

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Comportamento biológico e caracterização molecular de infecção mista com clones de *Trypanosoma cruzi* ao longo de passagens alternadas entre hospedeiros invertebrado e vertebrado.

Autor: Vitor Antonio Lemos do Bem

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta de Lana

Co-Orientador: Dr. Evandro Marques de Menezes Machado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre; área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

**Ouro Preto, MG.
2011**

B455c

Bem, Vitor Antonio Lemos do

Comportamento biológico e caracterização molecular de infecção mista com clones de *Trypanosoma cruzi* ao longo de passagens alternadas entre hospedeiros invertebrado e vertebrado [manuscrito] / Vitor Antonio Lemos do Bem - 2011. 90 f.: il. color.; graf.; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta de Lana.

Co-orientador: Prof. Dr. Evandro Marques de Menezes Machado

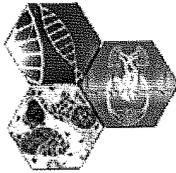
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 2. *Triatoma infestans* - Teses. 3. Relação hospedeiro-parasita - Teses. 4. Infecção mista - Teses. 5. Caracterização molecular - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.99:616.937

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

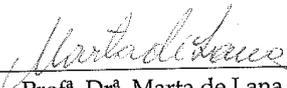


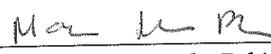
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

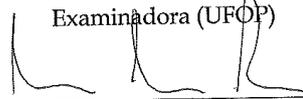
“Comportamento biológico e caracterização molecular de infecção mista constituída por clones de *Trypanosoma cruzi* de genética distinta ao longo de passagens alternadas entre hospedeiros invertebrado, vertebrado e invertebrado”

Aos 15 dias do mês de dezembro de 2011, às 14:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno Vitor Antonio Lemos do Bem. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR..... o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:


Prof.ª. Dr.ª. Marta de Lana
Presidente


Prof.ª. Dr.ª. Maria Terezinha Bahia
Examinadora (UFOP)


Prof. Dr. Marcos Horácio Pereira
Examinador (UFMG)

DATA DA DEFESA: 15/12/2011

Na história da humanidade e dos animais aqueles que aprenderam a colaborar e improvisar foram os que prevaleceram.

Charles Darwin

Agradeço aos meus pais Lauriano e Arlene, ao meu irmão Luciano, demais familiares e a todos meus amigos pela força e incentivo que me permitiram superar as batalhas da vida e a concretização de um sonho...

Agradecimentos

Agradeço a DEUS por ter me dado a capacidade de estudar a vida.

À Prof^a. Marta de Lana, por abrir as portas do mundo da ciência e me orientar desde minha graduação. Pessoa pela qual tenho admiração, carinho e gratidão. Agradeço pelos ensinamentos, confiança, estímulos, apoio e oportunidade para realizar este projeto. Meu muito obrigado.

Ao Prof. Evandro, que aceitou co-orientar o trabalho. Pessoa que não poupou esforços e se mostrou sempre disposto a ajudar e sanar as dúvidas que surgiam no dia-dia.

À Prof^a. Helen, pelos ensinamentos desde a iniciação científica. Por me receber em seu laboratório em Diamantina e compartilhar os conhecimentos da técnica de isoenzimas. Concomitantemente agradeço as conversas que me auxiliaram na elaboração deste trabalho.

À Prof^a. Vanja, pela sua disposição e colaboração no RAPD. Obrigado.

Ao Auffy por me co-orientar na iniciação científica e pela amizade que construímos ao longo desses anos.

Aos Prof. André Talvani e Prof^a. Maria Terezinha Bahia pelos exemplos de profissionalismo e dedicação científico-acadêmica. Admiro muito vocês.

Aos professores do NUPEB que ajudaram de forma indireta ou direta nessa caminhada, com espaço físico, empréstimo de equipamentos ou mesmo reagentes, além dos ensinamentos teóricos.

Aos técnicos do laboratório de doença de Chagas, CCA-UFOP por sempre estarem dispostos para ajudar no que era preciso.

Aos colegas que convivi no LADOC: Jack, Ivo, Livia, Renata, Maykon, Glaucia, Guilherme, Maíra, Magna, Tassiane, Fernanda, Karina, Tamires, Vivian, Carol e Alvaro.

Aos alunos de IC Carlos Magno, Carlos (Feijuada) e Paula que me ajudaram na realização deste trabalho, sem esta ajuda a conclusão seria impossível.

Aos colegas do LIMP e LPC.

Aos amigos da república UNIDOS POR ACASO minha casa em Ouro Preto. E os amigos Bevis, Acefalia e Tulio pela convivência na república CASA DO JOÃO.

A toda minha família porto seguro, obrigado pelo amor, apoio e confiança. TE AMO LAURIANO, ARLENE e LUCIANO!

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Neste trabalho, foi avaliado o impacto das passagens alternadas pelos hospedeiros invertebrado, vertebrado e invertebrado nas propriedades biológicas e genéticas das populações de parasitos em infecção mista. Desta forma, um clone de *T. cruzi* representante da DTU TcI (P209 cl1) e outro da DTU TcII (CBB cl3) foram utilizados para constituir a infecção mista. Foram avaliados o estabelecimento e o desenvolvimento da infecção mista (TcI+TcII) no hospedeiro invertebrado (ninfas de terceiro estágio de *Triatoma infestans*), seguida de sua passagem pelo hospedeiro vertebrado (camundongo *Swiss*) e novamente pelo hospedeiro invertebrado (*T. infestans*). A primeira infecção dos triatomíneos (n=40) foi feita por xenodiagnóstico artificial (XAHI - primeira etapa) com 15×10^3 epimastigotas, em meio LIT, adicionado de sangue de camundongos. Após trinta dias, os insetos foram avaliados individualmente em relação ao número de flagelados por inseto (NFI), percentuais de infectividade (%INF) e percentuais de metaciclogênese (%DIF) e os resultados comparados com as infecções monoclonais (TcI ou TcII) correspondentes. Os parasitos isolados do XAHI foram utilizados para infectar artificialmente os hospedeiros vertebrados (n=16 camundongos *Swiss*), via IP com inóculo de 1×10^3 tripomastigotas metacíclicos, (IAHV – segunda etapa). Neste hospedeiro a parasitemia e infectividade foram avaliadas por ESF, HC e PCR. Trinta dias após a infecção, os camundongos foram submetidos ao xenodiagnóstico natural (XNHI – terceira etapa), e desse modo, outros triatomíneos foram infectados e avaliados pelos mesmos parâmetros utilizados na primeira etapa. A cada etapa, os reisolados do parasito foram caracterizados molecularmente pelo perfil eletroforético de Isoenzimas, gene rDNA 24S α e RAPD. Na primeira etapa, a infecção mista por XAHI apresentou perfil de desenvolvimento similar ao de TcII em relação ao NFI e %INF, porém, para o %DIF os valores foram superiores do que o observado nas infecções monoclonais. A caracterização molecular revelou que a infecção mista estava presente em 100% das amostras originadas destes triatomíneos (XAHI). Na segunda etapa, apenas um camundongo do grupo infectado com infecção mista (TcI+TcII) apresentou parasitemia patente. Nos outros animais a infecção foi confirmada por HC e PCR, sendo esta última feita apenas nos animais com HC negativa. Os percentuais de animais infectados expostos à infecção mista, monoclonal (Tc I) e monoclonal (Tc II) foram de 62%, 44% e 19% respectivamente. A caracterização molecular de isolados provenientes de camundongos expostos à infecção mista demonstrou a presença de infecção mista (TcI+TcII) em 40% dos animais e nos outros 60% apenas a DTU TcI foi detectada. Na terceira etapa, os triatomíneos que se alimentaram nos animais com infecção mista apresentaram NFI, %INF e %DIF significativamente maiores do que o observado nos que se alimentaram em animais com infecções monoclonais. As análises moleculares revelaram apenas a presença de TcI nos triatomíneos que se alimentaram em animais expostos infecção mista por XNHI (terceira etapa). Após as passagens alternadas entre os diferentes hospedeiros foi observado que a mistura de populações de *T. cruzi* apresentou padrões biológicos distintos em relação às infecções monoclonais correspondentes, favorecendo a transmissão entre os hospedeiros. Entretanto, apenas o grupo TcI foi detectado ao final de todas as passagens. Sendo assim os resultados sugerem que durante as passagens alternadas de infecções mistas, compostas por parasitos genética e biologicamente distintos, por diferentes hospedeiros, ocorre seleção de populações do *T. cruzi*, representando assim “filtros biológicos”, o que causaria impacto na sua transmissão e conseqüentemente na epidemiologia da doença de Chagas.

