-F/DsMit-R e TcMit10/TcMit21 (Tabela 4.3) foram utilizados para a primeira e a segunda etapas de PCR, respectivamente. Após as amplificações, os produtos foram digeridos com a enzima de restrição *Alu* I (Promega), de acordo com as indicações do fabricante. Como padrões de comparação dos RFLPs foram utilizados DNAs de cepas e clones característicos das linhagens: TcI (clone Col.17G2, fragmentos: 30, 81, 264 pb; haplótipo A), TcII (cepa JG, fragmentos: 81 e 212 pb; haplótipo C) e TcIII-VI (clone CL Brener, fragmentos: 81 e 294 pb, haplótipo B).

4.3.4.2. Amplificação da região intergênica dos genes miniexon

Para a amplificação da região intergênica dos genes de miniexon, foram usados os iniciadores TCac e UTCC (Tabela 4.3). A análise dos produtos amplificados em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata permite distinguir as cepas pertencentes às DTUs TcIII e TcIV (estas apresentam um *amplicon* de ~200 pb), das cepas pertencentes às DTUs TcI, TcII, TcV e TcVI (estas apresentam um *amplicon* de ~150-157 pb) (Burgos *et al.*, 2007). Como padrões de comparação foram utilizados DNA das cepas 231 e CL Brener característicos das linhagens TcIII-IV e TcV-VI, respectivamente.

4.3.4.3. Amplificação da região 3' do gene rDNA 24S α

Um protocolo de hemi *nested* PCR, adaptado de Souto *et al.* (1996), foi utilizado para a amplificação do gene rDNA 24S α . Esta reação permite a resolução das quatro DTUs que não podiam ser completamente discriminadas nas etapas anteriores: TcIII, IV, V e VI. Os pares de iniciadores D75/D72 e D71/D72 (Tabela 4.3) foram utilizados para a primeira e segunda etapa, respectivamente. Como controles positivos das amplificações foram utilizados DNA de cepas ou

clones que representam os DTUs TcI (clone Col1.7G2, fragmento de 110 pb), TcII (cepa JG, fragmento de 125 pb) e o TcV (clone SO3 Cl5, fragmentos de 110 e 125 pb).

4.3.5. Low-stringency Single Specific Primer polymerase chain reaction (LSSP-PCR)

A reação de PCR em baixa estringência utilizando um único iniciador ou LSSP-PCR foi empregada para discriminar variações intralinhagens em populações de *T. cruzi*. A técnica também permite avaliar o tropismo tecidual diferencial das populações de *T. cruzi* detectadas diretamente em diferentes tecidos de um mesmo paciente.

Para isso, 15 µL dos produtos de amplificação da reação do minicírculo do kDNA, utilizada inicialmente para o diagnóstico molecular de *T. cruzi*, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (1,0 g agarose + 0,5 g *low melting point* agarose) por 1,5h. A banda correspondente ao produto da região variável do kDNA de *T. cruzi*, aproximadamente 330 pb, foi purificada do gel, diluída 10 vezes em água *Milli-Q* estéril e utilizada como alvo em uma segunda reação de PCR sob baixa estringência, usando um único iniciador, S35G (Tabela 4.3). Para um volume final de 10 µL foram utilizados 1,5 mM de MgCl₂, 2 µL de *Colorless Go Taq Reaction Buffer* pH 8,5 (Promega), 50 mM de dNTPs, 4,5 mM do iniciador, 1,6 U de *Go Taq DNA Polimerase* (Promega) e 1,0 µL da solução contendo a banda de 330 pb purificada preparada como descrito anteriormente. Após 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 40 ciclos de amplificação foram realizados com temperatura de anelamento a 30°C, extensão a 72°C e desnaturação a 94°C por 1 minuto cada. Em seguida, uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da LSSP-PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corado com prata. Duplicatas das reações de LSSP-PCR foram realizadas em dias distintos para avaliação da estabilidade dos perfis.

4.3.6. Análises estatísticas

O índice kappa foi calculado no para avaliar a concordância entre as diferentes PCRs utilizadas para diagnóstico molecular. Valor de *Kappa* > 0,75 é classificado como excelente concordância, variando de 0,75 a 0,40 como bom a razoável e < 0,40 como ruim (Fleiss, 1981). As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste exato de Fisher. O teste Z foi aplicado para

comparação de duas proporções independentes. Valores de $P < 0,05$ foram considerados para denotar significância estatística.

4.4. Resultados e Discussão

4.4.1. Pacientes

O Hospital das Clínicas da UFMG é um dos principais centros médicos brasileiros envolvidos em transplante cardíaco. Entre os anos de 2008 e 2012, em torno de 100 pacientes cardiopatas foram transplantados, no Hospital das Clínicas da UFMG, destes 43 eram portadores de cardiopatia chagásica, dos quais 20 já desenvolveram reativação da infecção em diferentes tempos, variando de um mês até anos, após o transplante.

Quarenta e dois pacientes transplantados foram avaliados neste estudo, todos procedentes de Minas Gerais. Nove destes pacientes eram do sexo feminino e 33 pacientes do sexo masculino. Já foi reportado que o sexo masculino é um preditor independente de progressão da Chagas cardiomiopatia (Basquiera et al., 2003). A média de idade entre os pacientes na data do transplante foi de 47 anos (DP=10,37; intervalo de 27-61 anos), a faixa etária mais prevalente foi de 50 a 59 anos (16 pacientes). Quatorze pacientes eram pardos, 12 brancos e seis pretos. Os demais pacientes não apresentavam o dado da cor de pele em seu prontuário.

Seis pacientes transplantados faleceram no período do estudo. Alguns vieram a óbito um dia após o transplante por choque hemorrágico ou falência aguda do enxerto. Mas nenhum deles faleceu em decorrência de reativação ou complicações associadas à Doença de Chagas. Atualmente, a mortalidade associada com reativação da infecção por *T. cruzi* é baixa ~0,7% (Bocchi and Fiorelli, 2001b).

Dados recentes indicaram que as morbidades pós-transplante têm incidência semelhante entre pacientes chagásicos transplantados cardíacos e não-chagásicos. A probabilidade de sobrevivência para os transplantados chagásicos em 1 ano, 2, 6 e 10 anos de acompanhamento foi de 83%, 76%, 62%, e 46%, respectivamente. Tal resultado é melhor do que o observado em pacientes não-chagásicos (Bocchi and Fiorelli, 2001b).

4.4.2. Diagnóstico molecular de *T. cruzi*

Neste trabalho utilizamos duas estratégias de diagnóstico molecular para detectar a presença do parasito em diferentes tecidos de pacientes com cardiopatia chagásica submetidos a transplante no HC da UFMG. A primeira delas constituiu da amplificação do fragmento de 330 pb da região hipervariável do minicírculo de kDNA e real time PCR rDNA 24S α de *T. cruzi*.

Para a reação de PCR convencional do kDNA uma amostra foi considerada positiva quando apresenta a banda de ~330 pb (Figura 4.2). Mesmo nos casos em que houve amplificação fraca do DNA do parasito, o resultado foi considerado positivo.

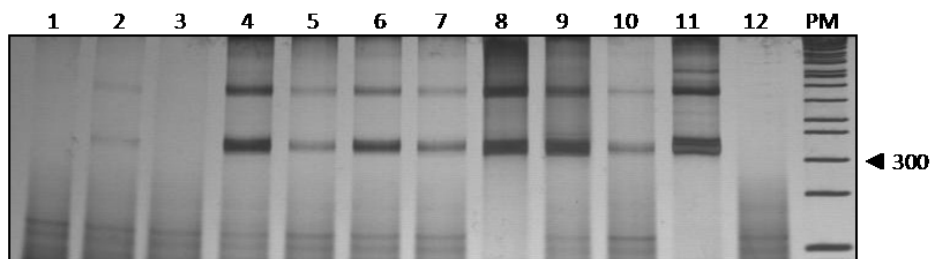


Figura 4.2: Resultados representativos da amplificação do fragmento de 330 pb da região hipervariável do minicírculo de kDNA de *T. cruzi* diretamente dos tecidos dos pacientes. **1)** Controle negativo: DNA extraído de sangue humano soronegativo para doença de Chagas; **2)** Paciente 13 (sangue pós-transplante); **3)** Paciente 17 (sangue pós-transplante); **4 – 8)** Amostras paciente 8 (átrio direito, átrio esquerdo, ventrículo direito, ventrículo esquerdo, pele, respectivamente); **9)** Paciente 4 (átrio esquerdo); **10)** Paciente 12 (ventrículo esquerdo); **11)** CL Brener (controle positivo); **12)** Branco: mix da reação sem DNA; **PM)** Padrão de peso molecular (1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®).

Já para a técnica de *real time* PCR foram consideradas como positivas as amostras que apresentam T_M ~ 76-81°C na curva de dissociação. Por se tratar de uma técnica muito sensível e, além disso, nesta reação utilizamos a estratégia *hemi nested* para aumentar a chance de detectar DNA de *T. cruzi* diretamente das amostras biológicas, muitas amostras apresentam picos sugestivos de amplificação. No entanto, foram consideradas negativas aquelas amostras em que houve amplificação, mas que a curva de amplificação foi equiparada à dos controles negativos ou dos brancos da reação, ou que o T_M não foi compatível com as temperaturas esperadas (Figura 4.3).

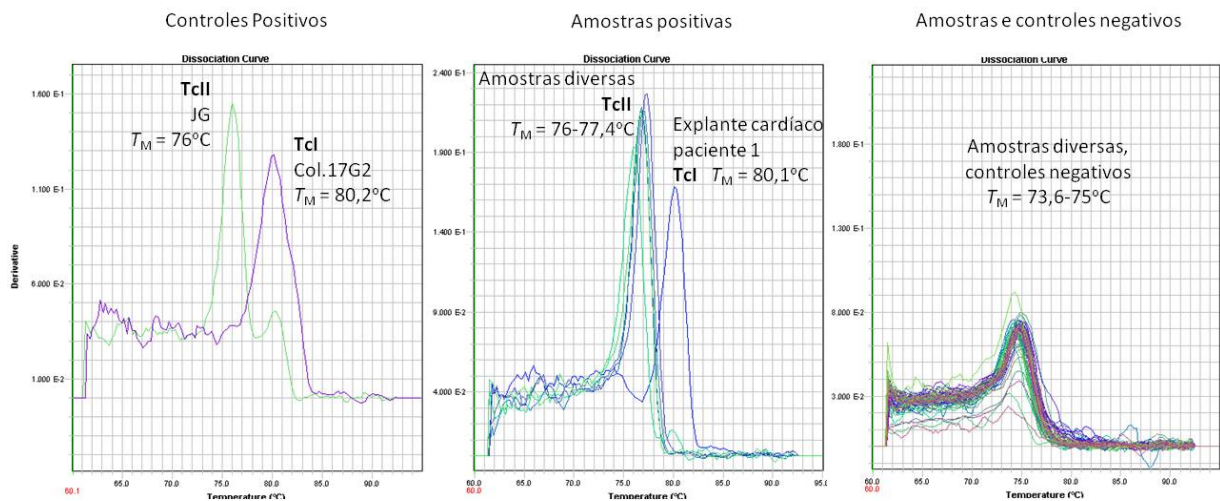


Figura 4.3: Resultados representativos das curvas de dissociação obtidas por PCR em tempo real do gene rDNA 24S α diretamente dos tecidos dos pacientes.

Diferentes tecidos dos 42 pacientes transplantados foram avaliados, totalizando 430 amostras coletadas entre tecidos cardíacos explantados, sangue, pele e biópsias endomiocárdicas. Desses, 29 pacientes apresentaram ao menos um resultado positivo nas reações utilizadas para o diagnóstico molecular de *T. cruzi* e ao todo 120 amostras foram positivas. Resultados representativos das técnicas utilizadas para diagnóstico molecular de *T. cruzi* estão apresentados nas Figuras 4.2 e 4.3.

Todas as amostras utilizadas como controle negativo foram negativas para duas PCRs. Das 120 amostras positivas, 66 foram positivas para ambos os métodos, 35 amostras foram positivas exclusivamente pela reação de PCR do kDNA e 19 amostras foram detectadas como positivas apenas quando avaliadas pelo método *real time* do rDNA 24S α (Tabela 4.4). As 310 amostras restantes foram negativas por ambas as metodologias. A diferença nos resultados das duas técnicas de PCR foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$), embora a concordância entre os testes tenha sido boa ($Kappa = 0,63$).

Tabela 4.4: Positividade de acordo com o método diagnóstico empregado.

	rDNA real time	
kDNA PCR	Nº de positivos	Nº de negativos
Nº de positivos	66	35
Nº de negativos	19	310

* $P < 0.05$ (Teste de Fisher e Qui-quadrado); Kappa = 0,63.

Para realização do diagnóstico molecular de *T. cruzi* os corações explantados foram divididos por regiões: átrios, ventrículos, septo intraventricular e ponta de ventrículo esquerdo. Durante o período do estudo um dos pacientes foi submetido a troca de marca-passo e teve também um biópsia de tecido adiposo subcutâneo coletado para análise.

Quando analisamos a frequência de positividade por região do coração explantado observamos 13 casos positivos dos 36 átrios direitos avaliados; 13/35 átrios esquerdos; 11/35 ventrículos direitos; 9/37 ventrículos esquerdos; 6/29 pontas de ventrículo esquerdo; 10/33 septos interventriculares (Tabela 4.5). A porcentagem da positividade das regiões cardíacas variou de 21 a 37%, mas estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Tabela 4.5: Número de amostras positivas para o diagnóstico molecular de *T. cruzi* e porcentagem de positividade de acordo com a região cardíaca coletada.

Região Cardíaca	Número de casos avaliados	Número de casos positivos	Percentual de positivos
Átrio direito	36	13	36%
Átrio esquerdo	35	13	37%
Ventrículo direito	35	11	31%
Ventrículo esquerdo	37	9	24%
Septo Interventricular	33	10	30%
Ponta do ventrículo esquerdo	29	6	21%
Tecido adiposo subcutâneo	1	1	-

Surpreendentemente, o DNA de *T. cruzi* foi detectado no tecido adiposo subcutâneo de um dos pacientes submetido a troca de marcapasso. Este achado representou o primeiro relato da persistência de *T. cruzi* no tecido adiposo humano (**PUBLICAÇÃO 4**). Além deste caso, nós identificamos o DNA do parasito no tecido adiposo subcutâneo de outros 2 pacientes em um universo de 10 pacientes chagásicos crônicos que foram submetidos a troca de marca-passo. A confirmação experimental da capacidade do *T. cruzi* infectar adipócitos foi realizada em adipócitos primários isolados do tecido adiposo epididimal de camundongos BALB/c por imunofluorescência. Em conjunto, esses achados indicam o adipócito como um importante alvo para a infecção pelo *T. cruzi* e reforçam a hipótese de que o tecido adiposo possa ser um importante reservatório do parasito em pacientes chagásicos crônicos, cuja infecção pode recrudescer (Combs et al., 2005; Desruisseaux et al., 2007).

Sempre que foi possível o sangue dos pacientes transplantados também foi coletado para monitoramento e analisado para a presença de *T. cruzi*. Das 14 amostras de sangue coletadas após o transplante, sete apresentaram reações de PCR positivas: três amostras positivas para ambos os testes (kDNA e rDNA); duas positivas apenas pelo kDNA e duas positivas pelo rDNA. Já os sangues coletados antes do transplante (sete amostras), todas se apresentaram negativas aos métodos moleculares empregados. Esse achado é compatível com a baixa parasitemia detectada no sangue dos pacientes na fase crônica da infecção e com a elevação da parasitemia que pode ocorrer devido a imunossupressão induzida nos pacientes para o transplante (Rassi et al., 1992).

Para dois pacientes, apenas o sangue para PCR foi coletado. Para os outros 19 pacientes o volume de sangue coletado também foi suficiente para realização da hemocultura. Os resultados entre as PCRs e hemocultura foram moderadamente concordantes ($Kappa = 0,46$; $P = 0,056$). Houve 4 casos em que a hemocultura foi positiva e as PCRs foram negativas, sendo que dois deles foram coletas realizadas antes do transplante e dois outros casos de coletas após o transplante.

O volume de sangue coletado para PCR é de 5 mL enquanto que para hemocultura o volume coletado é de 30 mL. O maior volume de sangue de um paciente com baixíssima carga parasitária poderia ter contribuído para o resultado positivo na hemocultura, que promove o crescimento dos parasitos mas, em geral, demora muito tempo para positividade (2 a 4 meses).

Desde as últimas décadas, a aplicação da PCR para detecção de *T. cruzi* diretamente em amostras biológicas, especialmente sangue abriu novas possibilidades para o diagnóstico da infecção. Principalmente porque procedimentos parasitológicos tradicionais, tais como xenodiagnóstico e hemocultura são trabalhosos, demorados e apresentam baixa sensibilidade em casos de parasitemias de nível baixo, como nos pacientes em fase crônica (Gomes et al., 2009; Portela-Lindoso and Shikanai-Yasuda, 2003).

Os procedimentos de PCR têm revelado níveis altamente variáveis de sensibilidade e especificidade, dependendo de uma série de fatores técnicos, tais como, o volume/tamanho da amostra coletada, as condições de conservação da amostra, os métodos utilizados para isolar o DNA, as sequências do parasito e iniciadores selecionados, os reagentes utilizados, bem como as condições dos ciclos de amplificação. Recentemente, Schijman e cols. (2011) realizaram um estudo multicêntrico internacional para avaliar o desempenho de vários métodos de extração, marcadores e protocolos de amplificação empregados por 26 laboratórios para detectar DNA de *T. cruzi* em amostras de sangue de pacientes chagásicos. Quatro dos 48 testes avaliados foram considerados como os de melhor desempenho, entre eles o protocolo da PCR kDNA que nós utilizamos no presente trabalho (iniciadores 121 e 122 e extração de DNA por fenol/clorofórmio) que no estudo apresentou limite de detecção de 0,5 parasitos/mL de sangue, sensibilidade 75%, especificidade 100% e acurácia 87,5%.

Além das amostras cardíacas e sangue, nos casos de reativação com lesão de pele, este tecido também foi coletado para detecção do parasito. Cinco dentre as sete biópsias de pele avaliadas, coletadas de pacientes distintos, apresentaram resultados positivos pelos métodos propostos. A alta positividade encontrada deve-se ao fato deste tipo de amostra ser normalmente rico em parasitos em consequência da reativação da doença (Uip et al., 1987). As duas amostras que apresentaram resultados negativos foram extraídas de blocos de parafina. Contudo, antes de ser emblocadas estas amostras são fixadas em formaldeído que causa cross-links no DNA, o que pode ter dificultado a amplificação por PCR (Schander and Halanych, 2003).

4.4.3. Caracterização das subpopulações de *T. cruzi*

4.4.3.1. Determinação das linhagens de *T. cruzi*

Para genotipar as linhagens de *T. cruzi* como uma das seis linhagens principais diretamente nas amostras dos pacientes nós utilizamos um ensaio triplo inicialmente utilizado por D'Ávila e cols. (2009). As 120 amostras positivas nas PCRs de diagnóstico foram submetidas ao ensaio, 90 delas puderam ser amplificadas pelas consecutivas reações de tipagem permitindo a identificação, ainda que parcial da linhagem do *T. cruzi* envolvida (Tabela 4.6).

Tabela 4.6: Identificação de DTUs de *T. cruzi* em sangue e amostras de tecidos humanos.

DTUs	Nº de amostras	Tipo de amostra
TcI	3	Explante cardíaco
TcII	57	Explante cardíaco, biópsia endomiocárdica, sangue e pele.
TcVI	1	Biópsia endomiocárdica
TcII ou VI*	27	Explante cardíaco, biópsia endomiocárdica e sangue.
TcV ou VI*	1	Explante cardíaco
TcII + TcVI	1	Tecido adiposo subcutâneo
Não determinado	30	-
Total	120	

*Os DTUs não puderam ser completamente identificados por não terem amplificado os três marcadores utilizados.

Os perfis de RFLP obtidos dos fragmentos amplificados para o gene COII, já nos permitiram verificar que a maior parte das amostras apresentam o haplótipo mitocondrial C, característico da DTU TcII (Figura 4.4 / Tabela 4.6). Ao todo 57 amostras (47,5%) foram genotipadas como TcII, sendo amostras de diferentes tipos: explante cardíaco, biópsia endomiocárdica, sangue e pele.

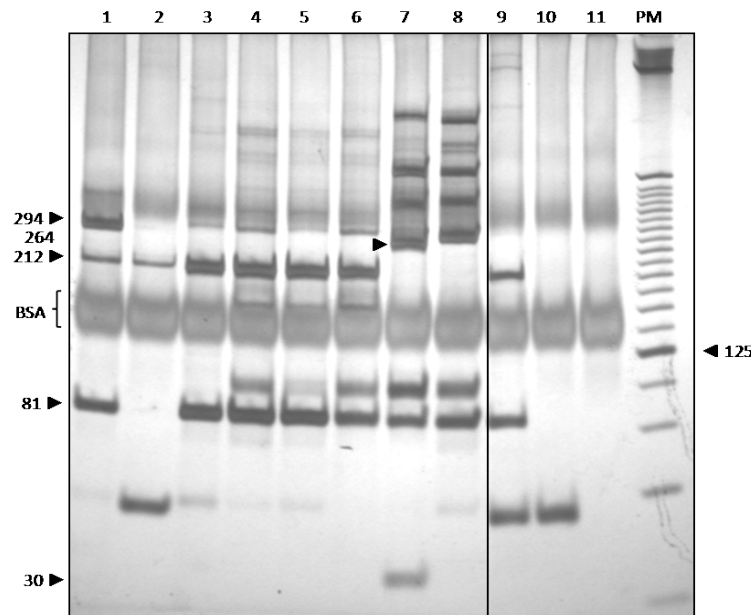


Figura 4.4: Padrões típicos de RFLP gerados a partir de produtos amplificados do gene mitocondrial COII diretamente dos tecidos dos pacientes depois da digestão com *AclI* em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. **1 - 2)** tecido adiposo subcutâneo e ventrículo esquerdo do paciente 17; **3)** Átrio esquerdo do paciente 4; **4 - 6)** biópsia endomiocárdica, sangue pós-transplante e pele do paciente 3, respectivamente. **7 - 9)** controles de amplificação usando DNA de cepas e clones de *T. cruzi* representativos dos 3 padrões de RFLP para este gene: clone Col.17G2 (30, 81, 264 pb - haplótipo mitocondrial A), clone CL Brener (81 e 294pb - haplótipo mitocondrial B) e cepa JG (81 e 212 pb - haplótipo mitocondrial C); **10 -11)** Branco das 1ª e 2ª etapas de PCR; **PM)** padrão de peso molecular - 25 pb DNA Ladder (Invitrogen®).

Mesmo após a reação de PCR-RFLP do gene COII ter permitido a identificação das 57 amostras como *TcII*, estas também foram submetidas às subsequentes reações do esquema de tipagem. As amplificações resultaram em fragmentos de 150 e 125 pb para miniexon e rDNA 24 S α , respectivamente, confirmando os padrões esperados (Figura 4.4 e 4.5).

