

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, atinge cerca de 18 milhões de pessoas nas três Américas. O parasito apresenta estrutura populacional complexa, com extensa variabilidade intraespecífica. Todavia, a análise conjunta de um grande número de marcadores suporta a divisão do táxon em pelo menos duas linhagens: *T. cruzi* I, ligada ao ciclo

silvestre e *T. cruzi* II, ligada ao ciclo doméstico de transmissão. Em seres humanos, a doença de

Chagas apresenta-se com manifestações clínicas muito variáveis na sua fase crônica, com parasitemia escassa e um curso clínico imprevisível, podendo variar de uma ausência total dos sintomas até s severas manifestações cardiovasculares e/ou gastrintestinais. Apesar de estar cada vez mais claro que a doença de Chagas provavelmente é resultante da interação complexa entre parasitos e hospedeiros, os motivos pelos quais diferentes indivíduos apresentam formas clínicas distintas permanecem desconhecidos. Para que estas questões sejam elucidadas, existe a necessidade de um melhor entendimento da contribuição de fatores genéticos de parasitos e hospedeiros e da maneira de como eles se interagem para resultar na patologia da doença.

Neste

aspecto, no presente trabalho, procuramos desenvolver metodologias de análise moleculares complementares que possibilitassem a adequada caracterização molecular de parasitos e hospedeiros bem como de suas interações.

Inicialmente, com o objetivo de contribuir no entendimento da estrutura populacional do parasito, analisamos cinco locos de microssatélites, a região D7 da subunidade 24S α do rDNA e

polimorfismos de seqüências dos genes mitocondriais citocromo oxidase subunidade II, citocromo

B e NADH desidrogenase em 75 cepas do parasito. Baseando-se nos dados de microssatélites as

cepas puderam ser divididas em quatro grupos correspondendo à linhagem *T. cruzi* I (“MDScluster

A”), *T. cruzi* II (“MDS-cluster C”), *T. cruzi* (“MDS-cluster B”) e cepas híbridas (“MDS-cluster BH”). Os dois primeiros grupos correspondem aos tipos mitocondriais A e C respectivamente, enquanto que os outros dois pertencem ao tipo mitocondrial B. Os dados obtidos através da tipagem por microssatélites e rDNA 24S α foram analisados conjuntamente por reconstituição haplotípica através do programa PHASE, resultando em 141 haplótipos, claramente distribuídos em três haplogrupos (X,Y e Z). Todas as cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* I (“MDS-cluster

A”) apresentam os dois haplótipos originados do haplogrupo Z (Z/Z), as cepas da linhagem *T. cruzi* II (“MDS-cluster C”) são Y/Y, e aquelas pertencentes ao “MDS-cluster B” (*T. cruzi*) apresentam haplótipos X/X. As cepas agrupadas no “MDS-cluster BH” apresentam haplótipos X/Y,

confirmando a sua natureza híbrida. Baseando-se nestes resultados, propusemos a existência de

três linhagens ancestrais do *Trypanosoma cruzi*, as quais foram denominadas *T. cruzi* I, *T. cruzi* II

5

e *T. cruzi* III. No mínimo dois eventos de hibridação envolvendo *T. cruzi* II e *T. cruzi* III resultaram

em progênies viáveis. Nos dois eventos a linhagem doadora de mitocôndria (conforme indicado pelo tipo mitocondrial das cepas híbridas) foi a linhagem *T. cruzi* III e a linhagem receptora foi a linhagem *T. cruzi* II.

Segundo, através de uma nova abordagem resultante da combinação da amplificação por

“heminested” PCR e a análise em aparelho de PCR em tempo real, obtivemos sensibilidade e poder de resolução suficientes para a tipagem do rDNA 24S α de *T. cruzi* diretamente em amostras de tecidos cronicamente infectados. Em vinte e sete amostras coração, esôfago e cólon, provenientes de 25 pacientes originados dos estados de Minas Gerais e Goiás, demonstramos a presença de apenas do rDNA tipo 1, bem correlacionado com linhagem *T. cruzi* II. Estes dados confirmam evidências anteriores de que esta linhagem seria a responsável pela doença ao menos nestas regiões endêmicas. Adicionalmente, caracterizamos geneticamente os parasitos presentes na corrente sanguínea e em uma biopsia cerebral de um paciente Chagásico e portador da síndrome de imunodeficiência adquirida. Análises dos genes de rDNA 24S α e de mini-éxon, juntamente com perfis de microssatélites e de LSSP / PCR, indicam que havia uma maior diversidade clonal do parasito no cérebro em comparação com o sangue e que as populações eram geneticamente distintas, pois no sangue estava presente a linhagem *T. cruzi* II enquanto que no cérebro estava uma população híbrida. Finalmente, com o objetivo de melhor estudar o fenômeno da distribuição diferenciada de *T. cruzi* nos diversos tecidos hospedeiros, utilizamos o modelo murino da doença, para o qual já havia evidências de que o tropismo tecidual poderia estar correlacionado com o haplótipo de MHC (Também denominada H-2) dos camundongos. Para tanto, em abordagens *in vivo* e *ex vivo*, infectamos animais congênicos para a região H-2 [C57BLK/sJ (*H-2_a*), C57BL/6 (*H-2_b*), BALB/c (*H-2_d*) e BALB/B10 (*H-2_b*)] com uma mistura artificial de duas cepas de *T. cruzi* [JG (*T. cruzi* II) e Col1.7G2 (*T. cruzi* I)]. Em todos os experimentos, a prevalência de uma cepa em relação à outra no tecido cardíaco foi associada ao haplótipo de H-2, onde a colonização pela cepa Col1.7G2 foi favorecida nos camundongos de haplótipo H-2_b, independentemente do “background” genético dos animais. O conjunto dos resultados apresentados nesta tese de doutorado estabiliza a noção de que, tanto a variação genética do *T. cruzi* como dos seus hospedeiros, influenciam no curso da doença de Chagas.