This work evaluated the impact of cyclical alternate passages - invertebrate, vertebrate and invertebrate hosts - in biological properties and genetic characteristics of the parasites populations. Thus, one clone representative of TcI DTU (P209cl1) and one representative of TcII DTU (CBBcl3) of *T. cruzi* were used to form the mixed infections. It was evaluated the establishment and development of mixed infection (TcI+TcII) in invertebrate host (third instar nymphs of *Triatoma infestans*) followed of vertebrate host (Swiss mice) and again in the invertebrate host (*T. infestans*). The first group of triatomines (n=40) infection was performed by artificial xenodiagnosis (AXIH – first step) with 15×10^3 epimastigotes of LIT media added of uninfected mice blood. After 30 days the insects were individually evaluated in relation to number of flagellates by insect (NFI), percentage of infection (% INF) and percentage of parasite differentiation (% DIF) and the results obtained compared with the corresponding monoclonal infections (TcI or TcII). Parasites isolated of AXIH were used to infect artificially the vertebrate host (n=16 mice) by IP route using the inoculum of 1.0×10^3 metacyclic trypomastigotes (AIVH – second step). In this host the parasitemia and infectivity were evaluated by ESF, HC and PCR. Thirty days after the infection mice were submitted to natural xenodiagnosis (NXIH – third step) and at this way other group of triatomíneos (n=40) were infected and evaluated by the same parameters used in the first step. At each stage parasites were isolated for molecular characterization by isoenzymes electrophoresis, rDNA 24S α gene and RAPD. In the first step the mixed infection by AXIH showed similar profile of TcII in relation to NFI and % INF, but the % DIF was higher than the observed in the monoclonal infections. The molecular characterization revealed that mixed infection was present in 100% of the samples of the artificially infected triatomines (AXIH). In the second step only one mouse infected with mixed infection (TcI+TcII) presented patent parasitemia. In the other animals the infection was confirmed by HC and PCR and this last technique was performed only in mice with HC negative HC. The percentage of infected mice (% INF) exposed to mixed infection, monoclonal (Tc I) and monoclonal (Tc II) were 62%, 44% and 19% respectively. The molecular characterization of the isolates of mice exposed to mixed infection showed its presence in 40% of the animals; in the others mice only TcI was detected. In the third step the triatomines that were fed in mice with mixed infection showed NFI, % INF and % DIF significantly higher than the observed in monoclonal infections. The molecular diagnosis techniques revealed only TcI in the triatomines exposed to mixed infection by natural xenodiagnosis (NXIH - third step). After cyclical passages it was observed that the mixed *T. cruzi* infections presented distinct biological parameters than the correspondent monoclonal infections and was better transmitted among the different hosts. Only TcI was detected in all reisolated samples. Thus, the results suggest that during the cyclical passages the mixed infections formed by parasites genetic and biologically distinct (mixed infections) by different hosts could to represent biological filters that may select *T. cruzi* populations with great impact on its transmission and consequently in Chagas disease epidemiology.

Lista de Figuras

- Figura 1** - Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* 6
- Figura 2** - A - Vista superior do aparelho utilizado no sistema de alimentação artificial. A seta indica o recipiente central coberto por membrana látex onde a mistura de parasitos e sangue é colocada. B - Representa o mesmo aparelho com o pote de insetos em alimentação. A seta indica o local de abastecimento do aparelho com o inóculo..... 28
- Figura 3** - Repasto infectante de ninfas de terceiro estágio de *Triatoma infestans* em camundongos experimentalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. 29
- Figura 4** - Percentual de positividade de hemoculturas de camundongos infectados com isolados de clones de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcII (infecções monoclonais) e TcI+TcII (infecção mista) após a passagem no hospedeiro invertebrado..... 40
- Figura 5** - Percentual de xenocultura positiva (%XC) de triatomíneos infectados com clones de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcI+TcII (infecção mista) trinta dias após do repasto em camundongos infectados com tripomastigoras metacíclicas. 43
- Figura 7** - Perfil isoenzimático da enzima GPI dos isolados de *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros invertebrado, vertebrado e invertebrado infectados com clones de TcI e TcII. 45
- Figura 8** - Diagrama representativo do perfil eletroforético das enzimas (GPI, IDH e G6PD) dos isolados *Trypanosoma cruzi* provenientes do grupo de infecção mista. 1: Ref. TcI (P209 cl1); 2: Ref. TcII (CBB cl3); 3: amostra 5; 4: amostra 6; 5: amostra 12 ; 6: amostra 13; 7: amostra 14; 8: amostra 15; 9: amostra 16; 10: amostra 20; 11: amostra 22; 12: amostra 23. 46
- Figura 9** - Gel de poliacrilamida a 6% representativo da amplificação pela PCR, da região 3' do gene rDNA 24 Sα para os clones P209 cl1 e CBB cl3 de *Trypanosoma cruzi* e seus isolados após passagem alternada entre hospedeiro invertebrado (XAHI) vertebrado (IAHV) e invertebrado (XNHI). Canaletas: **1:** Ref. PM 100 pb; **2:** Referência TcI; **3:** Referência Tc II; **4:** amostra-1; **5:** amostra 7; **6:** amostra 17; **7:** amostra 3; **8:** amostra 10; **9:** amostra 11; **10:** amostra 5; **11:** amostra 6; **12:** amostra 12; **13:** amostra 13; **14:** amostra 14; **15:** amostra 15; **16:** amostra 16; **17:** amostra 22; **18:** Branco. **Retângulo representa isolados do grupo IAHV**..... 48
- Figura 10** - Gel de Agarose 1% representativo com os perfis de RADP obtidos pelos iniciadores (A10) para os clones P209 cl1 e CBB cl3 de *Trypanosoma cruzi* e seus isolados após passagem alternada entre hospedeiro invertebrado (XAHI) e vertebrado (IAHV). Canaletas: **1:** Ref. PM 1 Kb; **2:** Ref. TcI clone P209 cl1; **3:** Ref. TcII clone CBB cl3; **4:** Amostra 17; **5:** Amostra 10; **6:** Amostra 5; **7:** Amostra 6; **8:** Amostra 13; **9:** Amostra 14; **10:** Amostra 15; **11:** Amostra 16; **12:** Amostra 12; **13:** Amostra 20; **14:** Amostra 21; **15:** Amostra 22; **16:** Amostra 23; **17:** branco. 49
- Figura 11** - Resultado da caracterização isoenzimática e molecular dos isolados de *T. cruzi* originados dos hospedeiros invertebrados (XAHI)-vertebrado (IAHV)-invertebrado (XNHI) infectados com TcI (A), TcII (B) e mistura dos clones TcI+TcII (C). 51