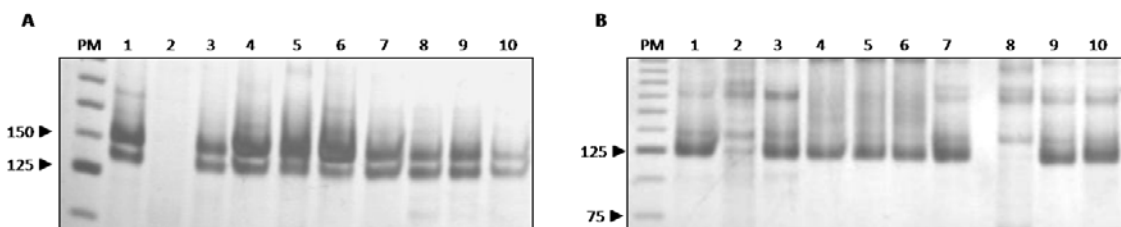


Figura 4.5: Amplificação do espaçador intergênico dos genes miniexon **(A)** e do gene rDNA24S α **(B)** de *T. cruzi* diretamente dos tecidos dos pacientes. **PM)** Padrão de peso molecular – 25 pb DNA Ladder - Invitrogen®; **1 - 2)** tecido adiposo subcutâneo e ventrículo esquerdo do paciente 17; **3)** átrio esquerdo do paciente 4; **4 - 6)** biópsia endomiocárdica, sangue pós-transplante e pele do paciente 3, respectivamente; **7 - 10)** átrio direito, átrio esquerdo, ventrículo direito, ventrículo esquerdo do paciente 8, respectivamente.

Para outras 27 amostras foi feita a identificação parcial de TcII ou TcVI. Nesses casos houve falha na amplificação das primeiras etapas da genotipagem e apenas a tipagem do rDNA por *real time* foi bem sucedida. Como TcII e TcVI apresentam o mesmo perfil para este gene o resultado não foi conclusivo. Em um dos casos foi detectada a presença de TcV ou TcVI, visto que o perfil da reação de rDNA não foi determinado. No coração explantado de um dos pacientes detectamos a presença de TcV ou TcVI, visto que o perfil da reação de rDNA não foi determinado. O resumo dos resultados de genotipagem encontra-se na Tabela 4.6.

Estes resultados reforçam a idéia atual de que o TcII é a linhagem principal associada à doença de Chagas cardíaca e à reativação, pelo menos em Minas Gerais. TcII é o principal agente da doença de Chagas na região do Cone Sul da América Latina. Esta linhagem é muito associada aos casos graves da doença de Chagas na América do Sul, especialmente no Brasil central e sul, onde as formas cardíacas, megaesôfago e megacólon foram quase exclusivamente genotipadas como TcII (Freitas et al., 2005; Lages-Silva et al., 2006; Yeo et al., 2005). Há algum tempo as linhagens TcV e TcVI também têm sido apontadas como envolvidas em casos de infecções humanas na região do Gran Chaco e países vizinhos, incluindo, Bolívia, Chile, nordeste da Argentina e sudeste do Brasil (Cardinal et al., 2008; Diosque et al., 2003; Virreira et al., 2006b). Entretanto, pela semelhança genética das DTUs TcII, V e VI, por limitações dos métodos de tipagem, e/ou por confusão da nomenclatura na literatura entre 1999 e 2009, TcII continua sendo a linhagem mais frequentemente associada como agente dos casos cardíacos nestas regiões (Burgos et al., 2005; Campbell et al., 2004; Lewis et al., 2009a).

Todavia, alguns achados foram bastante intrigantes. Ao analisarmos o perfil do tecido adiposo subcutâneo do paciente 17, além do padrão característico de bandas para TcII (81/82 + 212 pb), ficou evidente a presença de um fragmento extra de 294 pb (haplótipo mitocondrial B), característico de populações de TcIII-VI, sugerindo a mistura de diferentes populações nesta amostra (Figura 4.4). As etapas seguintes da nossa estratégia de genotipagem para esta amostra resultaram em amplicons de 150 e 125 pb para miniexon e rDNA 24 S α , respectivamente (Figura 4.5A e B). Em conjunto estes resultados confirmaram a ocorrência de uma infecção mista neste paciente, constituída das DTUs TcII e TcVI.

Outro achado extraordinário foi a identificação de TcI em três amostras provenientes dos corações explantados de dois pacientes (1 e 6) (Tabela 4.6). As amostras foram extraídas de blocos de parafina e abrangiam as seguintes regiões cardíacas: paciente 1 - junção

atrioventricular + ventrículo esquerdo (bloco 1); ponta do ventrículo esquerdo + septo interventricular (bloco 2); paciente 6 - septo interventricular (bloco único).

Estes resultados foram curiosos visto que parasitas da linhagem TcI predominam no ciclo silvestre da Amazônia brasileira, onde a doença de Chagas tem sido considerada como uma doença emergente (Coura et al., 2002). Nesta região vários microepidemias já foram descritas, provavelmente causadas por contaminação oral, resultando em desenvolvimento de formas clínicas agudas graves para alguns indivíduos, e até mesmo casos fatais da doença (Pinto et al., 2004). Entretanto, casos de TcI identificados diretamente em tecidos de pacientes com as formas graves da doença de Chagas não é um achado comum no Brasil. Até então, neste país, apenas um caso de infecção por TcI havia sido relatado por Teixeira e cols (2006b). Neste caso o TcI foi identificado por RAPD e PCR do gene rDNA (Anez et al., 2004) em biópsia endomiocárdica de um paciente chagásico em estágio final da insuficiência cardíaca. O paciente, de 50 anos de idade, nasceu e viveu numa pequena aldeia rural do Estado da Paraíba, nordeste do Brasil. Esta aldeia fica a apenas 40 km da vila de Catolé da Rocha, onde ocorreu um episódio de transmissão de *T. cruzi* por via oral em que 26 pacientes apresentaram manifestações clínicas de doença de Chagas aguda, incluindo uma morte (Shikanai-Yasuda et al., 1991).

A detecção da linhagem TcI em amostras clínicas obtidas de pacientes com doença de Chagas cardíaca na Argentina, Colômbia e Venezuela é também um achado relativamente recente e indica que a distribuição geográfica e infecção por esta linhagem são mais complexas do que até então demonstrado (Burgos et al., 2010a; Mantilla et al., 2010; Zafra et al., 2011). Burgos e cols fizeram a primeira descrição do diagnóstico de TcI diretamente em tecidos de pacientes transplantados cardíacos na Argentina. Dos 16 pacientes avaliados, sete estavam infectados com esta linhagem (43,75%); sendo que para quatro deles TcI foi a única linhagem detectada, e em três deles, houve infecção mista com as linhagens TcII + TcV ou VI (Burgos et al., 2010a).

Outro resultado interessante foi a detecção de infecção por TcVI na biópsia endomiocárdica do mesmo paciente em que foi encontrado TcI no coração explantado. Mais uma vez sendo demonstrando a variabilidade de *T. cruzi*, populações distintas em infectando um mesmo hospedeiro.

Trinta das 120 amostras positivas nas PCRs diagnósticas não puderam ser genotipadas. Isso pode ser devido ao fato de que um dos alvos do PCR diagnóstico, os minicírculos do kDNA, estão presentes em múltiplas cópias, de 5.000 a 20.000, em cada célula do parasito. Enquanto os genes alvo de amplificação para a tipagem como o COII e o rDNA estão presentes nos maxicírculos, cujo número de cópias por célula varia de 20 a 50 (Simpson, 1987). Consequentemente, diminuindo a sensibilidade da reação de PCR que utiliza os respectivos genes como molde. Como estes marcadores são necessários para a identificação correta dos DTUs, é relativamente frequente termos amostras onde o *T. cruzi* é detectado, mas não pode ser caracterizado.

A busca por marcadores e técnicas alternativas e mais sensíveis de caracterização molecular poderia contribuir para a melhor compreensão da epidemiologia molecular das linhagens de *T. cruzi* associados aos casos clínicos.

4.4.3.2. Determinação da diversidade por LSSP-PCR

Uma estratégia alternativa para a caracterização da diversidade genética das populações de *T. cruzi* presentes nos tecidos dos pacientes é a LSSP-PCR. A técnica foi utilizada pela primeira vez para este propósito por Vago e cols. (1996).

Desde então, vários autores utilizaram a LSSP-PCR com este intuito, mas observa-se que diferentes sequências de iniciadores foram utilizadas, apesar de algumas vezes a referência citada e o nome do iniciador ter sido o mesmo.

Com o objetivo de avaliar o impacto da sequência do iniciador sobre os perfis obtidos por LSSP-PCR, nós fizemos um levantamento na literatura para listar as sequências dos iniciadores e as referências citadas por vários grupos de pesquisa relacionados a análises de kDNA de *T. cruzi* por LSSP-PCR. Nós comparamos a impressão digital do kDNA de três cepas de referência de *T. cruzi* obtidos por LSSP-PCR usando oito iniciadores diferentes, embora publicados com nomes semelhantes. Os resultados confirmaram a reprodutibilidade da técnica LSSP-PCR e mostram claramente que mesmo pequenas modificações na sequência de oligonucleotídeos podem alterar significativamente a assinatura de kDNA de uma cepa (**PUBLICAÇÃO 5**).

4.4.3.2.1. Aplicação do LSSP-PCR para estudo da variabilidade de *T. cruzi* presente nos tecidos dos pacientes

A LSSP-PCR foi utilizada para caracterização das subpopulações de *T. cruzi* presentes nos tecidos dos pacientes transplantados. Especificamente para comparar o perfil genético dos parasitos isolados antes e após o transplante, em casos de reativação da doença, para avaliar se haveria ocorrência de subpopulações de *T. cruzi* mais associadas à reativação da doença de Chagas. E ainda, para verificar a ocorrência de subpopulações distintas de *T. cruzi* em diferentes áreas cardíacas de um mesmo paciente.

A Figura 4.6 representa perfis de LSSP-PCR obtidos a partir de diferentes amostras de três pacientes estudados. Como podem ser observados, os perfis obtidos variam de acordo com a cepa infectante, sendo diferentes quando comparados entre os pacientes.

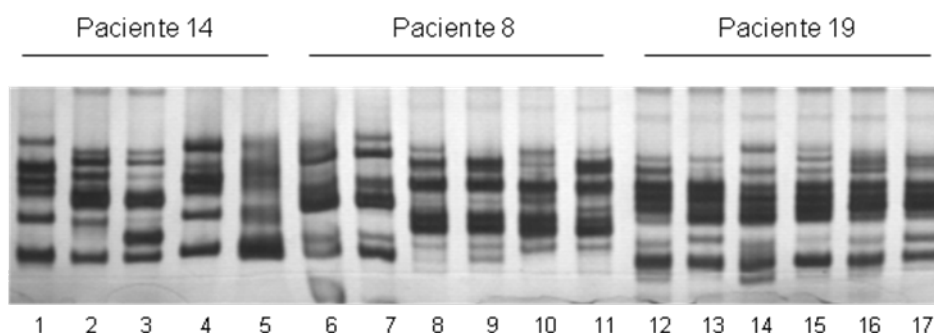


Figura 4.6: Perfis típicos de LSSP-PCR obtidos para os DNAs de *T. cruzi* presente em diferentes regiões cardíacas e tecidos de três pacientes. **Paciente 14** : 1) Ponta do ventrículo esquerdo, 2) septo interventricular, 3) biópsia endomiocárdica, 4 e 5) réplicas de hemocultura; **Paciente 8**: 6 e 7) réplicas de biópsia endomiocárdica coletada 2m pós HTx, 8 e 9) réplicas de biópsia endomiocárdica coletada na reativação, 10 e 11) réplicas de biópsia endomiocárdica coletada 1m pós reativação; **Paciente 19**: 12 e 13) réplicas átrio direito, 14 e 15) réplicas átrio esquerdo, 16 e 17) réplicas ventrículo direito.

Fazendo a comparação dos perfis obtidos de diferentes tecidos provenientes de um mesmo paciente, o cenário muda. Para a maioria dos pacientes, os tecidos avaliados apresentaram parasitos com perfis idênticos ou muito semelhantes, como demonstrado nas Figuras 4.6 e 4.7 para os pacientes 19 e 3, respectivamente. No entanto, resultados muito interessantes foram observados para outros pacientes em que os parasitos de diferentes tecidos apresentaram perfis distintos, como demonstrados para os pacientes 12 e 16 (Figura 4.7).

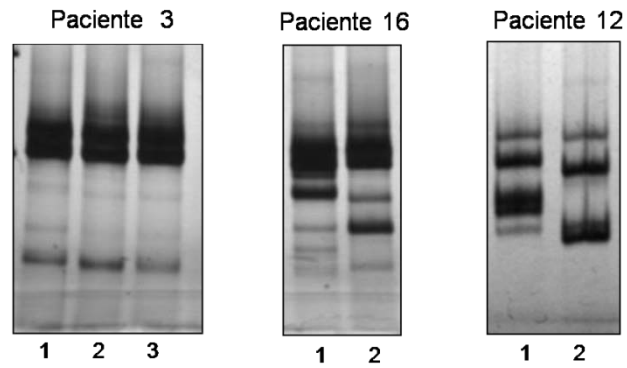


Figura 4.7: Diferenças nos perfis LSP-PCR obtidos para o DNA de *T. cruzi* presente nos tecidos de diferentes pacientes. **Paciente 3:** 1) septo interventricular, 2) pele, 3) biópsia endomiocárdica; **Paciente 16:** 1) sangue pós-transplante, 2) pele; **Paciente 12:** 1) ventrículo esquerdo, 2) biópsia endomiocárdica.

As amostras do paciente 12 foram coletadas em momentos distintos da infecção. Uma delas, ventrículo esquerdo, representa o coração doente explantado e a outra a biópsia endomiocárdica realizada durante o seguimento do paciente após o transplante, demonstrando, neste caso, que os perfis dos parasitos antes e após o transplante são diferentes. Já as amostras do paciente 16, sangue e pele, foram coletadas após o transplante quando foi diagnosticada reativação da doença. O polimorfismo nas assinaturas de kDNA foi detectado até mesmo em secções diferentes de um mesmo explante (paciente 14; ponta do ventrículo esquerdo e septo intraventricular), denotando a presença de mais de um clone de *T. cruzi* infectando simultaneamente um mesmo paciente, porém com histotropismos variados. Mais ainda, todos os *T. cruzi* aqui representados foram genotipados como TcII, sendo assim estes resultados também evidenciam a variabilidade intra DTU.

Sabe-se que maioria das cepas naturais de *T. cruzi* é multiclonal. No ambiente silvestre existe uma ampla diversidade de insetos vetores e animais reservatórios. Assim, o mesmo hospedeiro pode ser simultaneamente infectado por diferentes cepas devido à exposição frequente aos insetos vetores e à composição heterogênea das populações de *T. cruzi*. Além disso, diferentes clones de uma cepa podem apresentar tropismo por diferentes tecidos. Este cenário constitui o que chamamos de modelo histotrópico clonal (Macedo and Pena, 1998). O trabalho de Vago *et al.*, (1996a) demonstrou pela primeira vez que cepas diferentes em um modelo animal têm tropismos diferentes. Nossos achados para os pacientes cardíacos transplantados reforçam essa teoria.

Outra hipótese que explica os resultados encontrados para estes pacientes é a de que alguns tecidos podem funcionar como reservatórios de clones de *T. cruzi*. E algumas situações, como é o caso da imunossupressão necessária para o transplante, poderia contribuir para reativar o *T. cruzi* latente, mostrando que este persiste no organismo e ressurge, especialmente, na pele e no coração transplantado (Uip et al., 1987), podendo inclusive ser constituído de um clone distinto daquele presente majoritariamente no coração explantado do paciente.

4.5. Publicações relacionadas ao capítulo

4.5.1. PUBLICAÇÃO 4

Ferreira AV, **Segatto M**, Menezes Z, Macedo AM, Gelape C, de Oliveira Andrade L, Nagajyothi F, Scherer PE, Teixeira MM, Tanowitz HB (2011). Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect.* Nov; 13(12-13):1002-5.

4.5.2. PUBLICAÇÃO 5

Segatto M, Rodrigues CM, Machado CR, Franco GR, Pena SDJ, Macedo AM (2013). LSSP-PCR of *Trypanosoma cruzi*: how the single primer sequence affects the kDNA signature. Artigo em revisão na BMC Research Notes ID=1141339876880376.



INSTITUT PASTEUR

Microbes and Infection xx (2011) 1–4



www.elsevier.com/locate/micinf

Short communication

Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease

Adaliene Versiani Matos Ferreira^{a,b}, Marcela Segatto^c, Zélia Menezes^b, Andréa Mara Macedo^c, Cláudio Gelape^d, Luciana de Oliveira Andrade^e, Fnu Nagajyothi^f, Philipp E. Scherer^{g,h,i}, Mauro Martins Teixeira^{b,c,j}, Herbert B. Tanowitz^{f,j,*}

^aDepartment of Basic Nursing, Nursing School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

^bImmunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

^cDepartment of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

^dDepartment of Surgery, Medicine School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

^eDepartment of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

^fDepartment of Pathology, Division of Parasitology, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Ave., Bronx, NY 10461, USA

^gDepartment of Internal Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA

^hDepartment of Cell Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA

ⁱThe Touchstone Diabetes Center, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA

^jDepartment of Medicine, Division of Infectious Disease, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA,

Received 9 May 2011; accepted 8 June 2011

Abstract

Trypanosoma cruzi the cause of Chagas disease persists in tissues of infected experimental animals and humans. Here we demonstrate the persistence of the parasite in adipose tissue from three of 10 elderly seropositive patients with chronic chagasic heart disease. Nine control patients had no parasites in the fat. We also demonstrate that *T. cruzi* parasitizes primary adipocytes *in vitro*. Thus, in humans as in mice the parasite may persist in adipose tissue for decades and become a reservoir of infection.

© 2011 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; Adipose tissue; Adipocyte

1. Introduction

Chagas disease caused by infection with *Trypanosoma cruzi* is an important cause of heart disease in endemic areas of Latin America [1]. It is being recognized with increasing frequency among persons emigrating from endemic regions to non-endemic regions of North America, Europe, Australia and Japan [2]. Chagas disease may also undergo reactivation

during periods of immunosuppression such as during the administration of immunosuppressive therapy or HIV/AIDS [3,4]. Parasites have been demonstrated to persist in heart tissue of the mammalian host [5].

Shoemaker et al. [6,7], and Andrade and Silva [8] demonstrated that *T. cruzi* parasitized adipose tissues and specifically the adipocyte in mice. Buckner et al. [9] also demonstrated parasites in adipose tissue of mice employing a transfected strain of *T. cruzi* strain expressing *Escherichia coli* β -galactosidase which makes the parasite visible when stained with X-Gal. Our laboratory group made similar observations, but also examined the consequences of these observations on the pathogenesis of *T. cruzi* infection in

* Corresponding author. Department of Pathology, Division of Parasitology, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Ave., Bronx, NY 10461, USA. Tel.: +1 718 430 3342; fax: +1 718 430 8543.

E-mail address: herbert.tanowitz@einstein.yu.edu (H.B. Tanowitz).

a mouse model with implications for human disease. For example, we demonstrated that *T. cruzi* may persist in adipose tissue for a year after infection in a mouse model [10] suggesting that adipose tissue and the adipocyte are reservoirs from which the parasite could cause recrudescence of infection especially during immunosuppressive states.

Since we have clearly demonstrated that *T. cruzi* persists in adipose tissue in a mouse model we investigated whether the same was true in infected humans. Here we demonstrate that human adipose tissue is also a reservoir for this parasite. To our knowledge, this represents the first report of the persistence of *T. cruzi* in human adipose tissue.

2. Materials and methods

2.1. Studies on human adipose tissue

Patients presented to the Cardiology Service of the Clinical Hospital of the Federal University of Minas Gerais, Brazil for pacemaker placement. The patients presented with a variety of conduction abnormalities requiring pacemaker placement. Ten patients tested positive on two serological tests for Chagas disease and composed the infected group (see Table 1). An additional nine serologically negative patients comprised the control group. Discarded subcutaneous adipose tissue was obtained from patients in both groups and subjected to PCR analysis.

We performed PCR amplification of ~330 bp fragment derived from the variable regions of minicircle kinetoplast DNA (kDNA), as previously described [11]. PCR-positive tissues were further genotyped to identify *T. cruzi* discrete taxonomic units (DTUs) I to VI. To achieve this, a triple step assay [12] associated to a nested PCR protocol was applied in order to improve *T. cruzi* genotyping directly in infected tissues. Initially we used a PCR-RFLP of the cytochrome oxidase subunit II gene (*COII*), which allows the discrimination of *T. cruzi* I (haplotypes A) and *T. cruzi* II (haplotype C) from the others *T. cruzi* III–VI (haplotype B) [13]. *T. cruzi* populations belonging to *T. cruzi* I: Col1.7G2 clone (mitochondrial haplotype A - 30, 81 and 264bp); *T. cruzi* II: JG (mitochondrial haplotype C - 81, 82 and 212 bp); and *T. cruzi* VI: CL Brener clone (haplotype B - 81 and 294 bp) were used as RFLP-COII standard patterns. A second step, consisting of amplification of the intergenic region of spliced-leader genes (SL-IR), was then applied to the mitochondrial haplotypes B strains resulting in two distinct clusters, one formed by *T. cruzi* III–IV (amplicons of 150 bp) and another by *T. cruzi* V–VI (amplicons of 200 bp) [14]. The final step consisted of rDNA

24S α PCR that allowed the differentiation of *T. cruzi* III (110 bp), *T. cruzi* IV (~119 bp), *T. cruzi* V (110 and 125 bp) and *T. cruzi* VI (125 bp) [15]. The adipose tissue samples were thoroughly washed in PBS. These studies were approved by the Institutional Review Boards of the Federal University of Minas Gerais, Brazil and the Albert Einstein College of Medicine, New York, USA.

2.2. In vitro studies

Primary adipocytes were isolated under sterile condition from epididymal white adipose tissue of Balb/c mice as previously described [16]. Subsequently, they were maintained in primary culture and incubated with trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* for 4 h at a multiplicity of infection of 25:1. The adipocytes were washed in PBS and incubated for an additional 12 h in DMEM containing 5 mmol/L glucose, 25 mmol/L HEPES, 2% fetal bovine serum, 20 U/mL penicillin, 20 mg/mL streptomycin, and 1% BSA fresh medium. Presence of extracellular parasites was evaluated using an inside/outside immunofluorescence assay as described previously [17]. Briefly, cell suspension was incubated with anti-*T. cruzi* polyclonal antibody, washed and incubated with secondary antibody (goat anti-rabbit) labeled with red-fluorescent Alexa Fluor 546 (Invitrogen). Adipocyte and parasite DNA were stained for 1 min with blue-fluorescent DAPI (Sigma–Aldrich, St Louis, MO). Adipocytes were placed in slide and examined on a Zeiss Axioplan microscope equipped with an AxioCam HRC camera controlled by Axiovision Software (Zeiss).