Lista de Tabelas

Tabela I - Nomenclatura adotada atualmente e suas correspondências com classificações adotadas anteriormente.	11
Tabela II - Histórico dos clones de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizados nesse estudo.	24
Tabela III - Composição dos grupos experimentais realizados nos hospedeiros invertebrado, vertebrado e invertebrado.	30
Tabela IV - Condições eletroforéticas e de revelação usadas para os sistemas enzimáticos estudados.	35
Tabela V - Peso dos <i>Triatoma infestans</i> antes e após o repasto artificial infectante com formas epimastigotas de clones de <i>Trypanosoma cruzi</i> TcI e TcII e TcI+TcII (infecção mista).	38
Tabela VI - Número de flagelados por insetos (NFI), percentual de infectividade (%INF) e percentual de diferenciação (%DIF) em <i>Triatoma infestans</i> infectados por clones de <i>Trypanosoma cruzi</i> TcI, TcII e TcI+TcII (infecção mista) trinta dias após o xenodiagnóstico artificial infectante.	39
Tabela VII - Peso dos <i>Triatoma infestans</i> antes e após o repasto infectante em camundongos infectados com isolados de clones de <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
Tabela VIII - Número de flagelados por insetos (NFI), percentual de infectividade (%INF) e percentual de metaciclogênese (%DIF) em triatomíneos que realizaram o repasto em camundongos infectados com tripomastigota metacíclicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
Tabela IX - Código de identificação, hospedeiro de origem, DTU de <i>Trypanosoma cruzi</i> que constituiu o inóculo, e origem das amostras submetidas à caracterização molecular e isoenzimática.	44

Lista de Abreviaturas

%DIF	Percentual de diferenciação (metaciclogênese)
%HC+	Percentual de Hemoculturas positivas
%INF	Percentual de Infectividade
%XC+	Percentual de Xenocultura positivas
ATP	Adenosina Trifosfato
CCA	Centro de Ciências Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
d.a.i.	Dias após a infecção
DCh	Doença de Chagas
dNTP's	2' desoxinucleotídeos-5'-trifosfato
DTU	<i>Discrete Typing Unity</i>
EDTA	Ácido etilenodietildinitritoteracético
EP	Erro Padrão
FCB	Ferrovias centrais do Brasil
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPI	Glicose-6-fosfato isomerase
HC	Hemocultura
IAHV	Infecção artificial do hospedeiro vertebrado
IDH	Isocitrato desidrogenase
IP	Intraperitoneal
Kdna	DNA do cinetoplasto
LIT	<i>Liver Infusion Triptose</i>
MORT	Mortalidade
NFI	Número de flagelados por insetos
pb	Pares de bases
PAR	Parasitemia

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
rDNA	Gene ribossômico 24 S α
Rpm	Rotações por minuto
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
X²	Teste do qui-quadrado
XAHI	Xenodiagnóstico artificial do hospedeiro invertebrado
XC	Xenocultura
XNHI	Xenodiagnóstico natural do hospedeiro invertebrado
Z	Zimodema

Sumário

1.0 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.3 – <i>Trypanosoma cruzi</i> : variabilidade genética e propriedades biológicas	7
1.3.1 – Variabilidade genética do <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.3.2 - Origem e epidemiologia dos grupos principais do <i>T. cruzi</i>	12
1.3.3 - Impacto da manipulação do parasito em suas propriedades biológicas	15
1.3.4 - Impacto da diversidade biológica na interação parasito e hospedeiro invertebrado	16
1.3.5 - Impacto da diversidade biológica na interação parasito-hospedeiro vertebrado	18
2.0 – JUSTIFICATIVA	22
3.0 - OBJETIVOS	23
3.1 – Objetivo geral	23
3.2 - Objetivos específicos	23
4.0 - ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 – Parasitos.....	24
4.2 – Hospedeiro invertebrado: <i>Triatoma infestans</i>	24
4.3 – Hospedeiro vertebrado: camundongos Swiss	25
4.4 - Infecções e avaliações realizadas nos hospedeiros invertebrados e vertebrados	25
4.5.1 – Infecção por xenodiagnóstico artificial do hospedeiro invertebrado: sistema de alimentação artificial (XAHÍ).....	27
4.5.2 – Infecção artificial no hospedeiro vertebrado (IAHV).....	28
4.5.3 – Infecção por xenodiagnóstico natural do hospedeiro invertebrado (XNHI) ...	28
4.6 - Parâmetros avaliados durante as infecções experimentais	30
4.6.1 – No hospedeiro invertebrado	30
4.6.1.1 – Determinação do número de flagelados por inseto (NFI)	30
4.6.1.2 – Determinação do percentual de infectividade (% INF)	31
4.6.1.3 – Determinação do percentual de metacicloquênese (% DIF)	31
4.6.1.4 - Xenocultura (XC).....	31
4.6.2 - No hospedeiro vertebrado	32
4.6.2.1 - Exame de sangue a fresco (ESF).....	32
4.6.2.2 - Hemocultura (HC).....	32
4.6.2.3 - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	32
4.6.2.3.1 - Extração de DNA de sangue	32
4.6.2.3.2 - Amplificação do kDNA do <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
4.6.3 - Infectividade (%INF)	33

4.6.4 - Parasitemia (PAR).....	33
4.6.5 - Mortalidade (MORT)	33
4.7 - Caracterização isoenzimática e molecular dos <i>T. cruzi</i> de todas as infecções experimentais (hospedeiro invertebrado, vertebrado e invertebrado)	34
4.7.1 - Obtenção do extrato celular para caracterização isoenzimática e molecular ...	34
4.7.2 - Caracterização isoenzimática	34
4.7.4 - Dosagem do DNA genômico	36
4.7.5 - Amplificação da região 3' do gene rDNA 24S α	36
4.7.6 - Caracterização pelo perfil de RAPD	37
4.7.6.1 - Amplificação do DNA genômico.....	37
4.8 - Análise estatística.....	37
5.0 – RESULTADOS	38
5.1 – Avaliação da infecção por xenodiagnóstico artificial do hospedeiro invertebrado (XAH)	38
5.1.1 – Número de parasitos ingeridos	38
5.1.2 – Mortalidade dos insetos após alimentação artificial.....	38
5.1.3 – Número de flagelados por inseto (NFI).....	38
5.1.4 – Percentual de infectividade (%INF)	39
5.1.5 – Percentual de metaciclogênese (%DIF).....	39
5.2 – Avaliação da infecção nos hospedeiros vertebrado (IAHV)	40
5.2.1 – Parasitemia (PAR)	40
5.2.2 – Hemocultura (HC)	40
5.2.4 – Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	41
5.3 – Avaliação da infecção por xenodiagnóstico natural do hospedeiro invertebrado (XNHI)	41
5.3.1 – Número de parasitos ingeridos no repasto em sistema de alimentação artificial	41
5.3.2 – Mortalidade dos insetos após a alimentação natural	41
5.3.3 - Número de flagelados por inseto (NFI).....	41
5.3.4 – Percentual de infectividade (%INF)	42
5.3.5 - Percentual de metaciclogênese (%DIF)	42
XAH - Infecção por xenodiagnóstico artificial do hospedeiro invertebrado	44
5.5.1.1 - Infecções monoclonais	45
5.5.1.2 - Infecções mistas	45
5.5.2 – Análise da amplificação da região 3' do gene rDNA 24S α	47
5.5.2.1 - Infecções monoclonais	47
5.5.3 – Análise do perfil RAPD.....	49
5.5.3.1- Infecção monoclonal	49

6.0 – DISCUSSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1 - Doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas (DCh) foi descoberta em 1909 pelo grande pesquisador brasileiro, Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, quando no ano de 1907 foi designado para avaliar um surto de malária que acometia operários que trabalhavam na obra da Ferrovia Central do Brasil (FCB) na região Norte do Estado de Minas Gerais. Carlos Chagas foi informado por um engenheiro da FCB da existência de um inseto hematófago, popularmente conhecido como barbeiro abundante na região, que possuía a capacidade de proliferar dentro das residências. Ao dissecar os insetos, Carlos Chagas encontrou flagelados com morfologia semelhante a das critídias. Ele enviou exemplares dos barbeiros infectados para Oswaldo Cruz, que realizou infecções experimentais com o parasito e pode confirmar que o mesmo, era capaz de infectar macacos. Posteriormente, Carlos Chagas pode perceber que se tratava de um novo organismo e o descreveu como *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* em seu clássico trabalho de 1909 (Chagas, 1909). Além disso, esse pesquisador relatou o ciclo biológico deste protozoário nos hospedeiros invertebrados e vertebrados e alguns aspectos da patologia provocada por este novo parasito (Chagas, 1909).

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, cujos membros apresentam uma organela autoreplicável que contém DNA – o cinetoplasto. Este parasito é digenético, ou seja, seu ciclo de vida consiste em passagens obrigatórias por dois hospedeiros distintos (Brenner, 1992).

Segundo Jansen (2010), o *T. cruzi* teria surgido há cerca de 80 milhões de anos no supercontinente Gondwana, tendo como primeiros hospedeiros, animais da fauna de Marsupiais e Xenarthra que apresenta ampla distribuição geográfica, no Norte, Centro e Sul do continente americano. Pesquisadores afirmam que é possível isolar esse protozoário de mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes ordens. Muitos desses animais são considerados reservatórios naturais e podem apresentar pouco ou nenhum sinal clínico decorrente da infecção por esse parasito (Deane *et al.*, 1964; Lent e Wygodzinsky, 1979; Devera *et al.*, 2003). A Tripanossomíase originalmente enzoótica, não pode ser erradicada e a única possibilidade de intervenção no controle da transmissão natural da DCh é sobre o ambiente, reduzindo ou eliminando as chances de contato do parasito com humanos (Silveira, 2000).

A doença de Chagas humana (DCh) pode ser considerada uma situação muito mais recente nessa visão histórica, sendo originada a partir de ações antrópicas no ambiente silvestre, que provocaram mudanças drásticas nesse sistema ecológico (Barretto, 1979; Dias, 1993; Forantini, 1980; Dias, 2000; Coura *et al.*, 2007). Desse modo, a tripanossomíase americana passou à condição de antropozoonose, quando humanos invadiram os ambientes silvestres, destruindo florestas, alterando a fauna e construindo habitações precárias.

A ocupação humana nestes espaços permitiu que as espécies de triatomíneos vetores adaptassem aos ecótopos artificiais, passando os humanos a ser fonte de alimento desses insetos. Com essas modificações, foram estabelecidos dois ciclos de transmissão: o silvestre e o peridoméstico/doméstico (Buscaglia e Di Noia, 2003; Coura *et al.*, 2007). Até o momento já foram descritas 140 espécies de insetos, da classe Hemiptera, família Reduviidea e subfamília Triatominae, insetos de hábito exclusivamente hematófago e provavelmente todos podem ter a capacidade de transmitir o *T. cruzi*. Apenas algumas espécies são consideradas vetores competentes do *T. cruzi* para o ciclo doméstico (Lent e Wygodzinsky, 1979; Scholfield e Galvão, 2009).

A via de transmissão do *T. cruzi* responsável pela manutenção da endemia é a vetorial, pelo contato de fezes e/ou urina contaminadas com formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* com mucosas ou pele lesionada (Dias, 1979). O parasito pode ser transmitido também por outras vias como a transfusional que é considerada a segunda mais importante nos países onde não há controle nos bancos de sangue (Schmunis, 1999); a congênita ou vertical, com importante impacto na epidemiologia da doença como podem ser observadas em regiões com altas taxas de transmissão como na Bolívia e Chile (Carlier e Truyenr, 2010); além de outros mecanismos como a via oral, transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (Dias, 2000; Coura *et al.*, 2007; Dias e Neto 2011). Estudos mais recentes desenvolvidos na Amazônia demonstraram a importância crescente da via oral na epidemiologia da DCh naquela região (Valente *et al.*, 1999; Coura *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2008).

Considerando a epidemiologia da DCh, o foco do controle se concentra no combate à transmissão vetorial, transfusional, congênita (pós-natal) e atualmente a oral (WHO, 2002). Alguns programas elaborados em conjunto por diferentes países obtiveram êxito no combate à enfermidade, como a iniciativa dos Países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai) em 1991 (Scholfield e Dias, 1999; Moncayo, 1999) e

dos Países Andinos (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) em 1997 (WHO, 1997; Moncayo, 1999). O alvo de ação desses programas foi a interrupção do ciclo de transmissão domiciliar com a eliminação dos principais vetores domiciliados e programas para melhorar as condições de controle e qualidade das transfusões e, dessa forma, impedir a transmissão do *T. cruzi* (Silveira, 2000; Dias *et al.*, 2002; Moncayo e Silveira, 2009).

Contudo, vale ressaltar os recentes surtos ocorridos no Brasil provocados pela transmissão oral, por meio do consumo de alimentos contaminados com o *T. cruzi* (Steindel *et al.*, 2005; Coura *et al.*, 2007; Nobrega *et al.*, 2009), reforçando a importância dessa via de transmissão no panorama epidemiológico atual da DCh. Além disso, a pobreza e problemas políticos têm estimulado a migração de indivíduos infectados crônicos originados de regiões endêmicas para países desenvolvidos onde a DCh não é endêmica. Isto tem representado um importante fator de risco para a transmissão transfusional, congênita e por transplante de órgãos nesses países onde não existe um controle rígido nos bancos de sangue, como tem sido descrito na Espanha e Estados Unidos (Schmunis, 2007; Coura e Viñas, 2010).

A prevalência da DCh diminuiu significativamente quando comparados aos dados observados em décadas passadas, principalmente, devido aos programas de controle e mudanças nas condições socioeconômica da população (Silveira, 2000; Moncayo e Silveira, 2010). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima a existência de aproximadamente 10 milhões de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* no mundo e, mais 25 milhões de pessoas na América Latina estão sob o risco de contrair a infecção. Foi estimado ainda que no ano de 2008, houve mais de 10.000 mortes em decorrência da DCh sintomática (WHO, 2010).