3. Results

3.1. Parasite kDNA detected in adipose tissue

T. cruzi kDNA was detected in the adipose tissue in only 3 of the 10 Chagas patients and in two of these patients the organism was genotyped (Fig. 1). The PCR-RFLP profiles of *COII* genes revealed the presence of *T. cruzi* II in both samples (Fig. 1A). In one patient, in addition to a band pattern characteristic for *T. cruzi* II (81/82 + 212 bp) there was an extra fragment (294 bp) characteristic of *T. cruzi* III–VI populations. The subsequent steps of our genotyping strategy resulted in SL-IR and 24S α rDNA amplicons of 150 and 125 bp, respectively (Fig. 1B and C). Taken together these findings confirm the occurrence of a mixed infection in this patient consisting of *T. cruzi* II and *T. cruzi* VI major lineages. In the three patients whose adipose tissue tested positive for *T. cruzi* by PCR the peripheral blood was negative by PCR.

3.2. Primary adipocytes are infected by *T. cruzi*

Previous studies by our laboratory group demonstrated infection of 3 TC-derived adipocytes *in vitro* by trypomastigotes [18]. Since we could not obtain the primary adipocytes from human subjects we obtained them from mice. Fig. 2 shows amastigotes (white single arrows) located close to the

Table 1
Adipose tissue PCR results.

Patient Groups	Gender	Age (years)	PCR-positive	PCR negative
Control (<i>n</i> = 9)	2M/7F	73.6 ± 6	0	9
Chagas disease (<i>n</i> = 10)	5M/5F	67.3 ± 4.8	3*	7

M- male; F- female; ages are presented as mean age ± SEM.

**P* < 0.05 (by Chi Square and Fischer's Exact Test).

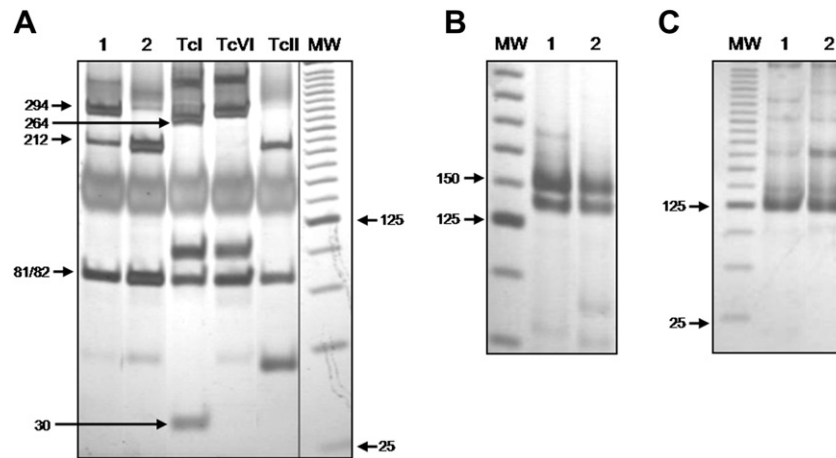


Fig. 1. Genetic characterization of *T. cruzi* in adipose tissue. (A) PCR-RFLP profiles of the mitochondrial *COII* gene revealed on silver stained 6% polyacrylamide gel electrophoresis. Amplicons digestion with *Alu I* generates three RFLP patterns for *T. cruzi* strains: restriction fragments of 264, 81, and 30 bp are classified as *T. cruzi* I (control, Col1.7G2 clone - lane 3), restriction fragments of 294 and 81 bp are classified as *T. cruzi* III-VI (control, CL Brener clone - *T. cruzi* VI - lane 4), and restriction fragments of 212 and 81 bp are classified as *T. cruzi* II (control, JG strain - lane 5); (B) spliced-leader gene (SL-IR) profiles and (C) rDNA 24Sa profiles on silver stained 6% polyacrylamide gel. (1) patient 1; (2) patient 2; (MW) molecular weight: a 25 bp DNA ladder (Invitrogen) is used as gel standard.

nucleus of adipocytes indicating that trypomastigotes are capable of infecting primary adipocytes.

4. Discussion

The adipocyte, once considered to be a static storage compartment for triglycerides is now appreciated to be an active endocrine cell playing a critical role in various metabolic and immune responses [19,20]. The adipocyte is the major component of adipose tissue and contributes to the pathogenesis of diabetes, obesity, the metabolic syndrome and both innate and adoptive immunity [21]. Adipocytes contribute to these functions by influencing systemic lipid homeostasis and also through the production and release of a host of adipocyte-specific and adipocyte-enriched hormonal factors and inflammatory mediators, including adipokines. It is now well-established that *T. cruzi* persists in the tissues of chronically infected mice and that this persistence is important in the pathogenesis of Chagas disease.

The present report confirms what we have observed in the mouse model that the parasite persists in adipose tissue. Three of 10 patients who were seropositive for *T. cruzi* infection and had a cardiomyopathy and conduction defects that required pacemaker placement had evidence of *T. cruzi* as determined by PCR. The adipose tissue obtained from seronegative patients had no evidence of *T. cruzi* by the same test. The adipose tissue obtained was from the anterior chest area. It may be that adipose tissue obtained from visceral fat pads would have had a higher yield. The PCR for *T. cruzi* was positive in three patients. In those patients there was no amplification of *T. cruzi* DNA in the peripheral blood indicating that there was no blood contamination of the tissue sample.

Several groups have demonstrated that *T. cruzi* parasitizes adipose tissue in murine models. We were the first to investigate the consequences of this infection on adipose tissue and on cultured adipocytes [10,18]. In these investigations we demonstrated that when mice were infected adipose tissue was

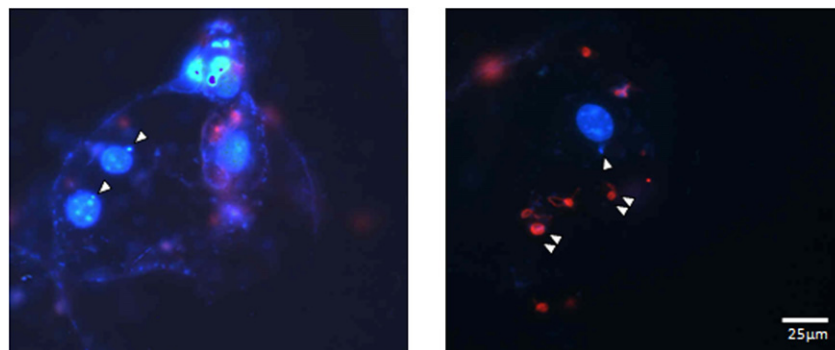


Fig. 2. Immunofluorescence images of primary adipocytes exposed to trypomastigotes. Isolated adipocytes from epididymal white adipose tissue of a Balb/c mouse were infected with trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* and performed immunofluorescence analysis. The single arrows indicate the intracellular parasites (blue) and the double arrows the extracellular parasites (red) as described in Materials and Methods. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

an early target and that the parasite persisted well into the chronic stage as demonstrated by electron microscopy and real-time PCR [10]. Additionally, infection was accompanied by an upregulation of inflammatory mediators including, cytokines and chemokines which began early in infection and persisted [10]. Since adipose tissue is a heterogeneous tissue composed of many cell types we also infected cultured adipocytes derived from fibroblasts and found that there was an upregulation of many inflammatory mediators [18]. In the current report we demonstrate that primary adipocytes can be infected with trypomastigotes of *T. cruzi*.

Recently, it was reported that *Rickettsia prowazekii*, the cause of Brill-Zinsser Disease, the relapsing form of epidemic typhus, resides in adipocytes and adipose tissue and may be a reservoir from which the infection can recrudescence decades later [22]. Similarly, *Mycobacterium tuberculosis* persists without replication within adipocytes and naturally infected humans with latent or active tuberculosis could have the *M. tuberculosis* in the adipose tissue [23]. Interestingly, the malaria parasite has been demonstrated in the vasculature of adipose tissue [24].

The persistence of *T. cruzi* in adipose tissue beyond the acute phase of infection results in a chronic inflammatory state which may influence the development of heart disease and diabetes. As noted adipose tissue may also be a reservoir from which there may be a recrudescence of infection especially during periods of immunosuppression. Additionally, periods of lipotrophy as a result of HIV/AIDS and/or its treatment [25] may result in a release of parasites into the circulation.

Acknowledgments

This work was supported by a pilot grant from the Diabetes Research Center, Albert Einstein College of Medicine, and NIH Grant AI-76248 (HBT) and grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil - MMT) and Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil- MMT).

References

- [1] H.B. Tanowitz, F.S. Machado, L.A. Jelicks, J. Shirani, A.C. de Carvalho, D.C. Spray, S.M. Factor, L.V. Kirchhoff, L.M. Weiss, Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease), *Prog. Cardiovasc. Dis.* 51 (2009) 524–539.
- [2] J. Gascon, C. Bern, M.J. Pinazo, Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries, *Acta Trop.* 115 (2010) 22–27.
- [3] A.M. Sartori, K.Y. Ibrahim, E.V. Nunes Westphalen, L.M. Braz, O.C. Oliveira Jr., E. Gakiya, M.H. Lopes, M.A. Shikanai-Yasuda, Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 101 (2007) 31–50.
- [4] A.I. Fiorelli, R.H. Santos, J.L. Oliveira Jr., D.D. Lourenco-Filho, R.R. Dias, A.S. Oliveira, M.F. da Silva, F.L. Ayoub, F. Bacal, G. E. Souza, E.A. Bocchi, N.A. Stolf, Heart transplantation in 107 cases of Chagas' disease, *Transplan. Proc.* 43 (2011) 220–224.
- [5] L. Zhang, R.L. Tarleton, Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease, *J. Inf. Dis.* 180 (1999) 480–486.
- [6] J.P. Shoemaker, R.V. Hoffman Jr., *Trypanosoma cruzi*: possible stimulatory factor(s) on brown adipose tissue of mice, *Exp. Parasitol.* 35 (1974) 272–274.
- [7] J.P. Shoemaker, R.V. Hoffman Jr., D.G. Huffman, *Trypanosoma cruzi*: preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuén strain, *Exp. Parasitol.* 27 (1970) 403–407.
- [8] Z.A. Andrade, H.R. Silva, Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90 (1995) 521–522.
- [9] F.S. Buckner, A.J. Wilson, W.C. Van Voorhis, Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical stain for beta-galactosidase, *Infect. Immun.* 67 (1999) 403–409.
- [10] T.P. Combs, Nagajyothi S. Mukherjee, C.J. de Almeida, L.A. Jelicks, W. Schubert, Y. Lin, D.S. Jayabalan, D. Zhao, V.L. Braunstein, S. Landskroner-Eiger, A. Cordero, S.M. Factor, L.M. Weiss, M.P. Lisanti, H.B. Tanowitz, P.E. Scherer, The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 24085–24094.
- [11] L.O. Andrade, C.R. Machado, E. Chiari, S.D. Pena, A.M. Macedo, Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice, *Mol. Biochem. Parasitol.* 100 (1999) 163–172.
- [12] D.A. D'Avila, A.M. Macedo, H.M. Valadares, E.D. Gontijo, A.M. de Castro, C.R. Machado, E. Chiari, L.M. Galvao, Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients, *J. Clin. Microbiol.* 47 (2009) 1718–1725.
- [13] J.M. de Freitas, L. Augusto-Pinto, J.R. Pimenta, L. Bastos-Rodrigues, V.F. Goncalves, S.M. Teixeira, E. Chiari, A.C. Junqueira, O. Fernandes, A.M. Macedo, C.R. Machado, S.D. Pena, Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*, *PLoS Pathog.* 2 (2006) e24.
- [14] J.M. Burgos, J. Altcheh, M. Bisio, T. Duffy, H.M. Valadares, M.E. Seidenstein, R. Piccinalli, J.M. Freitas, M.J. Levin, L. Macchi, A.M. Macedo, H. Freilij, A.G. Schijman, Direct molecular profiling of mini-circle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease, *Int. J. Parasitol.* 37 (2007) 1319–1327.
- [15] R.P. Souto, O. Fernandes, A.M. Macedo, D.A. Campbell, B. Zingales, DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 83 (1996) 141–152.
- [16] M. Rodbell, Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 375–380.
- [17] N.W. Andrews, K.S. Hong, E.S. Robbins, V. Nussenzweig, Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*, *Exp. Parasitol.* 64 (1987) 474–484.
- [18] F. Nagajyothi, M.S. Desruisseaux, N. Thiruvur, L.M. Weiss, V.L. Braunstein, C. Albanese, M.M. Teixeira, C.J. de Almeida, M.P. Lisanti, P.E. Scherer, H.B. Tanowitz, *Trypanosoma cruzi* infection of cultured adipocytes results in an inflammatory phenotype, *Obesity* 16 (2008) 1992–1997.
- [19] N. Halberg, I. Wernstedt-Asterholm, P.E. Scherer, The adipocyte as an endocrine cell, *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 37 (2008) 753–768.
- [20] D.A. Kaminski, T.D. Randall, Adaptive immunity and adipose tissue biology, *Trends Immunol.* 31 (2010) 384–390.
- [21] A.D. Attie, P.E. Scherer, Adipocyte metabolism and obesity, *J. Lipid Res.* 50 (Suppl) (2009) S395–S399.
- [22] Y. Bechah, C.D. Paddock, C. Capo, J.L. Mege, D. Raoult, Adipose tissue serves as a reservoir for recrudescence *Rickettsia prowazekii* infection in a mouse model, *PLoS One* 5 (2010) e8547.
- [23] O. Neyrolles, R. Hernandez-Pando, F. Pietri-Rouxel, P. Fornes, L. Tailleux, J.A. Barrios Payan, E. Pivert, Y. Bordat, D. Aguilar, M.C. Prevost, C. Petit, B. Gicquel, Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? *PLoS One* 1 (2006) e43.
- [24] B. Franke-Fayard, J. Fonager, A. Braks, S.M. Khan, C.J. Janse, Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? *PLoS Pathog.* 6 (2010) e1001032.
- [25] A.M. Tershakovec, I. Frank, D. Rader, HIV-related lipodystrophy and related factors, *Atherosclerosis* 174 (2004) 1–10.

LSSP-PCR of *Trypanosoma cruzi*: how the single primer sequence affects the kDNA signature

Marcela Segatto (marcelasegatto@yahoo.com.br)
 Claudiney Melquíades Rodrigues (rodriguescm@gmail.com)
 Carlos Renato Machado (crmachad@icb.ufmg.br)
 Glória Regina Franco (gfranco@icb.ufmg.br)
 Sérgio Danilo Junho Pena (spena@dcc.ufmg.br)
 Andréa Mara Macedo* (andrea@icb.ufmg.br)

Institutional address: Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author

Andréa Mara Macedo
 Laboratório de Genética Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 - Bloco K4, sala 245 - ICB/UFMG
 Bairro São Luiz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
 CEP 31270-901 Tel: +55 31 3409-2628; FAX: +55 31 3409-2984
 Email: andrea@icb.ufmg.br

Abstract

Background: Low-stringency single specific primer PCR (LSSP-PCR) is a highly sensitive and discriminating technique that has been extensively used to genetically characterize *Trypanosoma cruzi* populations in the presence of large amounts of host DNA. To ensure high sensitivity, in most *T. cruzi* studies, the variable regions of the naturally amplified kinetoplast DNA (kDNA) minicircles were targeted, and this method translated the intraspecific polymorphisms of these molecules into specific and reproducible kDNA signatures. Although the LSSP-PCR technique is reproducible under strict assay conditions, the complex banding pattern generated can be significantly altered by even a single-base change in the target DNA. Our survey of the literature identified eight different primers with similar, if not identical, names that have been used for kDNA amplification and LSSP-PCR of *T. cruzi*. Although different primer sequences were used in these studies, many of the authors cited the same reference report to justify their primer choice. We wondered whether these changes in the primer sequence could affect also the parasite LSSP-PCR profiles.

Findings: To answer this question we compared the kDNA signatures obtained from three different and extensively studied *T. cruzi* populations with the eight primers found in the literature. Our results clearly demonstrate that even minimal modifications in the oligonucleotide sequences, especially in the 3' or 5' end, can significantly change the kDNA signature of a *T. cruzi* strain.

Conclusions: These results highlight the necessity of careful preservation of primer nomenclature and sequence when reproducing an LSSP-PCR work to avoid confusion and allow comparison of results among different laboratories.

Keywords: LSSP-PCR, *Trypanosoma cruzi*, kDNA signatures, genetic diversity

Introduction

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and has a variable clinical course ranging from symptomless infection to severe chronic disease with cardiovascular and/or gastrointestinal involvement. The factors influencing this clinical variability have not yet been elucidated, but both host and parasite genetic factors are likely important.

The biological, biochemical, and genetic diversity of *T. cruzi* strains have long been recognized, and over the years, numerous approaches have been used to characterize the parasites, such as multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) [1, 2], kinetoplast DNA restriction fragment length polymorphisms (kDNA RFLP) [3], random amplified polymorphic DNA (RAPD) [4-6], low-stringency single specific primer PCR (LSSP-PCR) [7], multilocus microsatellite typing (MLMT) [8-11], and many other methods such as PCR of the mini-exon and rDNA genes [12, 13].

The extensive efforts to comprehend the intraspecific genetic polymorphisms and population structure of *T. cruzi* are justified by the correlation between genetic variation and the biological properties of the parasite, including geographical distribution, host specificity, and the clinical outcome of infection. Additional understanding of the relationship between *T. cruzi* variation and clinical outcome will likely lead to a better understanding of the molecular epidemiology of Chagas disease [14-16].

In this context, LSSP-PCR targeting the sequence polymorphisms within the variable regions of *T. cruzi* kDNA [17-21] or the intergenic regions of the spliced-leader gene [22] allows direct profiling of the parasites present in the tissues of chronically infected patients [21, 23].

LSSP-PCR is an extremely simple, PCR-based technique that permits the detection of single or multiple mutations in gene-sized DNA fragments. Briefly, purified DNA fragments are subjected to PCR using high concentrations of a single specific oligonucleotide primer, large amounts of *Taq* DNA polymerase, and a very low annealing temperature. Under these conditions, the primer hybridizes specifically to its complementary region and nonspecifically to multiple sites within the DNA fragments in a sequence-dependent manner, producing a heterogeneous set of reaction products that constitutes a unique "gene signature profile" [24]. In fact, LSSP-PCR has been used in many organisms and fields of genetics and molecular medicine to obtain rapid, cheap and sensitive detection of mutations and sequence variations [25-33].

The first study to use LSSP-PCR on *T. cruzi* was performed by Vago and collaborators using a primer called S35 as a driver [21, 23]. This primer was originally designed to amplify minicircle variable region sequences of *T. cruzi* [34]. Many subsequent

works cite these studies to justify the use of the chosen methodology, although the primer sequences published do not exactly match what was previously used. Although the LSSP-PCR technique is highly reproducible under strict conditions, the complex banding pattern obtained can be significantly altered by even a single-base change in the target DNA [24], which suggests that different primer sequences may also produce substantially different results.

Here, we surveyed the literature to catalogue the primer sequences used for *T. cruzi* kDNA analysis by LSSP-PCR and references cited by many research groups to assess the impact of the primer sequence on the parasite profiles. Our results clearly demonstrated that LSSP-PCR is a sensible and reproducible profiling technique, but minimal modifications in the oligonucleotide sequences, used in the second round of PCR, can significantly change the kDNA signature of *T. cruzi* strains.

Findings

Parasites and DNA extraction

Three *T. cruzi* populations were used: the CL Brener clone (*T. cruzi* VI), which was harvested from the CL strain isolated from a *Triatoma infestans* specimen; the Col.1.7G2 clone (*T. cruzi* I), which was obtained from the Colombian strain and originally isolated from the blood of a chronic cardiac patient in Colombia; and the JG strain (*T. cruzi* II), a monoclonal population isolated from a chagasic patient with megaesophagus in Minas Gerais, Brazil.

For *T. cruzi* DNA extraction, the epimastigote forms of each parasite population were grown in liver infusion tryptose (LIT) medium containing 10% calf serum at 27–28°C. Once the culture contained 10⁸ epimastigote forms, the parasite cells were harvested, washed three times in sterile phosphate buffered saline and lysed in the presence of proteinase K overnight at 56°C. Standard DNA extraction was performed with phenol/chloroform as previously described [35].

Low-stringency single specific primer polymerase chain reaction (LSSP-PCR)

The kDNA signatures were obtained using a two-step procedure. The first step consisted of the specific PCR amplification of fragments of approximately 330 bp from variable regions of *T. cruzi* kDNA minicircle molecules. This reaction was carried out in a final volume of 20 µl and contained 1.5 mM MgCl₂, Green Go Taq Reaction Buffer pH 8.5 (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 250 µM dNTPs, primers 121 or S35 (5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGATGA-3') and 122 (5'-

GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATAATA-3') at 1.0 µM, 1.0 U of Go Taq DNA Polymerase (Promega) and 1.0 ng of purified DNA template. Amplification was performed in a PT100 thermocycler (MJ Research) using an initial denaturation step at 94°C for 5 min followed by 35 amplification cycles of an annealing step at 60°C, extension at 72°C and denaturation at 94°C, each for 1 min. The final extension step was extended to 10 min. Five microliters of PCR products was visualized on a silver-stained 6% polyacrylamide gel as previously described [36].

The remaining 15 µL of the PCR reaction was then subjected to electrophoresis on an ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel (1.0% agarose, 0.5% low melting point agarose). The kDNA amplicons were excised from the gel, diluted 10-fold in sterile Milli-Q water and submitted to a second step of low-stringency amplification using a single primer (LSSP-PCR) (Table 1). This second PCR was carried out in a final volume of 10 µl and contained 1.5 mM MgCl₂, Colorless GoTaq Reaction Buffer pH 8.5 (Promega), dNTPs at 250 µM, primer at 4.5 mM, 1.6 U of Go Taq DNA Polymerase (Promega) and 1.0 µl of a solution containing the approximately 330 bp DNA fragments prepared as described above. Amplification was performed in a PT100 thermocycler (MJResearch) as follows: an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 40 amplification cycles of: an annealing step at 30°C, extension step at 72°C, and denaturation step at 94°C, each for 1 min. The final extension step was extended to 10 min. LSSP-PCR products were also visualized on a silver-stained 6% polyacrylamide gel.

Data analysis

LSSP-PCR reactions were performed in triplicate, and only the consistent bands were taken into account to build a reproducible profile of each *T. cruzi* population. The multiband profiles obtained by LSSP-PCR of the *T. cruzi* populations were scored by eye, and each amplification band was numbered as present (1) or absent (0). These data were recorded on DNA-POP software [37], which calculates the proportion of shared bands among samples. Additionally, the distances among the profiles obtained with the different primers were calculated using the Nei and Li coefficient [38]. Phylogenetic trees were constructed based on genetic distance matrices obtained through UPGMA or primer sequences using the Treecon software program version 1.3b [39].

Results

The 330 bp band corresponding to the variable region of kDNA minicircle molecules was successfully amplified in all analyzed stocks (Figure 1). These amplicons

were used as the templates for the second PCR reaction with different single primers to observe the influence of primer sequence on the kDNA signatures.