A DCh é caracterizada por duas fases distintas e sucessivas: a fase aguda e a crônica. A fase inicial ou aguda (com duração de dois a quatro meses) é caracterizada do ponto de vista laboratorial pela presença de parasitos circulantes no sangue periférico por meio do exame direto. Em alguns casos, o indivíduo infectado pode apresentar, após oito a 10 dias da penetração do parasito, manifestações clínicas como os sinais de porta de entrada (sinal de Romaña e Chagoma de inoculação), adenopatia generalizada, edema e uma doença febril inespecífica com hepatoesplenomegalia. Casos mais graves geralmente estão associados a crianças menores de dois anos com severa miocardite e meningoencefalites, podendo até provocar a morte em 5-10% casos não tratados. Porém, na maioria dos pacientes esta fase é assintomática (90% dos casos). Os indivíduos que

sobrevivem à fase aguda evoluem para fase crônica (Rassi, 2000; Prata, 2001; Rassi, 2010), na qual a maioria (50-70%) dos infectados permanece por longos períodos sem apresentar manifestações clínicas, radiológicas e eletrocardiográficas, de acometimento cardíaco e ou digestivo, denominada nessa condição, de forma indeterminada da DCh. Este estado de latência pode persistir por 10-30 anos ou pela vida toda do indivíduo infectado (Ribeiro, 1998). Embora assintomáticos esses indivíduos apresentem reação sorológica positiva para *T. cruzi* e parte dos pacientes podem apresentar xenodiagnóstico, hemocultura e PCR positivos (Prata, 2001).

Na fase crônica os pacientes podem progredir para formas sintomáticas que são caracterizadas pelo comprometimento funcional do coração, esôfago e colón ou a combinação de alterações nesses órgãos, resultando em três principais formas clínicas: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (Prata, 2001; Rassi *et al.*, 2000; Marin-Neto *et al.*, 2007).

Vários estudos têm demonstrado que a distribuição geográfica das manifestações clínicas é bastante diversa na América Latina. Na Argentina, Bolívia, Brasil, Equador, Paraguai, Uruguai e Venezuela a presença dos ciclos de transmissão silvestre, peridoméstico e doméstico estão bem caracterizadas. Estes países possuem uma alta prevalência da infecção humana pelo *T. cruzi* e presença das formas crônicas cardíacas e digestivas. Na Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá encontramos também os ciclos domésticos, peridoméstico e silvestre e os pacientes infectados apresentam a forma cardíaca da DCh, sendo raros os casos de formas digestiva da DCh (Coura e Viñas, 2010). A razão para heterogeneidade e o porquê os pacientes desenvolvem diferentes formas clínicas ainda é uma lacuna que precisa ser elucidada (Macedo *et al.*, 2002; Milles *et al.*, 2003). Recentemente, vários estudos demonstram que cepas de *T. cruzi* são frequentemente multiclonais e, provavelmente muitos indivíduos estão infectados por vários clones. Isso pode apresentar um impacto no curso clínico da DCh, o que poderia explicar, em parte, a grande variabilidade de formas clínicas dessa enfermidade. Estudos experimentais reforçam essa hipótese ao revelar que nas infecções mistas o perfil biológico, tropismo tecidual e resposta ao tratamento são diferentes quando comparados aos de infecções monoclonais (Pinto *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 1999; Lana *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2010). Nesse sentido, as consequências da infecção de um indivíduo são decorrentes do conjunto de interações complexas entre características

genéticas do hospedeiro, fatores ambientais e sociais, bem como a composição genética do parasito, que pode ser alterada e agravada por re-infecções e ou infecções mistas (Campbell *et al.*, 2004).

1.2 – O ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e consiste em um ciclo extracelular nos hospedeiros invertebrados e um ciclo intracelular nos hospedeiros vertebrados. Ao longo desses ciclos, o parasito apresenta diversas formas evolutivas típicas e específicas a cada hospedeiro. As formas replicativas são representadas pelas epimastigotas, encontradas no trato digestório de hospedeiros invertebrados e pelas amastigotas, encontradas no interior das células do hospedeiro vertebrado. As formas consideradas infectantes e não replicativas, denominadas tripomastigotas metacíclicas e tripomastigota sanguíneas, são encontradas no hospedeiro invertebrado e vertebrado, respectivamente (Brenner, 1972; 1973; 1979). O ciclo do *T. cruzi* no invertebrado foi apresentado detalhadamente no trabalho de Carlos Chagas, incluindo morfogênese e formação de tripomastigotas metacíclicos (Chagas, 1909). Porém, o modelo que é aceito atualmente foi descrito no trabalho de Dias (1934), com ligeiras modificações, como a descrição da esferomastigotas por Brack (1968).

Muitos fatores que influenciam o desenvolvimento do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado vêm sendo descritos (Garcia e Azambuja, 1991; Kollien e Schaub, 2000) tais como: morfologia do *T. cruzi* e as cepas ou clone do parasito. O estado nutricional do hospedeiro invertebrado bem como a microbiota do tubo digestório e gênero do inseto vetor (Brenner, 1972; Schaub, 1989; Garcia e Azambuja, 1991, Kollien e Schaub, 2000; Carvalho-Nogueira *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2007). A evolução do parasito no inseto vetor ao longo do tempo tem promovido uma estratégia de mecanismos adaptativos sofisticados, que dependem tanto da espécie do inseto vetor quanto da cepa do parasito e podem funcionar para facilitar ou interromper o seu desenvolvimento no inseto (Garcia *et al.*, 2007).

O ciclo no hospedeiro invertebrado inicia-se quando o inseto hematófago realiza o repasto em mamífero infectado e, junto com o sangue ele adquire formas tripomastigotas sanguíneas (Chagas, 1909; Brenner, 1979). Após a alimentação, no estômago, as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e ou esferomastigotas (Brack, 1968; Zeledon, 1987; Garcia *et al.*, 1982). Uma vez estabelecida no intestino, principalmente na porção posterior, as epimastigotas se multiplicam por divisão binária simples longitudinal.

No intestino os epimastigotas se aderem à membrana perimicrovilar das células intestinais (Zeledon, 1997; Gonzalez *et al.*, 1999); em seguida elas migram em direção a região posterior do intestino.

Na ampola retal, as epimastigotas aderem à cutícula iniciando a metacicloênese, processo no qual as formas epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicas, sendo eliminados posteriormente nas fezes e/ou urina completando assim o ciclo neste hospedeiro (**Figura 1**) (Dias, 1934; Brener, 1972; Brener, 1976; Garcia e Azambuja, 1991; Kollien e Schaub, 2000; Schaub, 2009).

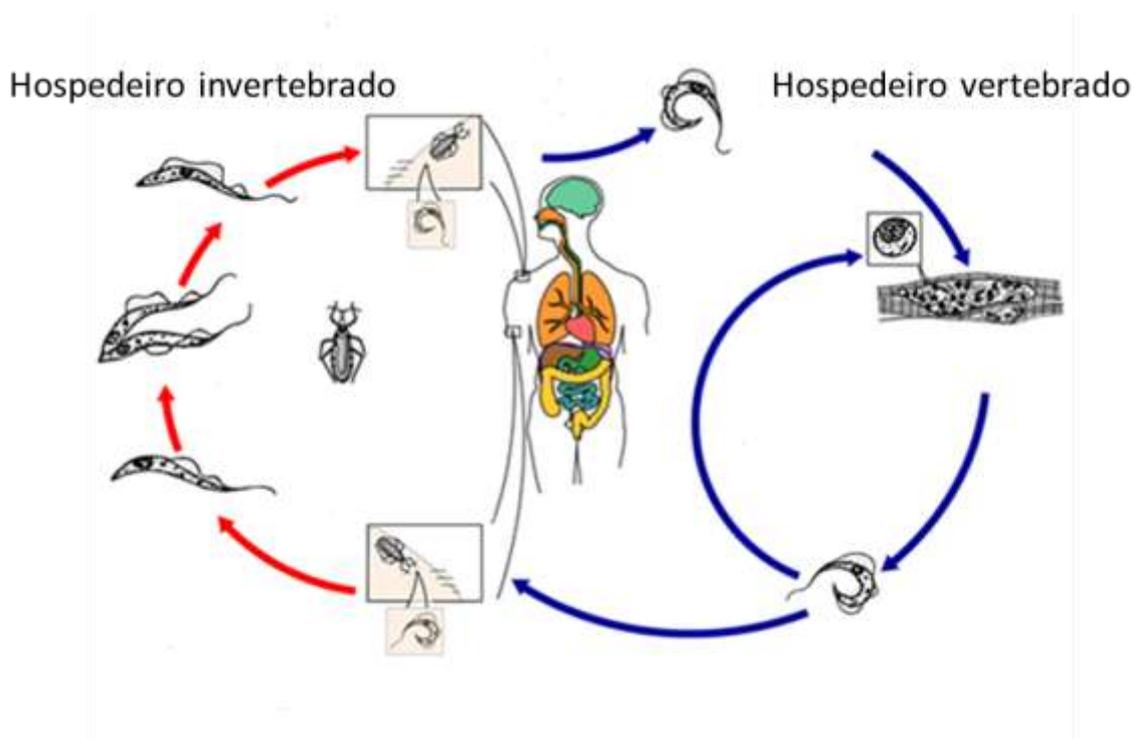


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* (adaptada CDC, 2011).

Todas as formas do parasito originárias do vetor podem interagir com o hospedeiro vertebrado, entretanto, apenas algumas formas conseguem infectar e completar o ciclo no interior das células deste hospedeiro. Alguns estudos demonstraram que a forma infectante, a cepa ou a origem do parasito e o tipo de célula hospedeira são fundamentais nesta interação (De Souza, 2002; Fernandes *et al.*, 2007), ao longo da qual ocorrem vários eventos que envolvem tanto moléculas do parasito quanto do hospedeiro (Lana e Machado, 2010).

No hospedeiro vertebrado tripomastigotas metacíclicos que são liberadas nas fezes e/ou urina do vetor penetram no local da picada, lesões na pele ou nas mucosas, podendo, em seguida, penetrar em qualquer célula nucleada, principalmente as células do sistema mononuclear fagocitário. O *T. cruzi* pode ser fagocitado, por meio de mecanismo fagocitário típico ou pode penetrar ativamente na célula do hospedeiro por meio de um processo semelhante à endocitose. As células musculares são as mais as parasitadas na fase crônica da infecção após o desenvolvimento da imunidade específica contra o parasito que ali persiste por toda a vida do hospedeiro.

No interior da célula hospedeira ocorre a diferenciação em formas amastigotas que se multiplicam por divisão binária simples. Após alguns ciclos de divisão, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que após o rompimento das células infectadas são liberadas no sangue e podem penetrar em outras células iniciar um novo ciclo ou serem ingeridas pelo inseto vetor durante seu repasto sanguíneo (**Figura 1**) (De Souza, 2002).

1.3 – *Trypanosoma cruzi*: variabilidade genética e propriedades biológicas

1.3.1 – Variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* compreende uma população heterogênea, composta de subpopulações com características biológicas e genéticas distintas que circulam entre os humanos, vetores, reservatórios silvestres e animais domésticos (Souto *et al.*, 1996; Buscaglia e Di Noia, 2003). Análises realizadas em diversos isolados do parasito demonstraram uma enorme diversidade, evidenciada por diferenças morfológicas (Chagas, 1909; Brumpt, 1912; Brener e Chiari, 1963), comportamento biológico em animais de laboratório e meios de cultura (Andrade, 1985; Andrade e Magalhães, 1997, Lauria-Pires *et al.*, 1997; Toledo *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2010), desenvolvimento no vetor (Dvorak, 1980; Lana, *et al.*, 1998), susceptibilidade a agentes quimioterápicos (Brener *et al.* 1976; Filardi e Brener, 1987; Toledo *et al.*, 2002), composição antigênica e resposta imunológica (Krettl e Brener, 1982), perfis enzimáticos (Miles, 1978; Miles, 1983; Tibayrenc e Ayala, 1988) e moleculares (Morel *et al.*, 1980a; 1980b; Macedo *et al.*, 1992; Tibayrenc *et al.*, 1993; Souto *et al.*, 1996; Zingales *et al.*, 1998).

Nesse contexto, para melhor compreensão do papel da diversidade biológica em diversos aspectos relacionados à DCh, incluindo ciclo de transmissão, resposta a quimioterapia, patogênese, dentre outros, é necessário o estudo de caracterização das populações encontradas nos ambientes naturais (WHO, 1991). Com o surgimento de novos

marcadores moleculares, possibilitou-se o estudo da DCh com ênfase na genética de populações, de parasitos e sua correlação com a cadeia epidemiológica (agente, vetor e hospedeiro), permitindo inferir o impacto de sua diversidade genética nas propriedades biológicas do parasito e epidemiológicas da DCh (Tibayrenc, 1998).

Várias metodologias vêm sendo aplicadas em nível de DNA mitocondrial e genômico com o objetivo de classificar as populações de *T. cruzi* isoladas de diferentes hospedeiros oriundos de toda área endêmica da DCh.

Toyé (1974) foi o pioneiro no estudo da variabilidade genética de cepas *T. cruzi* utilizando a técnica de análises do perfil eletroforético de isoenzimas. Este recurso permite observar diferenças na estrutura primária de uma enzima entre diferentes formas moleculares (variantes) de uma mesma enzima, apresentando função idêntica ou similar, presente num mesmo indivíduo (Markert e Moller, 1959). A técnica de caracterização das isoenzimas é considerada sensível. Apesar dos padrões isoenzimáticos traduzirem uma variação fenotípica, a sua utilização nas análises de genética de população fundamenta-se na hipótese de que eles refletem a variabilidade dos genes, que estão envolvidos na síntese das enzimas.

Miles *et al.* (1977) e Miles *et al.* (1978), utilizando esse marcador caracterizou isolados de *T. cruzi* de diversos hospedeiros de várias regiões do Brasil, e identificou três grupos utilizando seis *loci* de isoenzimas. Esses autores propuseram para o *T. cruzi* uma classificação em três zimodemas principais, sendo o grupo Z1 e Z3 associados a animais silvestres e Z2 associado a casos humanos e ciclos domiciliares de transmissão (Ready e Miles, 1980).