The LSSP-PCR profiles were reproducible in the evaluated banding range of 100-400 bp (Figure 2) and showed high inter-strain genetic variability among the three *T. cruzi* analyzed stocks, with clear, distinct patterns for each strain that were independent of the primer used (Figure 3). However, the multiband profiles of each strain obtained with the eight different primers resulted mostly in different kDNA signatures, although there was minimal sequence variation observed for some primers (Figure 3).

We further investigated whether the LSSP-PCR profiles produced were more similar when the primer sequences were more similar. A phenotypic tree was constructed using the presence or absence of bands in the LSSP-PCR profiles as the distance matrix and the topology was compared with another tree constructed using the primer sequence data (Figure 4 and Table 1). As shown in Figure 4, there was not a general match between the trees' topologies. For some of the primers (e.g., primers B, C and D) there was a correlation between the similarity of the LSSP-PCR profiles generated and the primer sequence similarities. However, this was not observed for other more heterogeneous primers, suggesting that the position of nucleotide substitutions or insertions/deletions may have a strong influence on the profiles. In this aspect, as expected, small differences in the 3' region, such as the single deletion between primers G and H, caused dramatic changes in the LSSP-PCR profiles. However, unlike for conventional PCR, alterations in the 5' region of the primers (e.g., primers D and F) also strongly affected the LSSP-PCR profiles (Table 1 and Figure 4). This was not observed for the primers B and D, where the deletion is located in a more central position of the primer sequences (15th nucleotide).

Finally, we used the median proportion of shared bands between the LSSP-PCR profiles derived from the different *T. cruzi* stocks to evaluate the ability of primers to distinguish different parasites. According to this analysis, the most discriminative primer was F generating an average of 24% shared bands among the three strains, whereas the less polymorphic was primer G with 48% of shared bands (Table 2).

Discussion

The application of LSSP-PCR to the characterization of the 330 bp variable portion of kDNA minicircle molecules produces complex banding patterns that allow identification of clones and strains from cultures or experimentally infected tissues with good discriminatory capacity [21]. Furthermore, the large genetic diversity in kDNA signatures obtained confirms the applicability of this method to genetic characterization studies on naturally infected vectors and humans [40, 41]. Differential tissue distribution of diverse

clones of *T. cruzi* have been demonstrated in infected mice [35] and humans [7,23]. LSSP-PCR is also useful to identify the differential distribution of *T. cruzi* populations associated with disease reactivation [18].

Despite being widely used for *T. cruzi* studies, LSSP-PCR reproducibility has been questioned due to its low-stringency nature. However, we have observed in our laboratory over our ten years of experience that LSSP-PCR patterns are highly reproducible even when the experiments are performed on separate days by different workers or when different thermocyclers and electrophoretic runs are used. To achieve this standardized amplification conditions both the enzyme and primer sources, and a good quality DNA at an adequate concentration must be consistently used [21]. Herein, we confirmed the high reproducibility of the technique by performing reactions at least three times on different days and obtaining highly stable profiles using different primers.

LSSP-PCR uses a single primer that hybridizes with high specificity to its complementary sequence incorporated into the amplicons during the first round of PCR, and also with low specificity but in a sequence-dependent manner to multiple sites within the amplified fragment during the second round. Thus the reaction yields a large number of products that can be resolved by electrophoresis to give rise to a multiband DNA fragment signature that reflects the DNA template sequence [24]. Changes as small as a single base mutation could drastically alter the multiband pattern, producing new signatures that are diagnostic of the specific alterations [21, 24]. In this context, we asked whether the primer sequence might also influence the kDNA complex band in pattern.

To that end, we evaluated eight primer sequences previously used in the literature with similar names or citations. Our results demonstrated that sets of primers with related sequences, but differing from one another by 1 to 7 bases, resulted in different kDNA signatures for the same strain. In fact, alterations in primer sequence as small as a unique base mutation affected the kDNA multiband patterns, especially changes in the 3' or 5' regions.

On the other hand, when we analyzed the profiles obtained with the same primer for the three evaluated strains, we saw that they were completely different from one another despite of the primer used. This is extremely important since the main goal of LSSP-PCR is to detect genetic polymorphisms in *T. cruzi* isolates belonging to distinct populations such as in different distant endemic areas or outbreaks or different clones within the same population with different tropisms, for example.

In conclusion we demonstrate here the importance of primer sequence when performing LSSP-PCR, at least for *T. cruzi* kDNA. This is especially relevant because different researchers frequently reproduce published techniques, but if the primer

sequences are not faithful, comparisons of LSSP-PCR results among laboratories are not feasible, contributing to the false idea that LSSP-PCR is a poor reproducible technique. Additionally, cases where oligonucleotide sequences are intentionally changed should be followed also by changes in the primers' names. This would be highly useful for all laboratories working on kDNA signatures, while avoiding confusion and improving the comparison of LSSP-PCR patterns among laboratories.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MS processed the samples and experiments, analyzed data, reviewed the literature and wrote the manuscript. CMR processed the samples and experiments, analyzed data and reviewed the manuscript. CRM, GRF and SDJP analyzed data and reviewed the manuscript. AMM conceived of the study, and participated in its design and coordination and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by FAPEMIG, CNPq and CAPES founding agencies. We thank Neuza A. Rodrigues for expert technical assistance.

References

1. Miles MA, Souza A, Povoia M, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ: Isozymic heterogeneity of Trypanosoma cruzi in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 1978, 272:819-821.
2. Miles MA, Toyé PJ, Oswald SC, Godfrey DG: 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* 1977, 71:217-225.
3. Morel C, Simpson L: Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am J Trop Med Hyg* 1980, 29:1070-1074.
4. Dias Neto E, Steindel M, Passos LK, de Souza CP, Rollinson D, Katz N, Romanha AJ, Pena SD, Simpson AJ: The use of RAPDs for the study of the genetic diversity of Schistosoma mansoni and Trypanosoma cruzi. *EXS* 1993, 67:339-345.
5. Steindel M, Dias Neto E, de Menezes CL, Romanha AJ, Simpson AJ: Random amplified polymorphic DNA analysis of Trypanosoma cruzi strains. *Mol Biochem Parasitol* 1993, 60:71-79.
6. Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabe C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ: Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:1335-1339.
7. Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Correa-Oliveira R: PCR detection of Trypanosoma cruzi DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* 1996, 348:891-892.
8. Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor GR, Smith CL, Pena SD: Probing the genetic population structure of Trypanosoma cruzi with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:3776-3780.
9. Oliveira RP, Melo AI, Macedo AM, Chiari E, Pena SD: The population structure of Trypanosoma cruzi: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999, 94 Suppl 1:65-70.
10. Valadares HM, Pimenta JR, de Freitas JM, Duffy T, Bartholomeu DC, Oliveira Rde P, Chiari E, Moreira Mda C, Filho GB, Schijman AG, et al: Genetic profiling of Trypanosoma cruzi directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int J Parasitol* 2008, 38:839-850.
11. Valadares HMS: Análises populacionais em Trypanosoma cruzi baseadas em microsatélites polimórficos de DNA. Universidade Federal de Minas Gerais, Biochemistry and Immunology; 2007.
12. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B: DNA markers define two major phylogenetic lineages of Trypanosoma cruzi. *Mol Biochem Parasitol* 1996, 83:141-152.
13. Souto RP, Zingales B: Sensitive detection and strain classification of Trypanosoma cruzi by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol* 1993, 62:45-52.
14. Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR: The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med* 2004, 4:549-562.
15. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL: The molecular epidemiology and phylogeography of Trypanosoma cruzi and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. *Parasitology* 2009, 136:1509-1528.
16. Revollo S, Oury B, Laurent JP, Barnabe C, Quesney V, Carriere V, Noel S, Tibayrenc M: Trypanosoma cruzi: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp Parasitol* 1998, 89:30-39.

17. Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM: Trypanosoma cruzi: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol* 2002, 100:269-275.
18. Burgos JM, Begher SB, Freitas JM, Bisio M, Duffy T, Altschek J, Teixeira R, Lopez Alcoba H, Decarliini F, Freilij H, et al: Molecular diagnosis and typing of Trypanosoma cruzi populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. *Am J Trop Med Hyg* 2005, 73:1016-1018.
19. Rodrigues CM, Valadares HM, Francisco AF, Arantes JM, Campos CF, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Araujo MS, Arantes RM, Chiari E, et al: Coinfection with different Trypanosoma cruzi strains interferes with the host immune response to infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2010, 4:e846.
20. Salazar A, Schijman AG, Triana-Chavez O: High variability of Colombian Trypanosoma cruzi lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. *Acta Trop* 2006, 100:110-118.
21. Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvao LM, Reis D, Pereira ME, Simpson AJ, Tostes S, Pena SD: Kinetoplast DNA signatures of Trypanosoma cruzi strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol* 1996, 149:2153-2159.
22. Mejia-Jaramillo AM, Arboleda-Sanchez S, Rodriguez IB, Cura C, Salazar A, Del Mazo J, Triana-Chavez O, Schijman AG: Geographical clustering of Trypanosoma cruzi I groups from Colombia revealed by low-stringency single specific primer-PCR of the intergenic regions of spliced-leader genes. *Parasitol Res* 2009, 104:399-410.
23. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S, Jr., Moreira MC, Filho GB, Pena SD: Genetic characterization of Trypanosoma cruzi directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol* 2000, 156:1805-1809.
24. Pena SD, Barreto G, Vago AR, De Marco L, Reinach FC, Dias Neto E, Simpson AJ: Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:1946-1949.
25. Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceicao-Silva F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS: Leishmania (Viannia) braziliensis genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol* 2009, 121:317-322.
26. Barreto G, Vago AR, Ginther C, Simpson AJ, Pena SD: Mitochondrial D-loop "signatures" produced by low-stringency single specific primer PCR constitute a simple comparative human identity test. *Am J Hum Genet* 1996, 58:609-616.
27. Bomfim MR, Koury MC: Evaluation of LSSP-PCR for identification of Leptospira spp. in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis. *Vet Microbiol* 2006, 118:278-288.
28. Gadiou S, Safarova D, Navratil M: Differentiation of Plum pox virus isolates by single-strand conformation polymorphism and low-stringency single specific primer PCR analysis of HC-Pro genome region. *Acta Virol* 2009, 53:53-56.
29. Marquez DS, Ramirez LE, Moreno J, Pedrosa AL, Lages-Silva E: Trypanosoma rangeli: RAPD-PCR and LSSP-PCR analyses of isolates from southeast Brazil and Colombia and their relation with KPI minicircles. *Exp Parasitol* 2007, 117:35-42.
30. Stamenkovic G, Guduric J, Velickovic Z, Skerl V, Krtolica K, Veljkovic E, Dimitrijevic B: Analysis of 5' non-coding region in hepatitis C virus by single-strand conformation polymorphism and low-stringency single specific primer PCR. *Clin Chem Lab Med* 2001, 39:948-952.
31. Gomes MA, Silva EF, Macedo AM, Vago AR, Melo MN: LSSP-PCR for characterization of strains of Entamoeba histolytica isolated in Brazil. *Parasitology* 1997, 114 (Pt 6):517-520.
32. Villa LL, Caballero OL, Levi JE, Pena SD, Simpson AJ: An approach to human papillomavirus identification using low stringency single specific primer PCR. *Mol Cell Probes* 1995, 9:45-48.
33. de Oliveira FS, Valet-Rosalino CM, Schubach Ade O, Pacheco Rda S: rDNA minicircle signatures of Leishmania (Viannia) braziliensis in oral and nasal mucosa from mucosal leishmaniasis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 66:361-365.
34. Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L: Sensitive detection and schizodeme classification of Trypanosoma cruzi cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 1989, 33:205-214.
35. Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM: Differential tissue distribution of diverse clones of Trypanosoma cruzi in infected mice. *Mol Biochem Parasitol* 1999, 100:163-172.
36. Santos FR, Epplen JT, Pena SD: Testing deficiency paternity cases with a Y-linked tetranucleotide repeat polymorphism. *EXS* 1993, 67:261-265.
37. Nunes ACP, S.D.J.: DNA-POP Program for Populational Study of DNA fingerprints. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1993.
38. Nei M, Li WH: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76:5269-5273.
39. Van de Peer Y, De Wachter R: TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. In *Comput Appl Biosci*, vol. 10. pp. 569-570; 1994:569-570.
40. Brito CM, Lima MM, Sarquis O, Pires MQ, Coutinho CF, Duarte R, Pacheco RS: Genetic polymorphism in Trypanosoma cruzi I isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer-polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 2008, 103:1111-1117.
41. Lages-Silva E, Ramirez LE, Pedrosa AL, Crema E, da Cunha Galvao LM, Junho Pena SD, Macedo AM, Chiari E: Variability of kinetoplast DNA gene signatures of Trypanosoma cruzi I strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol* 2006, 44:2167-2171.
42. Braga MS, Lauria-Pires L, Arganaraz ER, Nascimento RJ, Teixeira AR: Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000, 42:157-161.
43. Rodriguez IB, Botero A, Mejia-Jaramillo AM, Marquez EJ, Ortiz S, Solari A, Triana-Chavez O: Transmission dynamics of Trypanosoma cruzi determined by low-stringency single primer polymerase chain reaction and southern blot analyses in four indigenous communities of the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2009, 81:396-403.
44. Botero LA, Mejia AM, Triana O: [Biological and genetic characterization of two Colombian clones of T. cruzi groups I and II]. *Biomed* 2007, 27 S1:64-74.
45. Mejia AM, Triana O: [Genetic variability of Trypanosoma cruzi in blood and organs of infected mice determined by LSSP-PCR]. *Biomedica* 2005, 25:76-86.
46. Freitas JM, Andrade LO, Pires SF, Lima R, Chiari E, Santos RR, Soares M, Machado CR, Franco GR, Pena SD, Macedo AM: The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting Trypanosoma cruzi strains. *PLoS One* 2009, 4:e5113.
47. Lages-Silva E, Ramirez LE, Silva-Vergara ML, Chiari E: Chagasic meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: diagnosis, follow-up, and genetic characterization of Trypanosoma cruzi. *Clin Infect Dis* 2002, 34:118-123.

Figures and legends

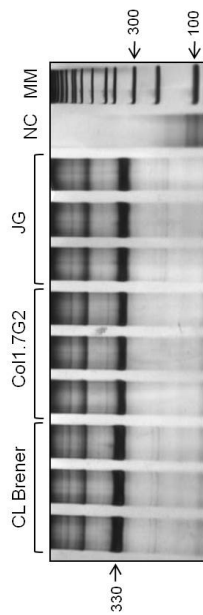


Figure 1. Amplification of the hypervariable regions of kDNA minicircle molecules of three *T. cruzi* populations. The PCR assays were performed in triplicate by three independent reactions for each *T. cruzi* population (CL Brener clone, Col1.7G2 clone or JG strain), as indicated in the figure. NC: negative control (without parasite DNA). MM: molecular size marker (1 Kb Plus DNA ladder - Invitrogen®).

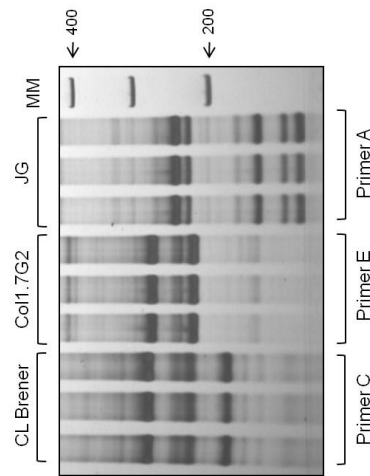


Figure 2. Reproducibility of kDNA signatures obtained with different primers from LSSP-PCR. The amplifications were performed in triplicate by three independent reactions for each *T. cruzi* population (CL Brener clone, Col1.7G2 clone or JG strain), each strain with a different primer, as indicated in the figure. MM: molecular size marker (1 Kb Plus DNA ladder - Invitrogen®).

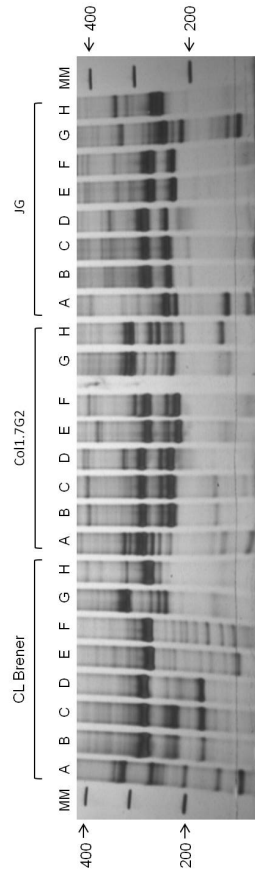
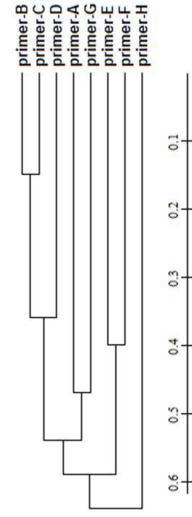


Figure 3. Evaluation of the genetic variability among three *T. cruzi* populations by LSSP-PCR with different primers. The primer used (A to H) is indicated below the profiles. MM: molecular size marker (1 Kb Plus DNA ladder - Invitrogen®).

A



B

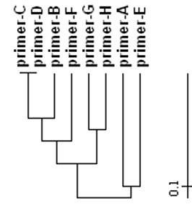


Figure 4. LSSP-PCR trees. (A) UPGMA tree generated from the distance of the LSSP-PCR profiles produced by each primer based on the sum of present and absent bands for the *T. cruzi* populations CL Brener, Col1.7G2 and JG. (B) Distance tree constructed from the primer sequences.

Tables

Table 1. Sequence of primers designed to analyze three *T. cruzi* populations by LSSP-PCR.

Primer code	Original name	Sequence (5' →3')	Size (bp)	Reference
C	S35	AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA ²⁶	26	[20, 22, 34, 40]
A	S35	--ATAATGTACGGGKGAGATGC----	20	[42]
B	S35	AAATAATGTACGGG--GAGATGCATGA	25	[23, 43-45]
D	S35	AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA	26	[7,21]
E	S35G	-----ATGTACGGG--GAGATGCATGA	20	[17, 35, 46]
F	S35G*	-----ATGTACGGGGGAGATGCATGA	21	[19]
G	S35G	AAATAATGTACGGGGGAGATG-----	21	[41, 47]
H	S35G 5	AAATAATGTACGGGGGAGAT-----	20	Not published

*Indicates that this primer was originally described as fluorescein labeled but here the fluorescent marker was removed. All changes relative to primer S35 described by Sturm *et al.* (primer C) are highlighted.

Table 2. Average ratio of the proportion of shared bands among samples using the different primers.

Primer	Mean proportion of shared bands
primer A	0.3909
primer B	0.4050
primer C	0.3882
primer D	0.3401
primer E	0.3945
primer F	0.2364
primer G	0.4873
primer H	0.3176
mean	0.3700

**CAPÍTULO 5 - Utilização de estratégias de PCR para a
identificação de DNA de *T. cruzi* nas biópsias de seguimento
pós-transplante**

5.1. Reativação da doença de Chagas

Uma das poucas alternativas para a fase final da doença de Chagas cardíaca é o transplante de coração. O sucesso desse tratamento depende basicamente da não rejeição do coração transplantado e da não reativação da infecção do *T. cruzi*. A persistência do *T. cruzi* no coração e outros órgãos já foi demonstrada em pacientes com doença de Chagas crônica (Bellotti et al., 1996; Ferreira et al., 2011; Vago et al., 1996a; Vago et al., 2003). Dessa forma, uma grande preocupação no receptor de transplante de coração é a consequência da terapia imunossupressora a longo prazo após o transplante que carrega o risco de reativação de *T. cruzi*. As taxas de reativação relatadas variam de 27-90% entre os receptores chagásicos com um número médio de 2,5 ($\pm 2,2$) episódios de reativação por paciente (Bestetti et al., 2007; Fiorelli et al., 2005; Sartori et al., 2002; Souza et al., 2000). Somente nos últimos quatro anos, 43 pacientes chagásicos realizaram transplante de coração no HC da UFMG e até o momento 20 deles reativaram a doença (46,5%). Apesar da frequente reativação, a longo prazo, a sobrevida destes pacientes é muito boa (Bocchi et al., 1996; Fiorelli et al., 2005).

Assim como a primo-infecção, a reativação de Chagas tem apresentações clínicas muito variadas, desde casos assintomáticos até casos mais complexos. Grande parte dos pacientes tem sintomas vagos como hiporexia e febre baixa, podem ter lesões cutâneas as mais variadas, desde máculo-papulosas e até eritema nodoso. As manifestações mais frequentes são miocardite e paniculite. Quando o comprometimento cardíaco é primário, o paciente pode ter insuficiência cardíaca com dispneia ou manifestações de arritmias como vertigem, síncope ou até morte súbita se ocorrer, por exemplo, um bloqueio átrio ventricular total (comunicação pessoal Dr. Silvio Amadeu).

O diagnóstico de reativação deve ser confirmado pela detecção de *T. cruzi*, em locais tais como pele, miocárdio, líquido raquidiano e medula óssea. O isolamento do *T. cruzi* no sangue não necessariamente indica reativação da doença, mas pode ser uma manifestação precoce desta, e, quando associado a quadro clínico, é forte evidência para reativação. O diagnóstico diferencial entre reativação e rejeição diante de um quadro de insuficiência cardíaca aguda, ainda sem resultado de biópsia endomiocárdica, ou de infiltrado persistente sem resposta ao tratamento imunodepressor sem detecção do *T. cruzi* são desafios no diagnóstico da infecção. Em geral, não são observadas formas amastigotas nas biópsias endomiocárdicas (Bacal et al., 2010). Além da detecção direta do parasita, outros achados da biópsia endomiocárdica podem

a ser úteis para o diagnóstico diferencial entre rejeição e reativação da doença de Chagas, a exemplo da diferente relação CD4+/CD8+ e maior expressão de CD4+ na rejeição, quando comparada à miocardite chagásica crônica (Higuchi Mde et al., 1993). Nesse sentido, a técnica de PCR para *T. cruzi* nos fragmentos da biópsia tem sido ocasionalmente realizada, com resultados promissores (Benvenuti et al., 2005; Diez et al., 2007).

5.1.1. Diagnóstico de reativação

A monitoração da infecção por *T. cruzi* tem sido realizada através de pesquisa rotineira na biópsia endomiocárdica de receptores com sorologia positiva para doença de Chagas. Na suspeita de reativação, buscam-se a detecção em tecidos (p.e. imunoperoxidase com anticorpo anti *T. cruzi*) e a utilização de esfregaço, xenodiagnóstico ou hemocultura. A hipótese diagnóstica de reativação tem sido considerada em pacientes com miocardiopatia chagásica prévia quando na presença isolada ou conjunta de febre indeterminada, nódulos subcutâneos, manifestação neurológica, pancitopenia, lesões cutâneas não esclarecidas, persistência de rejeição apesar do tratamento, comprometimento agudo de função ventricular, arritmias de recente começo, fragmentos de biópsia miocárdica com detecção do *T. cruzi* através de imunohistoquímica (Bacal et al., 2010).

5.1.2. Profilaxia e tratamento da reativação

Profilaxia inespecífica dever incluir manutenção de doses de medicações imunossupressoras cronicamente tão baixas quanto toleradas livres de rejeição. Na prática clínica, as doses de imunossupressores devem ser lentamente reduzidas e a possibilidade de rejeição monitorada. A redução da utilização de corticosteroides foi associada à menor incidência de reativação (Bestetti et al., 1994). E medicações imunossupressoras associadas a uma maior frequência de reativação, como o micofenolato em dose plena, devem ser evitadas (Bacal et al., 2005). Portanto, os protocolos de imunossupressão variam entre os diferentes centros e entre os pacientes. A experiência acumulada no HC da UFMG tem indicado uma sobrevida maior entre os pacientes imunossuprimidos com ciclosporina, micofenolato mofetil e prednisona.

A profilaxia específica com utilização de medicações com ação anti *T. cruzi*, antes e depois do transplante tem sido motivo de debate, incluindo uso ou não de medicação, medicação a ser utilizada e a dose e tempo de uso. A maior parte dos centros não utiliza o tratamento com benzonidazol profilaticamente, dentro do princípio de que é difícil erradicar o *T. cruzi* do receptor que é um portador crônico. Ademais, estudo preliminar fazendo controle com benzonidazol não demonstrou benefício do tratamento profilático antes ou após transplante sem reativação, havendo chance de efeitos colaterais com a medicação (Bocchi et al., 1996).

Apesar de não haver indicação clara para o tratamento profilático com benzonidazol mortalidade diretamente relacionada à reativação pelo *T. cruzi* é reduzida com a introdução precoce do tratamento, com melhora de sobrevida em longo prazo (Bocchi and Fiorelli, 2001a; b). A redução da imunodepressão, quando possível, tem sido preconizada diante do diagnóstico ou da suspeita de reativação. As medicações utilizadas com sucesso para o tratamento específico da reativação tem sido o benzonidazol (5-10 mg/kg/dia por 60 dias) e o alopurinol (600-900 mg/dia por 60 dias) (Bacal et al., 2010).

5.2. Seguimento pós-transplante cardíaco - Biópsia endomiocárdica

A biópsia endomiocárdica é o método diagnóstico “padrão-ouro” para monitorização de rejeição e reativação da doença de Chagas. Trata-se de um procedimento percutâneo que usualmente é guiado por fluoroscopia no laboratório de cateterismo cardíaco, que alternativamente pode ser guiado pelo ecocardiograma (Ross et al., 2001). Sob anestesia local, a biópsia endomiocárdica pode ser realizada por punção percutânea da veia jugular interna (via preferencial) ou da veia femoral (nos casos de insucesso pela veia jugular interna). Geralmente, o procedimento é realizado retirando fragmentos do septo interventricular direito (Anonymous, 2002; Ross et al., 2001). No HC da UFMG três a quatro fragmentos endomiocárdicos são coletados, cada um medindo 5,20 mm³ (segundo o fabricante do biótomo - Córdis®). Trata-se de um procedimento de baixa morbidade e mortalidade. O paciente recebe alta 2h após observação clínica no setor.

Os protocolos de biópsia endomiocárdica variam de acordo com a experiência de cada serviço, porém a primeira biópsia é geralmente realizada uma semana após o transplante (Ross

et al., 2001). Além disso, a biópsia endomiocárdica deve ser realizada sempre que houver suspeita clínica de rejeição ou reativação da doença de Chagas (Sociedade Brasileira de Cardiologia (1999); Anonymous 2002)

Para realização da análise microscópica anatomopatológica, são realizados cortes histológicos sequenciais (ao menos três níveis) corados pela hematoxilina-eosina, sendo aconselhável que níveis intermediários sejam guardados para eventuais colorações específicas ou imunohistoquímica (Bacal et al., 2010).

5.3. Objetivo

Nosso objetivo nesta parte do trabalho foi avaliar a possibilidade de utilização de PCR para diagnóstico da presença de *T. cruzi* nas biópsias de acompanhamento de corações transplantados em pacientes cardiopatas chagásicos visando à identificação precoce de reativação da infecção.

5.4. Resultados e Discussão

Durante o seguimento pós-transplante dos pacientes cardiopatas chagásicos são realizadas biópsias endomiocárdicas para monitoramento de rejeição e reativação da doença de Chagas conforme as bases de protocolo de vigilância de rejeição. O protocolo no HC da UFMG estabelecem biópsias semanais no primeiro mês após o transplante, quinzenais no segundo mês, mensais até o sexto mês e, a seguir trimestrais até completar um ano de transplante.

Inicialmente, fizemos um estudo retrospectivo piloto com nove pacientes para avaliar a utilidade da estratégia de PCR para a identificação precoce do DNA de *T. cruzi* nas biópsias acompanhamento. Dos nove pacientes avaliados, seis experimentaram episódio de reativação após o transplante, diagnosticado pela presença de lesão de pele (quatro pacientes) ou miocardite (dois pacientes). Três pacientes chagásicos transplantados que até então não apresentaram sinais de reativação clínica ou laboratorial foram incluídos como controles nas análises. O DNA total das seis primeiras biópsias endomiocárdicas desses pacientes foi extraído a partir dos blocos de parafina utilizando o kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Valencia, CA)

e em seguida submetidos às reações de PCR do kDNA e PCR em tempo real do rDNA 24Sα *T. cruzi*, como descrito no Capítulo 4.

Todas as biópsias endomiocárdicas avaliadas dos pacientes transplantados sem sinais de reativação apresentaram-se negativas em ambos os testes de diagnóstico molecular de *T. cruzi*. Ao contrário, ao menos uma amostra de cada paciente com sinais de reativação da doença de Chagas foi positiva para um e/ou outro teste (Tabela 5.1). De acordo com as análises histopatológicas previamente realizadas, o *T. cruzi* não foi encontrado em nenhuma dessas biópsias endomiocárdicas.

Utilizando a metodologia proposta neste trabalho, nós detectamos a presença do DNA do parasito nos corações transplantados muito antes do aparecimento das manifestações clínicas sugestivas de reativação e do diagnóstico pela análise histopatológica. Em um dos casos o resultado foi positivo já na primeira biópsia realizada – 7 dias após o transplante (MNAS), enquanto em outro caso a detecção ocorreu 60 dias após a substituição do coração (SES). Mais ainda, nossos resultados sugerem uma relação temporal entre o diagnóstico molecular e as manifestações da reativação: quanto mais cedo ocorreu a reativação clínica, mais cedo também a PCR da biópsia foi positiva. O que sugere que o diagnóstico molecular aqui proposto poderia identificar precocemente a reativação da infecção, antecipando de 1 a 18 meses os primeiros sintomas clínicos da reativação (Tabela 5.1).

Analisando os resultados pudemos observar que alguns pacientes apresentaram resultados positivos intermitentes. Isso provavelmente se deve ao pequeno fragmento que é coletado no momento da biópsia, não sendo garantia de que a região cardíaca amostrada será exatamente a mesma da coleta anterior. Resultados de PCR sanguínea intermitente também já foi relatada, uma vez que ocorrem ondas parasitemia durante o longo período de doença de Chagas (Galvao et al., 2003).

Tabela 5.1: Resultado das PCRs para diagnóstico de *T. cruzi* das seis primeiras biópsias endomiocárdicas realizadas após transplante de nove pacientes chagásicos.

Paciente	Data da Reativação clínica	Resultados PCR kDNA e rDNA / Dias após transplante					
		7	14	21	28	45	60
SES	20 meses Lesão de pele	-	-	-	-	-	+*
JLJ	10 meses Miocardite	-	-	+ ^{**}	+	+	+
SFV	4 meses Lesão de pele	-	-	-	+ [*]	-	+ [*]
MNAS	3 meses Miocardite	+ [*]	+ [*]	-	+	+ [*]	-
JS	3 meses Lesão de pele	-	+	-	+ ^{**}	-	-
ACMR	3 meses Lesão de pele	-	+ ^{**}	-	-	-	-
JRC	-	-	-	-	-	-	-
JGMC	-	-	-	-	-	-	-
MNRS	-	-	-	-	-	-	-

* amostras detectadas apenas por PCR do kDNA

**amostras detectadas apenas por PCR em tempo real do rDNA 24Sα

As amostras não sinalizadas foram positivas ou negativas por ambos os testes.

Quando os métodos diagnósticos foram comparados pudemos observar que dentre as 14 biópsias endomiocárdicas positivas, cinco foram positivas por ambos os testes, três foram positivas apenas pela PCR em tempo real do rDNA e seis exclusivamente pela PCR do kDNA (Tabela 5.2). A positividade do kDNA foi significativamente maior que a do rDNA ($P < 0,05$) e o índice de concordância entre os testes foi muito baixo ($Kappa = 0,36$). Embora a kDNA PCR tenha apresentado melhor desempenho, a PCR *real time* do rDNA foi o primeiro teste a se tornar positivo para dois dos seis pacientes que reativaram, JLJ e ACMR, sendo a única reação positiva deste último. Portanto, acreditamos que as técnicas sejam complementares para o diagnóstico da precoce da reativação.

Tabela 5.2: Comparação da positividade das biópsias endomiocárdicas detectadas por PCR do kDNA e rDNA 24Sα realizadas para os pacientes que reativaram clinicamente a doença de Chagas.

24Sα kDNA	rDNA	
	Nº de positivos	Nº de negativos
Nº de positivos	5	6
Nº de negativos	3	22

* $P < 0.05$ (Teste de Fisher). $Kappa = 0,36$.

Em casos de infecções agudas ou reativação da doença de Chagas é importante a utilização de métodos de diagnóstico sensíveis uma vez que a detecção precoce e a instituição de tratamento resultam em um desfecho mais favorável ao paciente. Nesse sentido, a técnica de PCR para a detecção de DNA de *T. cruzi* no sangue e nos fragmentos da biópsia tem sido realizada com resultados promissores (Benvenuti et al., 2005; Burgos et al., 2010a; Diez et al., 2007). Já em 2000, foram publicados os primeiros trabalhos relatando que a PCR é muito mais sensível do que a observação microscópica direta para o diagnóstico precoce de reativação em pacientes transplantados cardíacos com a doença de Chagas (Schijman et al., 2000). Recentemente, Diez e cols (2007) demonstraram o potencial da PCR na detecção do DNA do parasito no sangue 7 a 85 dias antes da reativação clínica da infecção pelo *T. cruzi*. Os mesmos autores relataram resultados negativos de PCR após o tratamento da reativação da infecção, demonstrando a utilidade da reação para monitorar a parasitemia em resposta à quimioterapia específica anti *T. cruzi*. Em outro estudo, as PCRs aplicadas a amostras de sangue foram positivas 7-70 dias após o transplante cardíaco e 28-78 dias antes de reativação da doença de Chagas (Burgos et al., 2010a). Assim, é concebível que reativação da infecção pelo *T. cruzi*, como detectado pelas análises de PCR, pode levar a implementação do tratamento antes do aparecimento de manifestações clínicas associadas com essa condição.

Todavia, alguns autores questionam a utilidade das técnicas de PCR qualitativas para diagnosticar a reativação da doença de Chagas e sugerem que esta aplicação seja criteriosamente avaliada (Benvenuti et al., 2011). A principal crítica destes autores é que devido a persistência do parasita, a PCR para diagnóstico do DNA de *T. cruzi* no sangue é positiva em muitos pacientes chagásicos crônicos (Ribeiro-dos-Santos et al., 1999). Além disso, Diez et al.

(2007) detectaram resultados positivos na PCR de sangue de 1 dos 5 pacientes controles (aqueles que não reativaram pós-transplante). Benvenuti e cols. também encontraram 27% de exames positivos nas biópsias endomiocárdicas de pacientes que não haviam reativado a doença até a data da avaliação (Benvenuti et al., 2011).

Métodos baseados em PCR são geralmente considerados mais sensíveis do que a microscopia e ultimamente tem sido cada vez mais usado para diagnosticar a doença de Chagas. No entanto, a utilização de PCR é desafiadora, pois não existe um método “padrão de ouro” para o diagnóstico da doença de Chagas (Brasil et al., 2010; Gomes et al., 2009), e o desempenho de diagnóstico pode variar muito. Variabilidade que depende não apenas das características epidemiológicas das populações estudadas, mas também do volume de sangue ou tecido coletado, do método para extração de DNA, dos reagentes, da escolha das sequências de iniciadores e DNA-alvo. Os ensaios de PCR mais amplamente utilizados para fins de diagnóstico usam como alvo o kDNA ou DNA satélite (Brasil et al., 2010; Diaz et al., 1992; Diez et al., 2007; Duffy et al., 2009; Moser et al., 1989; Schijman et al., 2011; Sturm et al., 1989). Ambos os alvos estão presentes em múltiplas cópias no genoma do parasita, o que aumenta a sensibilidade de detecção (Gonzalez et al., 1984; Sturm et al., 1989). Vários trabalhos já demonstraram que a amplificação da região variável do minicírculo do kDNA é específica para *T. cruzi* (Avila et al., 1990; Sturm et al., 1989). Por outro lado, já foi relatado que os ensaios que têm como alvo estas regiões podem amplificar DNA não *T. cruzi* (Castro et al., 2002; Vallejo et al., 1999; Virreira et al., 2003). Inclusive, Teixeira e cols sugerem a possível integração de fragmentos do minicírculo de *T. cruzi* no genoma de vários hospedeiros (Nitz et al., 2004; Teixeira et al., 1994). Ensaios que amplificam outros genes já apresentaram melhor especificidade, mas geralmente estes são menos sensíveis (Diez et al., 2007; Freitas et al., 2005; Herwaldt et al., 2000; Virreira et al., 2003). Sendo assim, nós optamos pela associação de duas PCRs para o diagnóstico de *T. cruzi*, PCR do kDNA e PCR em tempo real do rDNA 24S α , visando aumentar a sensibilidade diagnóstica sem perder especificidade.

Quase vinte anos após os primeiros relatos do emprego da PCR para a detecção da infecção pelo *T. cruzi* terem sido publicados, tais testes ainda não foram disponibilizados comercialmente e não são usados além do ambiente de pesquisa. Além do custo, pode ser citada a necessidade de sua execução em laboratórios com estrutura apropriada, com espaço exclusivo para a sua realização e pessoal treinado como os principais fatores limitantes no que tange o emprego do teste de PCR em situação ambulatorial ou hospitalar. Por isso, esforços

têm sido centrados para a realização de um estudo multicêntrico de padronização da técnica, com o intuito de se estabelecer um protocolo consenso para ser empregado por todos os grupos que praticam o teste molecular na sua rotina diagnóstica.

Neste aspecto o protocolo proposto neste trabalho antecipou o diagnóstico da reativação da doença de Chagas nos pacientes até então avaliados. Esse achado é muito relevante por inúmeros motivos: (i) as amastigotas, formas intracelulares do parasito, raramente são encontradas no exame direto da biópsia endomiocárdica de pacientes chagásicos crônicos; (ii) o diagnóstico diferencial da inflamação devido à rejeição do enxerto ou daquela resultante da reativação da doença de Chagas é muito difícil de ser estabelecido; (iii) o tempo até se obter o diagnóstico por PCR é infinitamente menor que o tempo necessário para uma hemocultura ser concluída; além deste método ser mais sensível que a microscopia (iv) a reativação da infecção é um evento muito frequente entre os pacientes chagásicos transplantados, cerca de 50% dos casos no HC da UFMG. Isso provavelmente devido à imunossupressão necessária desde a preparação do paciente para o transplante; (v) a detecção precoce de reativação, como aqui demonstrada, permitiria a rápida introdução do tratamento específico com benzonidazol, conseqüentemente, melhorando a sobrevida e o bem estar desses pacientes.

Futuros estudos comparando o desfecho de receptores de transplante cardíaco tratados com base em resultados obtidos precocemente através das PCRs, com aqueles pacientes tratados somente quando parasitemia patente ou manifestações clínicas de reativação são detectadas, poderão confirmar o valor clínico dessa estratégia de gerenciamento dos pacientes transplantados que sofrem de doença Chagas.

CAPÍTULO 6 - Considerações finais

Mais de um século após a descoberta da doença de Chagas e de seu agente etiológico, o *T. cruzi*, ainda restam muitas dúvidas sobre diferentes aspectos da biologia deste parasito e da diversidade de formas clínicas dos pacientes. Com a crescente adoção de métodos moleculares de análises, temos visto grandes avanços na compreensão desse patógeno, sua estrutura populacional, genoma, métodos diagnósticos, entre outros campos. Mas devido à grande variabilidade da espécie e das formas clínicas, cada descoberta parece abrir perspectivas e novas dúvidas descortinando uma complexidade enorme na interação parasito-hospedeiro.

Nesse contexto, nas últimas décadas, nosso grupo de pesquisa tem empenhado esforços na busca por novas estratégias e metodologias para a caracterização molecular do *T. cruzi* e sua aplicação no estudo da patogenia da doença de Chagas. No final dos anos 80, propusemos o Modelo Histotrópico Clonal da doença de Chagas como uma tentativa para explicar a dificuldade de se demonstrar estreita correlação entre aspectos genéticos do parasito e aspectos clínicos dos pacientes. Esse modelo assume que populações naturais de *T. cruzi* são multiclonais e que clones distintos do parasito possuem tropismo para diferentes tecidos do hospedeiro. Métodos convencionais de análise usualmente utilizam parasitos isolados do sangue de pacientes e implicam no crescimento *in vitro* das populações, o que tende a favorecer o crescimento de alguns indivíduos. Assim, como pôde ser acompanhado ao logo deste documento, no presente trabalho procuramos desenvolver ou aperfeiçoar procedimentos moleculares que nos permitissem elucidar a complexidade de populações de *T. cruzi* tanto *in vitro* quanto aquelas presentes diretamente em tecidos de pacientes, especialmente daqueles portadores da cardiopatia chagásica crônica grave e submetidos a transplante.

Durante as comemorações do centenário da descoberta do “mal de Chagas”, a nomenclatura de grupos genéticos distintos de *T. cruzi* foi estabelecida, sendo o táxon subdividido em seis DTUs denominadas de TcI a TcVI (Zingales et al., 2009). A padronização da nomenclatura foi essencial para permitir uma melhor comunicação científica entre diferentes laboratórios e vem permitindo a comparação de dados epidemiológicos e patológicos obtidos pela comunidade que pesquisa sobre o *T. cruzi*.

Ao longo dos anos, várias abordagens foram propostas por diferentes laboratórios para caracterizar a diversidade bioquímica e genética de isolados de *T. cruzi*, mas até o momento não há nenhum alvo genético único que permita uma resolução completa dos seis DTUs. A

adoção de um único alvo também parece ser desaconselhável por causa da complexidade genômica desse parasito e possível influência de misturas de populações e trocas genéticas (Zingales et al., 2009). Todavia, urge estabelecer uma estratégia padrão de genotipagem para a identificação dos DTUs, que seja simples, sensível e reproduzível em qualquer laboratório, para que não apenas a nomenclatura, mas também a forma de classificar as cepas seja padronizada e adotada entre os diferentes grupos de pesquisa.

Já em 2009, nosso grupo de pesquisa propôs um protocolo simples de tipagem baseado na amplificação por PCR de três marcadores moleculares polimórficos: COII, rDNA 24Sα e ITS do minixon (D'Avila et al., 2009). Posteriormente, foi feita uma adaptação dessa técnica de forma que todas estas etapas de PCR convencional foram transformadas em *nested* PCR, otimizando a amplificação do DNA de *T. cruzi* diretamente das amostras clínicas dos pacientes, mesmo quando este DNA estava presente em pequenas quantidades, como nos casos dos pacientes com doença de Chagas crônica (Revisado por Macedo and Segatto, 2010 - **PUBLICAÇÃO 1**). Neste presente trabalho, nós demonstramos a aplicação dessa metodologia em um grande número de amostras obtidas de pacientes chagásicos crônicos submetidos ao transplante cardíaco, tanto a partir de amostras frescas quanto amostras fixadas e parafinadas (Segatto et al., artigo em preparação).

Uma das questões ainda em debate para o *T. cruzi* é a sua estrutura populacional e a possibilidade de reprodução sexuada. Já está comprovado experimentalmente que o *T. cruzi* é capaz de troca genética (Gaunt et al., 2003; Ramirez et al., 2012). Contudo, a frequência e os mecanismos de troca genética em populações naturais deste parasito ainda não são compreendidos. Em colaboração com o trabalho de doutorado de outro estudante do programa de pós-graduação em Bioinformática da UFMG, a partir de diferentes marcadores nucleares e mitocondriais e utilizando métodos de estatística populacional, tivemos a oportunidade de analisar dois grupos de cepas da linhagem TcII: um constituído de isolados de diferentes regiões geográficas da América Latina e outro constituído exclusivamente de isolados provenientes de Minas Gerais.

Nesse estudo, verificamos a ocorrência de desvios de LD e HW quando foi analisado o grupo de isolados de *T. cruzi* de distantes regiões geográficas, o que tem sido interpretado na literatura como indicativo de reprodução predominantemente clonal (Tibayrenc et al., 1991). No entanto, este cenário foi completamente modificado quando analisamos apenas *T. cruzi*

circulantes em uma pequena área geográfica (MG). Neste último caso, os equilíbrios de ligação e HW foram restaurados, indicando que as distâncias geográficas e barreiras físicas podem ser fatores importantes na redução de oportunidades para a reprodução sexual e, desse modo, das taxas de recombinação entre os isolados de *T. cruzi*.

De fato, nossos resultados foram consistentes com subestruturação da população de parasitos levando ao conhecido efeito Wahlund (um fenômeno comum observado quando os indivíduos de uma população são derivados de subpopulações geneticamente segregadas) (Wahlund, 1928). Segundo nossos achados, os desequilíbrios dos marcadores genéticos observados anteriormente entre indivíduos de subpopulações distintas contribuíram para a subestimativa da ocorrência de sexo e recombinação em *T. cruzi*. Isso é particularmente relevante, pois a maioria, se não todos, dos estudos anteriores analisou cepas isoladas de regiões geográficas remotas.

A estratégia escolhida neste presente estudo, de análise de cepas de *T. cruzi* isoladas da mesma localidade (MG) e da mesma linhagem (TcII) para investigar a extensão da recombinação e segregação aleatória de alelos entre os parasitos, sugere que as trocas genéticas entre esta linhagem são mais frequentes do que inicialmente esperado (Baptista, D'Ávila, Segatto et al., 2013 - **PUBLICAÇÃO 2**).

Ainda sobre as questões da estrutura populacional, no presente trabalho, nós investigamos a constituição multiclonal de populações do *T. cruzi*. Evidências indiretas sugerem que pelo menos parte das populações desse parasito é multiclonal. Isto está de acordo com a expectativa teórica, já que os pacientes em áreas endêmicas são infectados por múltiplos contatos com triatomíneos diferentes e estes, por sua vez, podem alimentar-se de diferentes indivíduos infectados. As populações putativas multiclonais são usualmente identificadas com base na identificação de mais de dois alelos para diferentes marcadores (Oliveira et al., 1998; Macedo et al., 2004; Valadares et al., 2008). Todavia, se as populações identificadas com mais de dois alelos por loco são realmente multiclonais permanecia controverso, porque não era possível excluir a possibilidade de aneuploidia para os marcadores (Oliveira et al., 1998; Valadares et al., 2008; Gaunt et al., 2003; Lewis et al., 2009). A estratégia convencional de análise, que é a identificação de clones constituintes de uma suposta população multiclonal é bastante limitada porque os métodos usuais de clonagem (micromanipulação, diluição limitante ou clonagem em placas de ágar sangue) exigem a seleção e crescimento dos clones

isolados em meios de cultura, o que pode favorecer indivíduos em maior quantidade na população inicial ou que apresentam maiores taxas de crescimento (Dvorak et al., 1982; Pinto et al., 1998; Postan et al., 1984).