Nos trabalhos de Romanha *et al.* (1982) e Carneiro *et al.* (1990) caracterizaram parasitos isoladas da área endêmica de Bambuí/MG, identificaram quatro zimodemas diferentes denominados ZA, ZB, ZC e ZD. O zimodema ZB foi encontrando em cepas silvestres e o ZA caracteristicamente no ciclo de transmissão doméstico; ZA corresponde ao Z2 de Miles (1978) e ZB um padrão heterozigoto gerado pela hibridização de ZA e ZC.

Outros pesquisadores buscaram elucidar a enigmática diversidade genética do *T. cruzi*. Nos trabalhos de Tibayrenc e Ayala (1988) foram empregados 15 locos isoenzimáticos para avaliar 121 amostras de *T. cruzi*, isoladas de uma vasta fonte de hospedeiros invertebrados e vertebrados, de diferentes áreas geográficas da América. Foram identificadas 43 grupos genéticos principais. Entre esses grupos, os genótipos 19, 20,

32 e 39 foram ubíquitas e por isso foram considerados principais. Esses grupos representaram mais de 50% dos isolados caracterizados (Tibayrenc e Brenière, 1988).

A análise da genética de população do *T. cruzi* indica que este organismo é diplóide e apresenta estrutura e evolução predominante clonal, na qual a reprodução sexual ou a recombinação genética são eventos raros para esta espécie, o que possibilita a formação de clones naturais estáveis ao longo do tempo e do espaço (Tibayrenc *et al.*, 1986). Assim o táxon *T. cruzi* é originado de múltiplas linhagens clonais que mostram uma ampla diversidade genética resultante de uma propagação com pouca ou nula troca de material genético além da pressão das mudanças de hospedeiros e/ou ambientais. (Tibayrenc, 1981; Tibayrenc e Ayala, 1988; Tibayrenc *et al.*, 1993; Souto *et al.* 1996). Outra evidência que comprova a evolução clonal é a presença de *T. cruzi* com o mesmo zimodema em diferentes áreas. Todavia, alguns estudos recentes demonstram que eventos de hibridização ou troca genética podem ocorrer, o que provavelmente contribuiu para a diversidade observada nas populações do parasito (Gaunt *et al.*, 2003; Sturm e Campbell, 2009).

A análise do polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (Randomly Amplified Polymorphic DNA - RAPD), descrita por (Willians *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990), vem sendo amplamente utilizada no estudo de população. Essa técnica emprega pequenos iniciadores aleatórios (não direcionados a uma região específica) para amplificação por PCR de regiões aleatórias do DNA genômico sob condições de baixa stringência, formando um padrão de bandas polimórficas que revela vários *loci* dispersos no genoma. O RAPD é uma ferramenta barata, rápida, de elevado grau de diferenciação intraespecífica que tem sido amplamente útil no estudo de relações genéticas entre isolados do *T. cruzi*, apresentando resultados concordantes com outras metodologias como zimodemas (Steindel *et al.*, 1993; Tibayrenc *et al.*, 1993; Simpson *et al.* 1993; Dias-Neto *et al.*, 1993; Tibayrenc *et al.*, 1995), o que reforça o seu caráter clonal.

Outra abordagem para a análise do polimorfismo das populações do *T. cruzi*, baseia-se na avaliação de uma região singular do DNA ribossômico (rDNA). O rRNA é formado por duas subunidades, uma pequena e outra grande, apresentando essa estrutura maior do que as encontradas em eucariotos (Hernandez *et al.*, 1990). A subunidade maior é dividida em dois RNAs de alto peso molecular (24S α e 24 S β) e outras seis regiões de baixo peso molecular (S1-S6). Devido a sua abundância intracelular e a presença de algumas regiões específicas do 3' do gene rDNA 24S α , a amplificação dessa região é amplamente utilizadas para diagnóstico de agentes infecciosos (Tenover *et al.*, 1988;

Brujin *et al.*, 1988). Análises da sequência de aproximadamente 100pb da região 3' do gene rDNA indicam um dimorfismo na sequência do gene repetidas em *tandem*. Essas sequências são conservadas e têm sido utilizadas por pesquisadores para a classificação do *T. cruzi* por meio de uma metodologia que utiliza uma PCR multilocal. Desse modo, foi possível diferenciar o *T. cruzi* em dois grupos, de acordo com os produtos da amplificação (Souto e Zingales, 1993; Souto *et al.*, 1996). Os isolados que apresentam o perfil de 125pb foram classificados como linhagem 1 e os que apresentaram um perfil de 110pb como linhagem 2 (Souto e Zingales, 1993). A linhagem 1 foi encontrada nos isolados pertencentes aos hospedeiros de ambiente domiciliar, enquanto a linhagem 2 em hospedeiros oriundos de ambientes silvestres. Posteriormente, em um estudo com número maior de amostras foi possível observar a presença de um terceiro grupo, que apresentava os dois perfis, denominado grupo ½ ou grupo híbrido (Souto *et al.*, 1996).

Embora seja grande a diversidade de alvos gênicos empregados no estudo do polimorfismo do *T. cruzi*, os trabalhos pioneiros demonstraram a tendência de agrupamento das diferentes populações em parasitos em duas grandes linhagens principais (Tibayrenc *et al.*, 1993; Souto *et al.*, 1996; Zingales *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1998). Desse modo, a fim de unificar a nomenclatura do *T. cruzi* e sua classificação no ano de 1999, no Encontro Satélite Internacional, foi proposta a subdivisão do *T. cruzi* em dois grupos principais I e II. Alguns isolados, por apresentarem características híbridas, não puderam ser incluídos nesses grupos e sua classificação permaneceu inconclusiva (Anonymous, 1999).

Em estudos posteriores, utilizando a genotipagem de multilocus foi possível verificar que o *T. cruzi* poderia ser dividido em dois grandes grupos DTU (*Discrete Typing Unit*) I e DTU II, no qual a DTU II poderia ser dividida em cinco sublinhagens menores (IIa, IIb, IIc, IId e IIe) com base nas informações obtidas pelas técnicas de isoenzimas e RAPD (Brisse *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2001). A DTU I corresponde ao zimodema 1 e ao grupo de *T. cruzi* I. Já a DTU IIb representa o grupo *T. cruzi* II (Anonymous, 1999) ou zimodema 2 (Miles *et al.*, 1977). As DTU IIa-c são representados pelo zimodema 3 (Miles *et al.*, 1977), enquanto a DTU IId e IIe foram considerados os grupos híbridos representado pelo *clonet* 39 descrito por Tibayrenc e Ayala (1988). Em estudos epidemiológicos a DTU I pode ser encontrada nos ciclos de transmissão silvestre e doméstico, já a DTU IIb-IId e IIe foram relacionadas ao ciclo de transmissão doméstico e as DTU IIa-c são relacionadas a isolados encontrados no ambiente silvestre.

Sobre a origem ancestral do *T. cruzi*, acredita-se que as DTU I e DTU Iib são considerados linhagens primitivas, já as DTU Iid e Iie são grupos originados de pelo menos dois eventos de hibridização, enquanto as DTU Iia e Iic ainda não estão bem esclarecidas, embora existam evidências de que sejam também de origem híbrida (Westenberger *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2006, Tomazi *et al.*, 2009). Já Freitas *et al.* (2006) sugeriram a existência de um terceiro grupo ancestral denominado *T. cruzi* III (DTU Iic), evidenciado por meio de marcadores mitocondriais, o qual por eventos de hibridização com *T. cruzi* II (DTU Iib) teria resultado nos isolados de caráter híbrido, que são observados atualmente.