Neste trabalho apresentamos uma abordagem inovadora, adaptada a partir de um método originalmente descrito para a genotipagem de espermatozoides únicos, para separar parasitos individuais, utilizando o método de triagem FACS Vantage, seguido da genotipagem de células únicas. Em colaboração aos trabalhos iniciados por dois então alunos de doutorado do nosso grupo, e utilizando essa metodologia confirmamos que três cepas naturais de *T. cruzi* são verdadeiramente multiclonais, duas isoladas de humano e uma de vetor. Resultados muito interessantes foram observados, por exemplo, com a cepa isolada de Berenice, a primeira paciente de Carlos Chagas infectada com *T. cruzi*. Grande controvérsia permanecia se Berenice havia sido infectada com uma cepa multiclinal. Isto porque duas populações diferentes, mas aparentemente monoclonais (Be-62 e Be-78), foram isoladas a partir dela (Cruz et al., 2006). A observação de que Be-78 teria alterado suas características bioquímicas e moleculares após passagens em cães e ratos reforçou esta possibilidade, sugerindo que a passagem em hospedeiros diferentes poderia ter favorecido o crescimento de subpopulações anteriormente indetectáveis dentro da cepa original. Assim, neste trabalho demonstramos que Be-78 1B e Be-78 25B (duas das subpopulações de *T. cruzi* derivadas a partir de um cão infectado com a cepa Be-78 após uma ou 25 passagens sucessivas em camundongos) eram constituídas por pelo menos três clones distintos: um compatível com Be-62, outro equivalente à cepa Be-78 e um terceiro nunca antes identificado. O provável motivo desses clones não terem sido observados anteriormente na cepa parental é que quando alelos de subpopulações menos representativas são inferiores a 15% na mistura artificial de DNA, eles não podem ser detectados por PCR convencional (nossos dados não publicados). Assim, utilizando a estratégia aqui proposta para separação e genotipagem de células individuais de *T. cruzi*, fomos capazes de revelar a diversidade intrapopulacional em um grau não alcançado anteriormente por métodos convencionais, o que pode representar uma ferramenta nova e poderosa para a compreensão da estrutura e dinâmica populacional de *T. cruzi* (Valadares, Pimenta, Segatto et al., 2011-**PUBLICAÇÃO 3**).

Além do desenvolvimento ou otimização de metodologias para caracterização do *T. cruzi*, neste trabalho, nós aliamos a aplicação destas técnicas ao estudo da doença de Chagas cardíaca crônica, especialmente aqueles submetidos a transplante.

Como já mencionado, o curso clínico da doença de Chagas é bastante variável, incluindo desde casos assintomáticos até casos crônicos graves com envolvimento cardiovascular e/ou gastrointestinal. A cardiomiopatia chagásica representa uma das principais causas de miocardite no mundo (Feldman and Mac Namara, 2000; WHO, 2002), e é a forma mais grave e debilitante da doença de Chagas, com altos índices de morbidade e mortalidade (Rassi et al., 2010). Todavia, ainda permanece inexplicável porque alguns pacientes evoluem para esta forma da doença. Fatores associados ao hospedeiro e à diversidade genética de populações do *T. cruzi* são aventados (Andrade et al., 1999; 2002; Gomes et al., 2003; Macedo et al., 2004; Macedo and Pena, 1998; Miles et al., 1977).

Para a fase final da insuficiência cardíaca o transplante de coração ainda é um dos poucos tratamentos disponíveis, mesmo considerando complicações potencialmente fatais decorrentes da imunossupressão e conseqüentemente da reativação da infecção pelo *T. cruzi* (Bacal et al., 2010; Bocchi et al., 1996). Nesse aspecto, o Brasil tem ocupado cada vez mais espaço na América Latina, como país referência no transplante cardíaco na doença de Chagas, guiando condutas que são incorporadas no mundo todo (Bacal et al., 2010).

Minas Gerais é considerado um dos estados brasileiros com maior prevalência da endemia chagásica e das formas graves cardíaca da doença (Coura and Borges-Pereira, 2011). O HC/UFMG se tornou um centro de referência em transplantes cardíacos e desde 2006 já foram realizados mais de 120 cirurgias, sendo 50% destas por etiologia chagásica. No presente trabalho tivemos a oportunidade de analisar 430 amostras derivadas de coração explantados, biópsias cardíacas de acompanhamento, pele e tecido adiposo de 42 pacientes chagásicos submetidos ao transplante. Como inicialmente esperado, TcII foi a principal DTU associada com doença de Chagas cardíaca grave e a reativação em Minas Gerais. Todavia detectamos, em diferentes proporções, a presença de TcVI, TcV ou VI e uma mistura TcII + TcVI para alguns destes pacientes, representando este último o primeiro caso de *T. cruzi* detectado em tecido adiposo de humano (Ferreira, Segatto et al., 2011 - **PUBLICAÇÃO 4**). Mas o resultado mais intrigante foi o encontro de TcI em três amostras de explantes provenientes de dois pacientes.

Até o momento, apenas um caso clínico cardíaco associado a este DTU havia sido publicado no Brasil (Teixeira et al., 2006).

Uma das técnicas utilizadas neste presente trabalho para o estudo da variabilidade genética de *T. cruzi* foi a LSSP-PCR. Muitos pesquisadores já utilizaram a técnica com esta finalidade. Mas após um levantamento da literatura observamos que iniciadores diferentes estavam sendo utilizados nas análises de kDNA de *T. cruzi*, embora publicados com nomes semelhantes ou citados com a mesma referência. Com o objetivo de se avaliar o impacto da sequência do iniciador sobre os perfis obtidos por LSSP-PCR, nós listamos as sequências dos iniciadores e as referências citadas por vários grupos de pesquisa relacionados a análises de kDNA de *T. cruzi* por LSSP-PCR. Nós comparamos as assinaturas de kDNA de três cepas de referência de *T. cruzi* obtidas por LSSP-PCR, usando oito iniciadores diferentes. Os resultados confirmaram a reprodutibilidade da técnica LSSP-PCR, mas mostraram claramente que mesmo pequenas modificações na sequência de oligonucleotídeos podem alterar significativamente a assinatura de kDNA de uma cepa, especialmente se localizadas nas regiões 5'e 3' dos iniciadores (Segatto et al., 2013 - **PUBLICAÇÃO 5**). Neste manuscrito, nós demonstramos a importância da sequência de iniciador na realização de uma PCR em baixa estringência, como o LSSP-PCR. Isto é relevante porque artigos publicados estão disponíveis para serem reproduzidos e se a sequência do iniciador não é fiel, comparações de resultados interlaboratoriais não são possíveis. Nos casos em que as sequências de oligonucleotídeos são intencionalmente alteradas, o nome do *primer* deve também ser alterado ou referenciado ao nome original explicitando a presença de modificações. Isso seria de grande utilidade para todos os laboratórios que trabalham com assinaturas kDNA, evitando confusões e melhorando a comparação interlaboratorial dos padrões de LSSP-PCR.

No trabalho com pacientes transplantados, a análise da diversidade intralinhagens dos parasitos foi realizada utilizando-se os perfis de assinaturas de kDNA que revelaram distintas subpopulações de *T. cruzi* infectando diferentes pacientes, em diferentes tecidos de um mesmo paciente e até mesmo em diferentes secções de um mesmo explante, confirmando o tropismo diferencial de clones de *T. cruzi*. Como perspectiva, pretendemos futuramente correlacionar o tropismo tecidual de populações de *T. cruzi* no tecido cardíaco explantado identificadas por PCR com regiões mais e menos acometidas do órgão de acordo com os achados histopatológicos.

O sucesso do transplante depende basicamente da não rejeição do coração transplantado e da não reativação da infecção pelo *T. cruzi*. Cerca de 50% dos pacientes chagásicos transplantados no HC da UFMG reativam clinicamente a doença de Chagas em diferentes períodos após o transplante. Um fator complicador deste cenário tem sido o diagnóstico diferencial dos achados histopatológicos de rejeição celular do implante e de reativação da infecção chagásica, especialmente quando a reação leucocitária é moderada ou intensa, ou quando os ninhos do parasito não podem ser identificados pela análise morfológica. Desta forma, a obtenção de um diagnóstico molecular diferencial seria um forte aliado para a rápida definição da existência ou não de reativação e a prescrição do correto tratamento.

Neste trabalho, nós demonstramos que a PCR dirigida para dois alvos - um mitocondrial (regiões variáveis do minicírculo) e outro nuclear (região 3' do gene rDNA 24 S α) é uma boa estratégia para o diagnóstico precoce da reativação doença de Chagas com potencial para ajudar os médicos nas decisões de tratamento antes do estabelecimento da reativação. Ao contrário dos achados histopatológicos convencionais, nossos dados preliminares indicam uma razoável correlação entre a data da reativação clínica e a data das primeiras biópsias positivas pela PCR. Quanto mais cedo se deu a reativação clínica, mais precoce a positividade da PCR foi encontrada nas biópsias. Estes achados são muito promissores e pretendemos estendê-los, a um número maior de pacientes e amostras para confirmar a utilidade clínica destes resultados.

Outro questionamento frequente é se o paciente receptor chagásico com doença cardíaca deve receber tratamento antiparasitário pré ou pós-operatório como uma medida profilática à reativação. Ainda não há consenso sobre este tema, mas para muitos especialistas o tratamento profilático não seria recomendável pois, além de ser improvável a erradicação do parasito na fase crônica da doença, os efeitos colaterais poderiam tornar inelegível o potencial receptor para o transplante (Bocchi et al., 1996). O protocolo atual de tratamento do HC da UFMG preconiza que somente após a detecção direta do parasito na amostra suspeita de reativação se inicie a medicação específica. Ocorre que a detecção direta do parasito nas biópsias de acompanhamento é rara e frequentemente o paciente reativa clinicamente a doença antes de detectada laboratorialmente a reativação da infecção. Assim a introdução do tratamento com benzonidazol é frequentemente tardia. Todavia, nossos resultados de PCR têm se mostrado potencialmente úteis para auxiliar os médicos nas decisões de tratamento em casos de dúvida sobre os quadros de reativação ou não da doença de Chagas. Nossa

perspectiva é de investigar se a introdução precoce do tratamento com benzonidazol nos pacientes transplantados contribuiria para a redução do número de pacientes com reativação da doença e se a metodologia aqui apresentada poderia contribuir para a decisão do melhor momento para a introdução do tratamento. Outra perspectiva interessante seria estimar a quantidade de *T. cruzi* presente nos tecidos dos pacientes pela técnica de PCR em tempo real como um indicador da eficácia terapêutica.

Concluindo, o presente trabalho certamente trouxe relevantes contribuições para os campos da estrutura populacional de *T. cruzi* e da epidemiologia molecular e diagnóstico da infecção crônica cardíaca. Todavia, como já mencionado, novas descobertas são inexoravelmente acompanhadas de novos desafios. Resta-nos determinar se nossos achados, de fato, contribuirão para uma mudança significativa no protocolo de acompanhamento e tratamento dos pacientes chagásicos transplantados e assim melhorar a qualidade de vida dos mesmos.

CAPÍTULO 7 - Referências Bibliográficas

- Aanensen, D. M. and B. G. Spratt (2005). "The multilocus sequence typing network: mlst.net." *Nucleic Acids Res* 33(Web Server issue): W728-733.
- Adad, S. J., D. C. Andrade, E. R. Lopes and E. Chapadeiro (1991). "[Pathological anatomy of chagasic megaesophagus]." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 33(6): 443-450.
- Andrade, L. O., L. M. Galvao, N. Meirelles Mde, E. Chiari, S. D. Pena, et al. (2010). "Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(6): 834-837.
- Andrade, L. O., C. R. Machado, E. Chiari, S. D. Pena and A. M. Macedo (1999). "Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice." *Mol Biochem Parasitol* 100(2): 163-172.
- Andrade, L. O., C. R. Machado, E. Chiari, S. D. Pena and A. M. Macedo (2002). "*Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations." *Exp Parasitol* 100(4): 269-275.
- Andrade, S. G. (1974). "Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano: contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio." *Rev Pat Trop* 3: 65-121.
- Andrade, S. G., V. Andrade, C. Brodskyn, J. B. Magalhaes and M. B. Netto (1985). "Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*." *Ann Trop Med Parasitol* 79(4): 397-407.
- Andrade, S. G. and J. B. Magalhaes (1996). "Biodemes and zymodemes of *T. cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology." *Rev S. Bras Med Trop* 30: 27-35.
- Andrade, Z. A. (2000). "Fisiopatogenia da doença de Chagas." *Rev de Pat Trop* 29: 131-140.
- Andrade, Z. A. and S. G. Andrade (1955). "[Pathogenesis of Chagas' chronic myocarditis; importance of ischemic lesions]." *Arq Bras Med* 45(7-8): 279-288.
- Andrade, Z. A. and E. A. Lopes (1963). "A Histochemical Study of Experimental Chagas' Disease." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 5: 236-242.
- Anez, N., G. Crisante, F. M. da Silva, A. Rojas, H. Carrasco, et al. (2004). "Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease." *Trop Med Int Health* 9(12): 1319-1326.
- Anonymous (1999). "Recommendations from a satellite meeting." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1: 429-432.
- Anonymous, 2002. "Adult heart transplantation. Protocol Revised: June 2002". Loma Linda University Medical Center, Loma Linda (CA).
- Apt, W., I. Zulantay, A. Solari, S. Ortiz, D. Oddo, et al. (2010). "Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Province of Choapa, IV Region, Chile: Preliminary Report (2005-2008)." *Biol Res* 43(3): 269-274.
- Atias, A. (1969). "Enfermedad de Chagas digestiva en Chile." *Bol. Chileno Parasitol.* 24: 70-74.
- Augusto-Pinto, L., S. M. Teixeira, S. D. Pena and C. R. Machado (2003). "Single-nucleotide polymorphisms of the *T. cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency." *Genetics* 164(1): 117-126.
- Avila, H., A. M. Goncalves, N. S. Nehme, C. M. Morel and L. Simpson (1990). "Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences." *Mol Biochem Parasitol* 42(2): 175-187.
- Aziz, T., M. Burgess, R. Khafagy, A. Wynn Hann, C. Campbell, et al. (1999). "Bicaval and standard techniques in orthotopic heart transplantation: medium-term experience in cardiac performance and survival." *J Thorac Cardiovasc Surg* 118(1): 115-122.
- Bacal, F., J. D. Neto, A. I. Fiorelli, J. Mejia, F. G. Marcondes-Braga, et al. (2010). "[II Brazilian Guidelines for Cardiac Transplantation]." *Arq Bras Cardiol* 94(1 Suppl): e16-76.

- Bacal, F., C. P. Silva, E. A. Bocchi, P. V. Pires, L. F. Moreira, et al. (2005). "Mycophenolate mofetil increased chagas disease reactivation in heart transplanted patients: comparison between two different protocols." *Am J Transplant* 5(8): 2017-2021.
- Bacal, F., J. D. Souza-Neto, A. I. Fiorelli, J. Mejia, F. G. Marcondes-Braga, et al. (2009). "II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco." *Arq Bras Cardiol*. 94(supl.1): e16-e73.
- Bahia, M. T., I. M. de Andrade, T. A. Martins, A. F. do Nascimento, F. Diniz Lde, et al. (2012). "Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease." *PLoS NTD* 6(11): e1870.
- Barnabe, C., S. Brisse and M. Tibayrenc (2000). "Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach." *Parasitology* 120 (Pt 5): 513-526.
- Barona-Vilar, C., M. J. Gimenez-Marti, T. Fraile, C. Gonzalez-Steinbauer, C. Parada, et al. (2012). "Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant Latin American women and congenital transmission rate in a non-endemic area: the experience of the Valencian Health Programme (Spain)." *Epidemiol Infect* 140(10): 1896-1903.
- Barretto, A. C. and B. M. Ianni (1995). "The undetermined form of Chagas' heart disease: concept and forensic implications." *Sao Paulo Med J* 113(2): 797-801.
- Basquiera, A. L., A. Sembaj, A. M. Aguerri, M. Omelianiuk, S. Guzman, et al. (2003). "Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction." *Heart* 89(10): 1186-1190.
- Bellotti, G., E. A. Bocchi, A. V. de Moraes, M. L. Higuchi, M. Barbero-Marcial, et al. (1996). "In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease." *Am Heart J* 131(2): 301-307.
- Benvenuti, L. A., A. Roggerio, G. Coelho and A. I. Fiorelli (2011). "Usefulness of qualitative polymerase chain reaction for *Trypanosoma cruzi* DNA in endomyocardial biopsy specimens of chagasic heart transplant patients." *J Heart Lung Transplant* 30(7): 799-804.
- Benvenuti, L. A., A. Roggerio, N. V. Sambiasi, A. Fiorelli and L. Higuchi Mde (2005). "Polymerase chain reaction in endomyocardial biopsies for monitoring reactivation of Chagas' disease in heart transplantation: a case report and review of the literature." *Card Pathol* 14(5): 265-68.
- Bestetti, R. B., O. Castilho, L. Teno and O. Freitas (1994). "Absence of *Trypanosoma cruzi* myocardial infection reactivation in Chagas' heart transplant." *Cardiovasc Pathol*. 3: 257-259.
- Bestetti, R. B., O. C. Freitas, G. Muccillo and J. S. Oliveira (1993). "Clinical and morphological characteristics associated with sudden cardiac death in patients with Chagas' disease." *Eur Heart J* 14(12): 1610-1614.
- Bestetti, R. B. and G. Muccillo (1997). "Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy." *Int J Cardiol* 60(2): 187-193.
- Bestetti, R. B., T. R. Souza, M. F. Lima, T. A. Theodoropoulos, J. A. Cordeiro, et al. (2007). "Effects of a mycophenolate mofetil-based immunosuppressive regimen in Chagas' heart transplant recipients." *Transplantation* 84(3): 441-442.
- Bocchi, E. A., G. Bellotti, A. O. Mocelin, D. Uip, F. Bacal, et al. (1996). "Heart transplantation for chronic Chagas' heart disease." *Ann Thorac Surg* 61(6): 1727-1733.
- Bocchi, E. A., F. G. Braga, S. M. Ferreira, L. E. Rohde, W. A. Oliveira, et al. (2009). "[III Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure]." *Arq Bras Cardiol* 93(1 Suppl 1): 3-70.
- Bocchi, E. A. and A. Fiorelli (2001a). "The Brazilian experience with heart transplantation: a multicenter report." *J Heart Lung Transplant* 20(6): 637-645.
- Bocchi, E. A. and A. Fiorelli (2001b). "The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. First Guidelines Group for Heart Transplantation of the Brazilian Society of Cardiology." *Ann Thorac Surg* 71(6): 1833-1838.

- Bogliolo, A. R., L. Lauria-Pires and W. C. Gibson (1996). "Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination." *Acta Trop* 61(1): 31-40.
- Borst, P. (1986). "Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes." *Annu Rev Biochem* 55: 701-732.
- Bosseno, M. F., C. Barnabe, E. Magallon Gastelum, F. Lozano Kasten, J. Ramsey, et al. (2002). "Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico." *J Clin Microbiol* 40(2): 627-632.
- Bougnoux, M. E., A. Tavanti, C. Bouchier, N. A. Gow, A. Magnier, et al. (2003). "Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*." *J Clin Microbiol* 41(11): 5265-5266.
- Brasil, M. d. S. (2005). "Consenso Brasileiro em Doença de Chagas." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* Vol. 38(III).
- Brasil, P. E., L. De Castro, A. M. Hasslocher-Moreno, L. H. Sangenis and J. U. Braga (2010). "ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis." *BMC Infect Dis* 10: 337.
- Brener, Z. (1980). "Immunity to *Trypanosoma cruzi*." *Adv Parasitol* 18: 247-292.
- Briones, M. R., R. P. Souto, B. S. Stolf and B. Zingales (1999). "The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity." *Mol Biochem Parasitol* 104(2): 219-232.
- Brisse, S., C. Barnabe and M. Tibayrenc (2000). "Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis." *Int J Parasitol* 30(1): 35-44.
- Brisse, S., J. Henriksson, C. Barnabe, E. J. Douzery, D. Berkvens, et al. (2003). "Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype." *Infect Genet Evol* 2(3): 173-183.
- Brisse, S., J. Verhoef and M. Tibayrenc (2001). "Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages." *Int J Parasitol* 31(11): 1218-1226.
- Burgos, J. M., J. Altcheh, M. Bisio, T. Duffy, H. M. Valadares, et al. (2007). "Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease." *Int J Parasitol* 37(12): 1319-1327.
- Burgos, J. M., S. Begher, H. M. Silva, M. Bisio, T. Duffy, et al. (2008). "Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS." *Am J Trop Med Hyg* 78(2): 294-297.
- Burgos, J. M., S. B. Begher, J. M. Freitas, M. Bisio, T. Duffy, et al. (2005). "Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS." *Am J Trop Med Hyg* 73(6): 1016-1018.
- Burgos, J. M., M. Diez, C. Vigliano, M. Bisio, M. Risso, et al. (2010a). "Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation." *Clin Infect Dis* 51(5): 485-495.
- Burgos, J. M., M. Diez, C. Vigliano, M. Bisio, R. Risso, et al. (2010b). "Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation." *Clinical Infectious Diseases* 51(5): 485-495.
- Buscaglia, C. A. and J. M. Di Noia (2003). "*Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease." *Microbes Infect* 5(5): 419-427.
- Câmara, A. C. J., A. A. Varela-Freire, H. M. Valadares, A. Macedo, D. A. D'Ávila, et al. (2010). "Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil." *Acta Tropica*.

- Campbell, D. A., S. J. Westenberger and N. R. Sturm (2004). "The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics." *Curr Mol Med* 4(6): 549-562.
- Cardinal, M. V., M. A. Lauricella, L. A. Ceballos, L. Lanati, P. L. Marcet, et al. (2008). "Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina." *Int J Parasitol*.
- Cardiologia, S. B. d. (1999). "I Diretriz para transplante cardíaco." *Arq Bras Cardiol*. 73(s5): 1-55.
- Carneiro, M., E. Chiari, A. M. Goncalves, A. A. da Silva Pereira, C. M. Morel, et al. (1990). "Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice." *Acta Trop* 47(1): 35-45.
- Carod-Artal, F. J., A. P. Vargas, T. A. Horan and L. G. Nunes (2005). "Chagasic cardiomyopathy is independently associated with ischemic stroke in Chagas disease." *Stroke* 36(5): 965-970.
- Carranza, J. C., H. M. Valadares, D. A. D'Avila, R. P. Baptista, M. Moreno, et al. (2009). "*Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil." *Int J Parasitol* 39(9):963-73.
- Carrasco, H. J., I. A. Frame, S. A. Valente and M. A. Miles (1996). "Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*." *Am J Trop Med Hyg* 54(4): 418-424.
- Castro, A. M., A. O. Luquetti, A. Rassi, G. G. Rassi, E. Chiari, et al. (2002). "Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*." *Parasitol Res* 88(10): 894-900.
- Cavazzana, M., Jr., A. Marcili, L. Lima, F. M. da Silva, A. C. Junqueira, et al. (2010). "Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats." *Int J Parasitol* 40(3): 345-355.
- Chaccur, P., J. Dinkhuysen, V. Nina, C. Abdulmassih, A. Arnoni, et al. (1997). "Transplante cardíaco ortotópico pela técnica bicaval." *Rev Bras Cir Cardiovasc* 12(2): 145-152.
- Chagas, C. (1909). "Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-152.
- Chagas, C. (1911). "Nova entidade morbida do homem: resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. ." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 3: 219-275.
- Chapman, M. D., R. C. Baggaley, P. F. Godfrey-Fausset, T. J. Malpas, G. White, et al. (1984). "*Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya." *J Protozool* 31(3): 482-486.
- Clark, C. G. and O. J. Pung (1994). "Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America." *Mol Biochem Parasitol* 66(1): 175-179.
- Combs, T. P., Nagajyothi, S. Mukherjee, C. J. de Almeida, L. A. Jelicks, et al. (2005). "The adipocyte as an important target cell for *T. cruzi* infection." *J Biol Chem* 280(25): 24085-94.
- Cordova, E., E. Maiolo, M. Corti and T. Orduna (2010). "Neurological manifestations of Chagas' disease." *Neurol Res* 32(3): 238-244.
- Corrales, R. M., M. C. Mora, O. S. Negrette, P. Diosque, D. Lacunza, et al. (2009). "Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina." *Infect Genet Evol* 9(2): 278-282.
- Coura, J. R. (2006). "[Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]." *Rev Soc Bras Med Trop* 39 Suppl 3: 113-117.
- Coura, J. R., N. Anunziato and H. P. Willcox (1983a). "[Chagas' disease morbidity. I - Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro]." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78(3): 363-372.

- Coura, J. R. and J. Borges-Pereira (2011). "Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(6): 641-645.
- Coura, J. R., M. J. Conceicao, A. P. de Menezes, M. L. dos Santos and M. Z. de Mendonca (1983b). "[Morbidity of schistosomiasis mansoni in Brazil. II. - Study in 4 field areas in the States of Minas Gerais, Sergipe and Paraiba]." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78(1): 1-11.
- Coura, J. R. and S. L. De Castro (2002). "A critical review on Chagas disease chemotherapy." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24.
- Coura, J. R. and J. C. Dias (2009). "Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 31-40.
- Coura, J. R., A. C. Junqueira, O. Fernandes, S. A. Valente and M. A. Miles (2002). "Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil." *Trends Parasitol* 18(4): 171-176.
- Cruz, R. E., A. M. Macedo, C. Barnabe, J. M. Freitas, E. Chiari, et al. (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(3): 239-246.
- Cuervo, P., E. Cupolillo, I. Segura, N. Saravia and O. Fernandes (2002). "Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(6): 877-880.
- Cunha-Neto, E. and J. Kalil (1995). "Autoimmunity in Chagas' heart disease." *Sao Paulo Med J* 113(2): 757-766.
- Cura, C. I., A. M. Mejia-Jaramillo, T. Duffy, J. M. Burgos, M. Rodriguero, et al. (2010). "Trypanosoma cruzi I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes." *Int J Parasitol* 40(14): 1599-1607.
- D'Avila, D. A., A. M. Macedo, H. M. Valadares, E. D. Gontijo, A. M. de Castro, et al. (2009). "Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients." *J Clin Microbiol* 47(6): 1718-1725.
- da Silveira, A. B., E. M. Lemos, S. J. Adad, R. Correa-Oliveira, J. B. Furness, et al. (2007). "Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells." *Hum Pathol* 38(8): 1256-1264.
- De Araujo, S. M. and E. Chiari (1988). "[Biological characterization of clones of the Y, CL and MR strains of *Trypanosoma cruzi* in inbred C3H mice]." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83(2): 175-181.
- de Freitas, J. M., L. Augusto-Pinto, J. R. Pimenta, L. Bastos-Rodrigues, V. F. Goncalves, et al. (2006). "Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*." *PLoS Pathog* 2(3): e24.
- Deane, M. P., R. H. Mangia, N. M. Pereira, H. Momen, A. M. Goncalves, et al. (1984). "Trypanosoma cruzi: strain selection by different schedules of mouse passage of an initially mixed infection." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79(4): 495-497.
- Degrave, W., S. P. Fragoso, C. Britto, H. van Heuverswyn, G. Z. Kidane, et al. (1988). "Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*." *Mol Biochem Parasitol* 27(1): 63-70.
- Desruisseaux, M. S., Nagajyothi, M. E. Trujillo, H. B. Tanowitz and P. E. Scherer (2007). "Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease." *Infect Immun* 75(3): 1066-1078.
- Di Noia, J. M., C. A. Buscaglia, C. R. De Marchi, I. C. Almeida and A. C. Frasch (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): 401-413.
- Dias, J. C. (1989). "The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review." *Rev Soc Bras Med Trop* 22(3): 147-156.

- Dias, J. C. and K. Kloetzel (1968). "The prognostic value of the electrocardiographic features of chronic Chagas' disease." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 10: 151–162.
- Dias, J. C. P., 1990. *Doença de Chagas: clínica e terapêutica*. . Ministério da Saúde, Brasília.
- Dias, J. C. P., 1992. Epidemiology of Chagas disease. In *Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*, International Society of Blood Transfusion Brazil. International Society of Blood Transfusion Brazil, pp. 49-80.
- Dias, J. C. P. (2001). "Chagas disease, environment, participation and the state. ." *Cad. Saúde Pública*. vol.17 suppl. .
- Dias, J. P., C. Bastos, E. Araujo, A. V. Mascarenhas, E. Martins Netto, et al. (2008). "Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission." *Rev Soc Bras Med Trop* 41(3): 296-300.
- Dias Neto, E., M. Steindel, L. K. Passos, C. P. de Souza, D. Rollinson, et al. (1993). "The use of RAPDs for the study of the genetic diversity of *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma cruzi*." *EXS* 67: 339-345.
- Diaz, C., V. Nussenzweig and A. Gonzalez (1992). "An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood." *Am J Trop Med Hyg* 46(5): 616-623.
- Dickstein, K., A. Cohen-Solal, G. Filippatos, J. J. McMurray, P. Ponikowski, et al. (2008). "ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)." *Eur J Heart Fail* 10(10): 933-989.
- Diez, M., L. Favaloro, A. Bertolotti, J. M. Burgos, C. Vigliano, et al. (2007). "Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation." *Am J Transplant* 7(6): 1633-1640.
- Diniz, L. F., I. S. Caldas, P. M. Guedes, G. Crepalde, M. Lana, et al. (2010). "Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. ." *Antimicrob Agents Chemother* . 54: 2979–2986.
- Diosque, P., C. Barnabe, A. M. Padilla, J. D. Marco, R. M. Cardozo, et al. (2003). "Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina." *Int J Parasitol* 33(10): 997-1003.
- Dobarro, D., C. Gomez-Rubin, A. Sanchez-Recalde, F. Olias, M. Bret-Zurita, et al. (2008). "Chagas' heart disease in Europe: an emergent disease?" *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 9(12): 1263-1267.
- Duffy, T., M. Bisio, J. Altcheh, J. M. Burgos, M. Diez, et al. (2009). "Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients." *PLoS Negl Trop Dis* 3(4): e419.
- Dvorak, J. A., T. E. Hall, M. S. Crane, J. C. Engel, J. P. McDaniel, et al. (1982). "Trypanosoma cruzi: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence." *J Protozool* 29(3): 430-437.
- Enright, M. C., B. G. Spratt, A. Kalia, J. H. Cross and D. E. Bessen (2001). "Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone." *Infect Immun* 69(4): 2416-2427.
- Falla, A., C. Herrera, A. Fajardo, M. Montilla, G. A. Vallejo, et al. (2009). "Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans." *Acta Trop* 110(1): 15-21.
- Feldman, A. M. and D. Mac Namara (2000). "Myocarditis." *N Engl J Med* 343: 11.

- Fernandes, O., R. H. Mangia, C. V. Lisboa, A. P. Pinho, C. M. Morel, et al. (1999). "The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene." *Parasitology* 118 (Pt 2): 161-166.
- Fernandes, O., S. S. Santos, E. Cupolillo, B. Mendonca, R. Derre, et al. (2001). "A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(1): 97-99.
- Fernandes, O., R. P. Souto, J. A. Castro, J. B. Pereira, N. C. Fernandes, 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.
- Ferreira, A. V., M. Segatto, Z. Menezes, A. M. Macedo, C. Gelape, et al. (2011). "Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease." *Microbes Infect* 13(12-13): 1002-1005.
- Ferreira, A. W. and S. D. de Avila (1995). "Laboratory diagnosis of Chagas' heart disease. ." *Rev Paul Med* 113: 767-771.
- Filardi, L. S. and Z. Brener (1987). "Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81(5): 755-759.
- Fiorelli, A. I., R. H. Santos, J. L. Oliveira, Jr., D. D. Lourenco-Filho, R. R. Dias, et al. (2011). "Heart transplantation in 107 cases of Chagas' disease." *Transplant Proc* 43(1): 220-224.
- Fiorelli, A. I., N. A. Stolf, R. Honorato, E. Bocchi, F. Bacal, et al. (2005). "Later evolution after cardiac transplantation in Chagas' disease." *Transplant Proc* 37(6): 2793-2798.
- Fleiss, J. L., 1981. *Statistical methods for rates and proportions*, 2nd ed. John Wiley, New York.
- Forni, A., G. Faggian, B. Chiominto, G. Perini, P. Bertolini, et al. (1995). "Avoidance of atrioventricular valve incompetence following orthotopic heart transplantation using direct bicaval anastomosis." *Transplant Proc* 27(6): 3478-3482.
- Freitas, J. M., E. Lages-Silva, E. Crema, S. D. Pena and A. M. Macedo (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): 411-417.
- Galvao, L. M., E. Chiari, A. M. Macedo, A. O. Luquetti, S. A. Silva, et al. (2003). "PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy." *J Clin Microbiol* 41(11): 5066-5070.
- Gaunt, M. W., M. Yeo, I. A. Frame, J. R. Stothard, H. J. Carrasco, et al. (2003). "Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes." *Nature* 421(6926): 936-939.
- Gomes, M. A., E. F. Silva, A. M. Macedo, A. R. Vago and M. N. Melo (1997). "LSSP-PCR for characterization of strains of *E. histolytica* isolated in Brazil." *Parasitology* 114 (Pt 6): 517-20.
- Gomes, M. L., M. J. Toledo, C. V. Nakamura, L. Bittencourt Nde, E. Chiari, et al. (2003). "*Trypanosoma cruzi*: genetic group with peculiar biochemical and biological behavior." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(5): 649-654.
- Gomes, Y. M., V. M. Lorena and A. O. Luquetti (2009). "Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?" *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 115-121.
- Gonzalez-Tome, M. I., M. Rivera, I. Camano, F. Norman, M. Flores-Chavez, et al. (2013). "[Recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of the pregnant woman and child with Chagas disease.]." *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
- Gonzalez, A., E. Prediger, M. E. Huecas, N. Nogueira and P. M. Lizardi (1984). "Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(11): 3356-3360.

- Guevara, J. F., R. Bladón, C. M. Johnson, O. Souza and I. Leandro (1977). "Aspectos clínicos, anatomo-patológicos y terapêuticos de la enfermedad de Chagas em Panamá. ." *Arq. Bras. Cardiol.* 30: 200-211.
- Hamilton, P. B., E. R. Adams, F. Njiokou, W. C. Gibson, G. Cuny, et al. (2009). "Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals." *Infect Genet Evol* 9(1): 81-86.
- Hamilton, P. B., M. D. Lewis, C. Cruickshank, M. W. Gaunt, M. Yeo, et al. (2011). "Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding." *Infect Genet Evol* 11(1): 44-51.
- Hamilton, P. B. and J. R. Stevens (2011). "Resolving relationships between Australian trypanosomes using DNA barcoding data." *Trends Parasitol* 27(3): 99; author reply 100.
- Heitman, J. (2006). "Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens." *Curr Biol* 16(17): R711-725.
- Henderson, S. T. and T. D. Petes (1992). "Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 12(6): 2749-2757.
- Hernandez, R., P. Rios, A. M. Valdes and D. Pinero (1990). "Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids." *Mol Biochem Parasitol* 41(2): 207-212.
- Herrera, C., M. D. Barges, A. Fajardo, M. Montilla, O. Triana, et al. (2007). "Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia." *Infect Genet Evol* 7(4): 535-539.
- Herrera, C., F. Guhl, A. Falla, A. Fajardo, M. Montilla, et al. (2009). "Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences." *J Parasitol Res* 2009.
- Herwaldt, B. L., M. J. Grijalva, A. L. Newsome, C. R. McGhee, M. R. Powell, et al. (2000). "Use of polymerase chain reaction to diagnose the fifth reported US case of autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, in Tennessee, 1998." *J Infect Dis* 181(1): 395-399.
- Higo, H., S. Miura, M. Horio, T. Mimori, S. Hamano, et al. (2004). "Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects." *Parasitol Int* 53(4): 337-344.
- Higuchi Mde, L., P. S. Gutierrez, V. D. Aiello, S. Palomino, E. Bocchi, et al. (1993). "Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 423(3): 157-160.
- Hoare, C. A., 1972. *The Trypanosomes of Mammals.* . Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Khoury, A. M., D. F. Davila, G. Bellabarba, J. H. Donis, A. Torres, et al. (1996). "Acute effects of digitalis and enalapril on the neurohormonal profile of chagasic patients with severe congestive heart failure." *Int J Cardiol* 57(1): 21-29.
- Kierszenbaum, F. (2005). "Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease?" *Trends Parasitol* 21(11): 513-516.
- Lages-Silva, E., L. E. Ramirez, A. L. Pedrosa, E. Crema, L. M. da Cunha Galvao, et al. (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., L. E. Ramirez, M. L. Silva-Vergara and E. Chiari (2002). "Chagasic meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: diagnosis, follow-up, and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*." *Clin Infect Dis* 34(1): 118-123.
- Lescure, F. X., G. Le Loup, H. Freilij, M. Develoux, L. Paris, et al. (2010). "Chagas disease: changes in knowledge and management." *Lancet Infect Dis* 10(8): 556-570.

- Levinson, G. and G. A. Gutman (1987). "High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12." *Nucleic Acids Res* 15(13): 5323-5338.
- Lewis, M. D., M. S. Llewellyn, M. W. Gaunt, M. Yeo, H. J. Carrasco, et al. (2009a). "Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids." *Int J Parasitol* 39(12): 1305-1317.
- Lewis, M. D., M. S. Llewellyn, M. Yeo, N. Acosta, M. W. Gaunt, et al. (2011). "Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids." *PLoS Negl Trop Dis* 5(10): e1363.
- Lewis, M. D., J. Ma, M. Yeo, H. J. Carrasco, M. S. Llewellyn, et al. (2009b). "Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages." *Am J Trop Med Hyg* 81(6): 1041-1049.
- Litt, M. and J. A. Luty (1989). "A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene." *Am J Hum Gen* 44(3): 397-01.
- Llewellyn, M. S., M. D. Lewis, N. Acosta, M. Yeo, H. J. Carrasco, et al. (2009a). "*Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease." *PLoS Negl Trop Dis* 3(9): e510.
- Llewellyn, M. S., M. A. Miles, H. J. Carrasco, M. D. Lewis, M. Yeo, et al. (2009b). "Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection." *PLoS Pathog* 5(5): e1000410.
- Llewellyn, M. S., J. B. Rivett-Carnac, S. Fitzpatrick, M. D. Lewis, M. Yeo, et al. (2011). "Extraordinary *Trypanosoma cruzi* diversity within single mammalian reservoir hosts implies a mechanism of diversifying selection." *Int J Parasitol* 41(6): 609-614.
- Lopes, E. R., E. Chapadeiro, W. L. Tafuri and e. al. (1970). "Heart weight and type of death in the patient with chronic Chagas disease. ." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 12: 293-297.
- Lopez-Olmos, V., N. Perez-Nasser, D. Pinero, E. Ortega, R. Hernandez, et al. (1998). "Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*." *Acta Trop* 69(3): 239-254.
- Luckraz, H., L. D. Sharples, S. C. Charman, S. S. Tsui, J. Wallwork, et al. (2005). "Does heart transplantation confer survival benefit in all risk groups?" *J Heart Lung Transplant* 24(9): 1231-1234.
- Luquetti, A. O., J. C. Dias and A. Prata (2005). "[Diagnosis and treatment of congenital infection caused by *Trypanosoma cruzi* in Brazil]." *Rev Soc Bras Med Trop* 38 Suppl 2: 27-28.
- Luquetti, A. O., M. A. Miles, A. Rassi, J. M. de Rezende, A. A. de Souza, et al. (1986). "*Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80(3): 462-470.
- Luquetti, A. O., C. Ponce, E. Ponce, J. Esfandiari, A. Schijman, et al. (2003). "Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*." *Diagn Microbiol Infect Dis* 46(4): 265-271.
- Luquetti, A. O. and A. Rassi, 2000. "Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*." in: Z. Brener, Z. A. Andrade and M. Barral Neto (Eds.), *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan Editora, Rio de Janeiro, pp. 345-378.
- Macedo, A. M., C. R. Machado, R. P. Oliveira and S. D. Pena (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, A. M., M. S. Martins, E. Chiari and S. D. Pena (1992). "DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones." *Mol Biochem Parasitol* 55(1-2): 147-153.
- Macedo, A. M. and S. D. Pena (1998). "Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease." *Parasitol Today* 14(3): 119-124.
- Macedo, A. M., J. R. Pimenta, R. S. Aguiar, A. I. Melo, E. Chiari, et al. (2001). "Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(3): 407-413.
- Macedo, A. M. and M. Segatto, 2010. "Implications of *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Diversity in the Pathogenesis of Chagas Disease", in: M. Tibayrenc and J. Telleria (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research*, 1st ed. Elsevier, London, pp. 498-522.
- Machado, C. A. and F. J. Ayala (2001). "Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7396-7401.
- Machado, C. R., L. Augusto-Pinto, R. McCulloch and S. M. Teixeira (2006). "DNA metabolism and genetic diversity in *Trypanosomes*." *Mutat Res* 612(1): 40-57.
- Maia da Silva, F., A. Marcili, L. Lima, M. Cavazzana, Jr., P. A. Ortiz, et al. (2009). "*Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences." *Acta Trop* 109(3): 199-207.
- Mantilla, J. C., G. A. Zafra, A. M. Macedo and C. I. Gonzalez (2010). "Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient." *H Pathol* 41(4): 610-613.
- Marcet, P. L., T. Duffy, M. V. Cardinal, J. M. Burgos, M. A. Lauricella, et al. (2006). "PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina." *Parasitology* 132(Pt 1): 57-65.
- Marcili, A., L. Lima, V. C. Valente, S. A. Valente, J. S. Batista, et al. (2009a). "Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering." *Infect Genet Evol* 9(6): 1265-1274.
- Marcili, A., V. C. Valente, S. A. Valente, A. C. Junqueira, F. M. da Silva, et al. (2009b). "*Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission." *Int J Parasitol* 39(5): 615-623.
- Martins, L. P., A. Marcili, R. E. Castanho, A. L. Therezo, J. C. de Oliveira, et al. (2008). "Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc." *Am J Trop Med Hyg* 79(3): 427-434.
- Mateo, H., M. Sanchez-Moreno and C. Marin (2010). "Enzyme-linked immunosorbent assay with purified *Trypanosoma cruzi* excreted superoxide dismutase." *Clin Biochem* 43(15): 1257-1264.
- Mehra, M. R., J. Kobashigawa, R. Starling, S. Russell, P. A. Uber, et al. (2006). "Listing criteria for heart transplantation: International Society for Heart and Lung Transplantation guidelines for the care of cardiac transplant candidates--2006." *J Heart Lung Transplant* 25(9): 1024-1042.
- Melo, R. C. and Z. Brener (1978). "Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains." *J Parasitol* 64(3): 475-482.
- Mendez, G. F. and M. R. Cowie (2001). "The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature." *Int J Cardiol* 80(2-3): 213-219.

- Mendonca, M. B., N. S. Nehme, S. S. Santos, E. Cupolillo, N. Vargas, et al. (2002). "Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron." *Parasitology* 124(Pt 2): 177-184.
- Mendoza, I., J. Camardo, F. Moleiro, A. Castellanos, V. Medina, et al. (1986). "Sustained ventricular tachycardia in chronic chagasic myocarditis: electrophysiologic and pharmacologic characteristics." *Am J Cardiol* 57(6): 423-427.
- Mijares, M. S. (1965). "Contribucion al estudio de la patología de la miocarditi cronica chagastica en Venezuela, morfología relación anatomoclinica. Revision de 130 autopsias." *Arch. Hosp. Vargas* 7: 117-212.
- Miles, M. A., R. A. Cedillos, M. M. Pova, A. A. de Souza, A. Prata, et al. (1981a). "Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease?" *Lancet* 1(8234): 1338-1340.
- Miles, M. A., M. D. Feliciangeli and A. R. de Arias (2003). "American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies." *BMJ* 326(7404): 1444-1448.
- Miles, M. A., M. S. Llewellyn, M. D. Lewis, M. Yeo, R. Baleela, et al. (2009). "The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future." *Parasitology* 136(12): 1509-1528.
- Miles, M. A., M. M. Pova, A. A. de Souza, R. Lainson, J. J. Shaw, et al. (1981b). "Chagas's disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para State, north Brazil." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75(5): 667-674.
- Miles, M. A., A. Souza, M. Pova, J. J. Shaw, R. Lainson, et al. (1978). "Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil." *Nature* 272(5656): 819-821.
- Miles, M. A., P. J. Toye, S. C. Oswald and D. G. Godfrey (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(3): 217-225.
- Minoprio, J. L. (1966). "[Chagas' disease. South American trypanosomiasis]." *Prensa Med Argent* 53(36): 1972-1976.
- Moncayo, A. and A. C. Silveira (2009). "Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 17-30.
- Monteiro, W. M., L. K. Magalhaes, F. S. Santana Filho, M. Borborema, H. Silveira, et al. (2010). "*Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia." *Trop Med Int Health* 15(9): 1049-1051.
- Montilla, M. M., F. Guhl, C. Jaramillo, S. Nicholls, C. Barnabe, et al. (2002). "Isoenzyme clustering of *Trypanosomatidae* Colombian populations." *Am J Trop Med Hyg* 66(4): 394-400.
- Moreira, L. F., N. A. Stolf, D. M. Braile and A. D. Jatene (1996). "Dynamic cardiomyoplasty in South America." *Ann Thorac Surg* 61(1): 408-412.
- Morel, C., E. Chiari, E. P. Camargo, D. M. Mattei, A. J. Romanha, et al. (1980). "Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(11): 6810-6814.
- Moser, D. R., L. V. Kirchoff and J. E. Donelson (1989). "Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction." *J Clin Microbiol* 27(7): 1477-1482.
- Murthy, V. K., K. M. Dibbern and D. A. Campbell (1992). "PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*." *Mol Cell Probes* 6(3): 237-243.

- Nitz, N., C. Gomes, A. de Cassia Rosa, M. R. D'Souza-Ault, F. Moreno, et al. (2004). "Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease." *Cell* 118(2): 175-186.
- Njiokou, F., G. Simo, S. W. Nkinin, C. Laveissiere and S. Herder (2004). "Infection rate of *Trypanosoma brucei* s.l., *T. vivax*, *T. congolense* "forest type", and *T. simiae* in small wild vertebrates in south Cameroon." *Acta Trop* 92(2): 139-146.
- Noyes, H. A., J. R. Stevens, M. Teixeira, J. Phelan and P. Holz (1999). "A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia." *Int J Parasitol* 29(2): 331-339.
- Odim, J., J. Wheat, H. Laks, J. Kobashigawa, D. Gjertson, et al. (2006). "Peri-operative renal function and outcome after orthotopic heart transplantation." *J Heart Lung Transplant* 25(2): 162-166.
- Oliveira, M. A., O. L. Caballero, A. R. Vago, R. A. Harskeerl, A. J. Romanha, et al. (2003). "Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*." *J Med Microbiol* 52(Pt 2): 127-135.
- Oliveira, R. P., N. E. Broude, A. M. Macedo, C. R. Cantor, C. L. Smith, et al. (1998). "Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 3776-3780.
- Oliveira, R. P., A. M. Macedo, E. Chiari and S. D. Pena (1997). "An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites." *Parasitol Today* 13(5): 196-200.
- Oliveira, R. P., A. I. Melo, A. M. Macedo, E. Chiari and S. D. Pena (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.
- Pena, S. D., G. Barreto, A. R. Vago, L. De Marco, F. C. Reinach, et al. (1994). "Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(5): 1946-1949.
- Pereira, K. S., F. L. Schmidt, R. L. Barbosa, A. M. Guaraldo, R. M. Franco, et al. (2010). "Transmission of chagas disease (American trypanosomiasis) by food." *Adv Food Nutr Res* 59: 63-85.
- Petkova, S. B., H. Huang, S. M. Factor, R. G. Pestell, B. Bouzahzah, et al. (2001). "The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease." *Int J Parasitol* 31(5-6): 499-511.
- Pimenta, J. R., 2002. Análises Filogenéticas Populacionais em *T. cruzi* à Partir de Estudos de Microsatélites Polimórficos de DNA, Biochemistry and Immunology Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Pinto, A. S., M. de Lana, B. Bastrenta, C. Barnabe, V. Quesney, et al. (1998). "Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*." *Parasitol Res* 84(5): 348-353.
- Pinto, A. Y., S. A. Valente and C. Valente V (2004). "Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement." *Bra J Infect Dis* 8: 454-460.
- Portela-Lindoso, A. A. and M. A. Shikanai-Yasuda (2003). "[Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction]." *Rev Saude Publica* 37(1): 107-115.
- Postan, M., J. P. McDaniel and J. A. Dvorak (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): 236-238.
- Poulin, R. and S. Morand (1999). "Geographical distances and the similarity among parasite communities of conspecific host populations." *Parasitology* 119 (Pt 4): 369-374.

- Prata, A. (2001). "Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease." *Lancet Infect Dis* 1(2): 92-100.
- Punukollu, G., R. M. Gowda, I. A. Khan, V. S. Navarro and B. C. Vasavada (2007). "Clinical aspects of the Chagas' heart disease." *Int J Cardiol* 115(3): 279-283.
- Py, M. O. (2011). "Neurologic manifestations of Chagas disease." *Curr Neurol Neurosci Rep* 11(6): 536-542.
- Ramirez, J. D., M. C. Duque, M. Montilla, Z. Cucunuba and F. Guhl (2012). "Natural and emergent *Trypanosoma cruzi* I genotypes revealed by mitochondrial (Cytb) and nuclear (SSU rDNA) genetic markers." *Exp Parasitol* 132(4): 487-494.
- Rassi, A., Jr., J. C. Dias, J. A. Marin-Neto and A. Rassi (2009). "Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease." *Heart* 95(7): 524-534.
- Rassi, A., Jr., A. Rassi and J. A. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." *Lancet* 375(9723): 1388-1402.
- Rassi, A., A. O. Luquetti, J. A. Rassi, S. G. Rassi and A. G. Rassi, 1992. *Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on Transfusion and Clinical medicine*. ISBT Brazil, São Paulo.
- Rassi, A., A. Rassi Júnior and G. G. Rassi, 2000. "Fase Aguda", in: Z. Brener, Z. A. Andrade and M. Barral Neto (Eds.), *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas* 2nd ed. Guanabara Koogan Editora, Rio de Janeiro, pp. 231-245.
- Rassi, A. J., A. Rassi and J. M. Rezende (2012). "American Trypanosomiasis (Chagas Disease)." *Infect Dis Clin North Am.* 26 (2): 275-291.
- Rassi Junior, A., A. Gabriel Rassi, S. Gabriel Rassi, L. Rassi Junior and A. Rassi (1995). "[Ventricular arrhythmia in Chagas disease. Diagnostic, prognostic, and therapeutic features]." *Arq Bras Cardiol* 65(4): 377-387.
- Revollo, S., B. Oury, J. P. Laurent, C. Barnabe, V. Quesney, et al. (1998). "*Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties." *Exp Parasitol* 89(1): 30-39.
- Ribeiro-dos-Santos, G., A. S. Nishiya, E. C. Sabino, D. F. Chamone and A. Saez-Alquezar (1999). "An improved, PCR-based strategy for the detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples." *Ann Trop Med Parasitol* 93(7): 689-694.
- Ribeiro Dos Santos, R., S. Rassi, G. Feitosa, O. T. Grecco, A. Rassi, Jr., et al. (2012). "Cell therapy in Chagas cardiomyopathy (Chagas arm of the multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies study): a multicenter randomized trial." *Circulation* 125(20): 2454-2461.
- Rios, J. F., M. Arboleda, A. N. Montoya and E. P. Alarcon (2011). "[Probable outbreak of oral transmission of Chagas disease in Turbo, Antioquia]." *Biomedica* 31(2): 185-195.
- Robello, C., F. Gamarro, S. Castanys and F. Alvarez-Valin (2000). "Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains." *Gene* 246(1-2): 331-338.
- Roberti, R. R., E. E. Martinez, J. L. Andrade, V. L. Araujo, F. S. Brito, et al. (1992). "Chagas cardiomyopathy and captopril." *Eur Heart J* 13(7): 966-970.
- Rodriguez, I. B., A. Botero, A. M. Mejia-Jaramillo, E. J. Marquez, S. Ortiz, et al. (2009). "Transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* determined by low-stringency single primer polymerase chain reaction and southern blot analyses in four indigenous communities of the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia." *Am J Trop Med Hyg* 81(3): 396-403.
- Roellig, D. M., E. L. Brown, C. Barnabe, M. Tibayrenc, F. J. Steurer, et al. (2008). "Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States." *Emerg Infect Dis* 14(7): 1123-1125.
- Romanha, A. J., A. A. da Silva Pereira, E. Chiari and V. Kilgour (1979). "Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture." *Comp Biochem Physiol B* 62(2): 139-142.

- Romanha, J. A., 1982. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Ross, H., P. Hendry, A. Dipchand, N. Giannetti, G. Hirsch, et al. (2001). "Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference on cardiac transplantation." *Can J Cardiol* 11: 1135-1158.
- Rougeron, V., T. De Meeus, S. Kako Ouraga, M. Hide and A. L. Banuls (2010). "'Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)' in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses." *PLoS Pathog* 6(8): e1001004.
- Rozas, M., S. De Doncker, V. Adai, X. Coronado, C. Barnabe, et al. (2007). "Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment--length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications." *J Infect Dis* 195(9): 1381-1388.
- Samuel, J., M. Oliveira, R. R. Correa De Araujo, M. A. Navarro and G. Muccillo (1983). "Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease." *Am J Cardiol* 52(1): 147-151.
- Santos, F. R., J. T. Epplen and S. D. Pena (1993). "Testing deficiency paternity cases with a Y-linked tetranucleotide repeat polymorphism." *EXS* 67: 261-265.
- Sartori, A. M., J. E. Neto, E. V. Nunes, L. M. Braz, H. H. Caiiffa-Filho, et al. (2002). "*Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients." *J Infect Dis* 186(6): 872-875.
- Schander, C. and K. M. Halanych (2003). "DNA, PCR and formalized animal tissue - a short review and protocols. ." *Organisms, Diversity & Evolution* 3: 195-203.
- Schijman, A. G., M. Bisio, L. Orellana, M. Sued, T. Duffy, et al. (2011). "International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients." *PLoS Negl Trop Dis* 5(1): e931.
- Schijman, A. G., C. Vigliano, J. Burgos, R. Favaloro, S. Perrone, et al. (2000). "Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient." *J Heart Lung Transplant* 19(11): 1114-1117.
- Schmunis, G. A. (2007). "Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1: 75-85.
- Shikanai-Yasuda, M. A., C. B. Marcondes, L. A. Guedes, G. S. Siqueira, A. A. Barone, et al. (1991). "Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 33(5): 351-357.
- Shumway, N. E., R. R. Lower and R. C. Stofer (1966). "Transplantation of the heart." *Adv Surg* 2: 265-284.
- Simpson, L. (1987). "The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution." *Annu Rev Microbiol* 41: 363-382.
- Siqueira-Batista, R., A. D. Corrêa and D. W. Huggins, 1996. "Moléstia de Chagas". Editora de Cultura Médica, Rio de Janeiro.
- Soares, M. B., R. S. Lima, L. L. Rocha, C. M. Takyia, L. Pontes-de-Carvalho, et al. (2004). "Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice." *Am J Pathol* 164(2): 441-447.
- Sousa, A. C., J. A. Marin-Neto, B. C. Maciel, L. Gallo Junior, S. Amorim Dde, et al. (1988). "[Systolic and diastolic dysfunction in the indeterminate, digestive and chronic cardiac forms of Chagas' disease]." *Arq Bras Cardiol* 50(5): 293-299.
- Souto, R. P., O. Fernandes, A. M. Macedo, D. A. Campbell and B. Zingales (1996). "DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*." *Mol Biochem Parasitol* 83(2): 141-152.

- Souto, R. P. and B. Zingales (1993). "Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence." *Mol Biochem Parasitol* 62(1): 45-52.
- Souza, M. M., M. Franco, D. R. Almeida and e. al. (2000). "Comparative histopathology of endomyocardial biopsies in chagasic and non-chagasic heart transplant recipients." *J Heart Lung Transplant* 220: 534e543.
- Steindel, M., E. Dias Neto, C. L. de Menezes, A. J. Romanha and A. J. Simpson (1993). "Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains." *Mol Biochem Parasitol* 60(1): 71-79.
- Steindel, M., L. Kramer Pacheco, D. Scholl, M. Soares, M. H. de Moraes, et al. (2008). "Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil." *Diagn Microbiol Infect Dis* 60(1): 25-32.
- Stevens, J. R., H. A. Noyes, G. A. Dover and W. C. Gibson (1999). "The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*." *Parasitology* 118 (Pt 1): 107-116.
- Sturm, N. R., W. Degraeve, C. Morel and L. Simpson (1989). "Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease." *Mol Biochem Parasitol* 33(3): 205-214.
- Sturm, N. R., N. S. Vargas, S. J. Westenberger, B. Zingales and D. A. Campbell (2003). "Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*." *Int J Parasitol* 33(3): 269-279.
- Subileau, M., C. Barnabe, E. J. Douzery, P. Diosque and M. Tibayrenc (2009). "*Trypanosoma cruzi*: new insights on ecophylogeny and hybridization by multigene sequencing of three nuclear and one maxicircle genes." *Exp Parasitol* 122(4): 328-337.
- Teixeira, A. R., E. R. Arganaraz, L. H. Freitas, Jr., Z. G. Lacava, J. M. Santana, et al. (1994). "Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection." *Mutat Res* 305(2): 197-209.
- Teixeira, A. R., R. J. Nascimento and N. R. Sturm (2006a). "Evolution and pathology in chagas disease--a review." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(5): 463-491.
- Teixeira, D. E., P. H. Crepaldi, M. Benchimol and W. Souza. (2011). "Atlas Didático - O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* ", from http://labspace.open.ac.uk/PUB_527_1.0.
- Teixeira, M. M., F. M. da Silva, A. Marcili, E. S. Umezawa, M. A. Shikanai-Yasuda, et al. (2006b). "Short communication: *Trypanosoma cruzi* lineage I in endomyocardial biopsy from a north-eastern Brazilian patient at end-stage chronic Chagasic cardiomyopathy." *Trop Med Int Health* 11(3): 294-298.
- Tibayrenc, M. (1995). "Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms." *Adv Parasitol* 36: 47-115.
- Tibayrenc, M. and F. J. Ayala (1987). "*Trypanosoma cruzi* populations: more clonal than sexual." *Parasitol Today* 3(6): 189-190.
- Tibayrenc, M. and F. J. Ayala (1988). "Isoenzyme variability of *T. cruzi*, The agent of Chagas' disease: Genetical, taxonomic and epidemiological significance." *Evolution* 42: 277-292.
- Tibayrenc, M. and F. J. Ayala (1991). "Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa." *Parasitol Today* 7(9): 228-232.
- Tibayrenc, M. and F. J. Ayala (2002). "The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on." *Trends Parasitol* 18(9): 405-410.
- Tibayrenc, M., A. Hoffmann, O. Poch, L. Echalar, F. Le Pont, et al. (1986a). "Additional data on *Trypanosoma cruzi* isozymic strains encountered in Bolivian domestic transmission cycles." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80(3): 442-447.

- Tibayrenc, M., K. Neubauer, C. Barnabe, F. Guerrini, D. Skarecky, et al. (1993). "Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(4): 1335-1339.
- Tibayrenc, M., P. Ward, A. Moya and F. J. Ayala (1986b). "Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(1): 115-119.
- Tomazi, L., S. Y. Kawashita, P. M. Pereira, B. Zingales and M. R. Briones (2009). "Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic." *Genet Mol Res* 8(2): 458-476.
- Triana, O., S. Ortiz, J. C. Dujardin and A. Solari (2006). "*Trypanosoma cruzi*: variability of stocks from Colombia determined by molecular karyotype and minicircle Southern blot analysis." *Exp Parasitol* 113(1): 62-66.
- Uip, D. E., T. M. V. Strabelli, G. Belotti, E. A. Bocchi, N. Stolf, et al. (1987). "Evolução clínica de pacientes com doença de Chagas submetidos a transplante cardíaco." *Rev Soc Bras Med Trop* 20: 1.
- Ullu, E., C. Tschudi, A. Gunzi and 1996. "Trans-splicing in trypanosomatid protozoa", in: D. F. Smith and M. Parsons (Eds.), *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*. press Oxford, pp. 115-129.
- Umezawa, E. S., A. O. Luquetti, G. Levitus, C. Ponce, E. Ponce, et al. (2004). "Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries." *J Clin Microbiol* 42(1): 449-452.
- Urbina, J. A. (2009). "New advances in the management of a long-neglected disease." *Clin Infect Dis* 49(11): 1685-1687.
- Vago, A. R., L. O. Andrade, A. A. Leite, D. d'Avila Reis, A. M. Macedo, et al. (2000). "Genetic characterization of *T. cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs." *Am J Pathol* 156(5): 1805-09.
- Vago, A. R., A. M. Macedo, S. J. Adad, D. D. Reis and R. Correa-Oliveira (1996a). "PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease." *Lancet* 348(9031): 891-892.
- Vago, A. R., A. M. Macedo, R. P. Oliveira, L. O. Andrade, E. Chiari, et al. (1996b). "Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues." *Am J Pathol* 149(6): 2153-2159.
- Vago, A. R., D. M. Silva, S. J. Adad, R. Correa-Oliveira and D. d'Avila Reis (2003). "Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the oesophagus of patients without megaoesophagus." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97(3): 308-309.
- Valadares, H. M., J. R. Pimenta, J. M. de Freitas, T. Duffy, D. C. Bartholomeu, et al. (2008). "Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites." *Int J Parasitol* 38(7): 839-850.
- Valadares, H. M. S., 2007. Análises populacionais em *Trypanosoma cruzi* baseadas em microssatélites polimórfios de DNA, *Biochemistry and Immunology*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Valente, S. A., V. da Costa Valente, A. Y. das Neves Pinto, M. de Jesus Barbosa Cesar, M. P. dos Santos, et al. (2009). "Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103(3): 291-297.
- Valle, I. F., 2012. Avaliação do cenário evolutivo de *Trypanosoma cruzi* pela análise do genoma do maxicírculo do DNA mitocondrial. Universidade Federal de Minas Gerais, p. 50.

- Vallejo, G. A., F. Guhl, E. Chiari and A. M. Macedo (1999). "Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA." *Acta Trop* 72(2): 203-212.
- Venegas, J., W. Conoepan, S. Pichuantes, S. Miranda, M. I. Jercic, et al. (2009). "Phylogenetic analysis of microsatellite markers further supports the two hybridization events hypothesis as the origin of the *Trypanosoma cruzi* lineages." *Parasitol Res* 105(1): 191-199.
- Vianna, G. (1911). "Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Chagas." *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3: 199-226.
- Vicco, M. H., I. Bontempi, S. Ortiz, A. Solari, O. A. Bottasso, et al. (2012). "Chronic Chagas disease with cardiodigestive involvement and the TcVI infective form of *Trypanosoma cruzi*. A case report." *Parasitol Int* 61(4): 735-737.
- Vilas-Boas, F., G. S. Feitosa, M. B. Soares, A. Mota, J. A. Pinho-Filho, et al. (2006). "[Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease]." *Arq Bras Cardiol* 87(2): 159-166.
- Villa, L. L., O. L. Caballero, J. E. Levi, S. D. Pena and A. J. Simpson (1995). "An approach to human papillomavirus identification using low stringency single specific primer PCR." *Mol Cell Probes* 9(1): 45-48.
- Villar, J. C., J. A. Marin-Neto, S. Ebrahim and S. Yusuf (2002). "Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection." *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD003463.
- Virreira, M., C. Alonso-Vega, M. Solano, J. Jijena, L. Brutus, et al. (2006a). "Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*." *Am J Trop Med Hyg* 75(5): 871-879.
- Virreira, M., G. Serrano, L. Maldonado and M. Svoboda (2006b). "T. cruzi: typing of genotype (sub)lineages in megacolon samples from bolivian patients." *Acta Trop* 100(3): 252-255.
- Virreira, M., F. Torrico, C. Truyens, C. Alonso-Vega, M. Solano, et al. (2003). "Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection." *Am J Trop Med Hyg* 68(5): 574-582.
- Virreira, M., C. Truyens, C. Alonso-Vega, L. Brutus, J. Jijena, et al. (2007). "Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns." *Am J Trop Med Hyg* 77(1): 102-106.
- Volpato, F. C. Z., 2013. Caracterização molecular de amostras do *Trypanosoma cruzi* recém-isoladas de pacientes chagásicos crônicos portadores de diferentes formas clínicas, Depto Parasitologia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Wahlund, S. (1928). "Zusammensetzung von Population und Korrelationserscheinung vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. ." *Hereditas* 11: 65–106.
- Walder, J. A., P. S. Eder, D. M. Engman, S. T. Brentano, R. Y. Walder, et al. (1986). "The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's." *Science* 233(4763): 569-571.
- Webb, W. R., H. S. Howard and W. A. Neely (1959). "Practical methods of homologous cardiac transplantation." *J Thorac Surg* 37(3): 361-366.
- Weber, J. L., D. David, J. Heil, Y. Fan, C. Zhao, et al. (2002). "Human diallelic insertion/deletion polymorphisms." *Am J Hum Genet* 71(4): 854-862.
- Weiss, E. S., L. U. Nwakanma, N. D. Patel and D. D. Yuh (2008). "Outcomes in patients older than 60 years of age undergoing orthotopic heart transplantation: an analysis of the UNOS database." *J Heart Lung Transplant* 27(2): 184-191.
- Welsh, J. and M. McClelland (1990). "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers." *Nucleic Acids Res* 18(24): 7213-7218.

- Westenberger, S. J., C. Barnabe, D. A. Campbell and N. R. Sturm (2005). "Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*." *Genetics* 171(2): 527-543.
- White, T. C., G. Rudenko and P. Borst (1986). "Three small RNAs within the 10 kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28S rRNAs." *Nucleic Acids Res* 14(23): 9471-9489.
- WHO, 2002. Control of Chagas disease: report of a WHO expert committee., pp. 1-109.
- WHO, 2005. Making health research work for poor people, The World Health Report. Tropical Disease Research, pp. 30-33.
- WHO (2007). "Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. ." TDR/GTC/06 World Health Organization: 96.
- WHO (2010). "Chagas disease (American trypanosomiasis)." *Wkly Epidemiol Rec* 85: 334-336.
- Widmer, G., C. J. Marinkelle, F. Guhl and M. A. Miles (1985). "Isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* stocks from Colombia and Ecuador." *Ann Trop Med Parasitol* 79(3): 253-257.
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey (1990). "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucleic Acids Res* 18(22): 6531-6535.
- Wincker, P., C. Britto, J. B. Pereira, M. A. Cardoso, W. Oelemann, et al. (1994). "Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *T. cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area." *Am J Trop Med Hyg* 51(6): 771-777.
- Yeo, M., N. Acosta, M. Llewellyn, H. Sanchez, S. Adamson, et al. (2005). "Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids." *Int J Parasitol* 35(2): 225-233.
- Yeo, M., I. L. Mauricio, L. A. Messenger, M. D. Lewis, M. S. Llewellyn, et al. (2011). "Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*." *PLoS Negl Trop Dis* 5(6): e1049.
- Zafra, G., J. C. Mantilla, J. Jacome, A. M. Macedo and C. I. Gonzalez (2011). "Direct analysis of genetic variability in *Trypanosoma cruzi* populations from tissues of Colombian chagasic patients." *Hum Pathol*.
- Zafra, G., J. C. Mantilla, J. Jácome, A. M. Macedo and C. I. González (2010). "Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* populations directly on tissues of Colombian chagasic patients." *The Journal of Pathology*.
- Zafra, G., J. C. Mantilla, H. M. Valadares, A. M. Macedo and C. I. Gonzalez (2008). "Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian chagasic patients." *Parasit Res* 103(3): 731-734.
- Zingales, B., S. G. Andrade, M. R. Briones, D. A. Campbell, E. Chiari, et al. (2009). "A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(7): 1051-1054.
- Zingales, B., M. A. Miles, D. A. Campbell, M. Tibayrenc, A. M. Macedo, et al. (2012). "The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications." *Infect Genet Evol* 12(2): 240-253.
- Zingales, B., R. P. Souto, R. H. Mangia, C. V. Lisboa, D. A. Campbell, et al. (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.
- Zingales, B., B. S. Stolf, R. P. Souto, O. Fernandes and M. R. Briones (1999). "Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1: 159-164.