No ano de 2009, durante o Segundo Encontro Satélite que aconteceu na cidade de Búzios, no estado do Rio de Janeiro, a nomenclatura e classificação do *T. cruzi* foi revisada. Por concordância, de diversos pesquisadores da área, as populações de *T. cruzi* passaram a ser subdivididas em seis DTU distintas, levando em consideração a correlação entre diferentes marcadores (**Tabela-I**). Esses subgrupos foram denominados TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (**Tabela-I**) (Zingales *et al.*, 2009).

Tabela I - Nomenclatura adotada atualmente e suas correspondências com classificações adotadas anteriormente.

Zingales <i>et al.</i> (2009)	Brisse <i>et al.</i> (2001)	Anonymous (1999)	Souto <i>et al.</i> (1996)	Tibayrenc <i>et al.</i> (1986)	Miles <i>et al.</i> (1978)
TcI	DTU I	<i>T. cruzi</i> I	Linhagem 2	1-25	Z1
TcII	DTU Iib	<i>T. cruzi</i> II	Linhagem 1	30-34	Z2
TcIII	DTU Iic	ND	ND	35-37	Z3/ Z1 ASAT
TcIV	DTU Iia	ND	ND	26-29	Z3
TcV	DTU Iid	ND	Linhagem ½	38-39	Z2b
TcVI	DTU Iie	ND	Linhagem 1	40-43	ND

ND: Não Definido

Z: Zimodema

1.3.2 - Origem e epidemiologia dos grupos principais do *T. cruzi*

A história evolutiva das subpopulações de *T. cruzi* pode estar relacionada com a evolução dos seus hospedeiros (Stevens e Gibsons, 1999; Gaunt e Miles, 2000; Schofield, 2000; Gulh e Aufderheide, 2010). Os primeiros hospedeiros do *T. cruzi* foram da fauna autóctone da América do Sul de Marsupiais e Xenartras. Como ainda não existiam os hemípteros com hábitos hematófagos a transmissão se dava pelo hábito predatório de animais infectados ou o contato (mucosas ou pele ferida) entre material originado da glândula anal de gambás (Deane, 1984; Schofield, 2000; Jasen e Roque, 2010). Nesta glândula desse hospedeiro é observada uma singularidade, o *T. cruzi* pode multiplicar sob a forma epimastigota e diferenciar em formas infectantes, os tripomastigotas metacíclicos, fazendo deste hospedeiro não somente um reservatório, mas também, um disseminador da infecção à semelhança dos vetores (Schofield, 2000). Essa situação encontra-se até hoje onde a doença mantém o ciclo epidemiológico com característica enzoótica, no qual diversos mamíferos são reservatórios do *T. cruzi* no ambiente silvestre.

Há 35 milhões de anos, começam a surgir os primeiros indícios da fauna de roedores, e mais tarde os primatas passam a fazer parte do ciclo epidemiológico. Para Briones *et al.* (1999), esse evento foi fundamental para a divisão do táxon *T. cruzi* em dois grupos principais. Admite-se que os novos hospedeiros introduzidos no ciclo de transmissão provocaram uma pressão seletiva fazendo surgir às novas subpopulações de *T. cruzi* que encontramos hoje. Outra hipótese para o surgimento da heterogeneidade do táxon *T. cruzi* foi à aquisição de hábitos hematófagos dos triatomíneos que passaram a alimentar em pequenos mamíferos infectados, tornando-se vetores desse parasito. Acredita-se que essa mudança do ciclo vida monogénético do *T. cruzi* para o digenético, ocorreu há 65 milhões de anos, após a adaptação do parasito ao intestino do vetor. Isto possivelmente influenciou uma adaptação que pode ter favorecido o surgimento das sublinhagens de *T. cruzi* (Stevens e Gibsons, 1999; Schofield, 2000). Muitos autores acreditam que essa diversidade genética está intimamente relacionada com as características biológicas do parasito, bem com a patogenia, a resistência às drogas e as características clínicas da DCh. (Laurent *et al.*, 1997; Macedo e Pena, 1998; Devera *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2003).

É possível caracterizar a distribuição geográfica e a associação dos grupos principais *T. cruzi* com seus hospedeiros, uma vez que diversos trabalhos foram realizados com isolados de *T. cruzi*, originados de todos os ciclos da transmissão. A partir dessas informações acredita-se que a DTU TcI pode ser encontrada em ambos os ciclos de

transmissão: ambiente silvestre e doméstico, mas predominando no ambiente silvestre. No ciclo de transmissão domiciliar a DTU TcI é encontrada com maior frequência no México, Colômbia, Equador, América Central e região amazônica. Há indícios que a DTU TcI está associada, principalmente, a mamíferos do gênero *Didelphis* e a insetos vetores do gênero *Rhodnius* (Yeo *et al.*, 2005; Miles *et al.*, 2009), hospedeiros que frequentemente são encontrados em ambientes arbóreos. A grande maioria dos casos de DCh crônica provocados por TcI são considerados assintomáticos, sendo rara a presença da forma crônica digestiva (Miles *et al.*, 1981a; Zingales *et al.*, 1999; Coura *et al.*, 2002; Buscaglia e Di Noia, 2003; Añez *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2006; Zafra *et al.*, 2008; Llewellyn *et al.*, 2009b) nos países do Norte da América Sul da e América Central. Porém cepas da DTU TcI já foram descritas como responsáveis por severos casos de DCh cardíaca nos países da Colômbia e Venezuela (Añez *et al.*, 2004; Burgos *et al.*, 2008; Mejía-Jaramillo *et al.*, 2009) e mais recentemente no México e em países da América Central (Ruíz-Sanchez *et al.*, 2005) Outra característica importante da DTU TcI é sua resistência aos fármacos disponíveis para tratamento etiológico da DCh experimental demonstrada em modelo murino (Toledo *et al.*, 2002).

Em relação à DTU TcII, estudos epidemiológicos indicam que ela está mais associada animais domésticos, mamíferos placentários sinantrópicos e em particular com os humanos (Zingales *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 1999; Brèniere *et al.*, 1998). Acredita-se que esse grupo está mais relacionado com um ambiente terrestre, associado com vetores do gênero *Triatoma* (Gaunt e Miles, 2000). As DTU TcII, TcV e TcVI representam os isolados da região do Cone Sul da América do Sul causadores da DCh nessa região (Miles, 1984) onde o *T. infestans* foi considerado o principal vetor. As DTU TcV e TcVI são classificadas como grupos híbridos derivados de eventos de troca de material genético entre os DTU TcII e DTU TcIII. Assim como o TcII, os híbridos raramente são encontrados em ciclos silvestres (Zingales *et al.*, 2009). Esses grupos de parasitos são associados às formas mais graves da DCh, especialmente na região central e sul do Brasil, onde as formas clínicas cardíaca, digestiva e cardiodigestivas ou mistas são encontradas (Yeo *et al.*, 2005; Lages-Silva *et al.*, 2006). Em relação à resistência ao tratamento etiológico a DTU TcII é considerada sensível ao tratamento experimental *in vitro* (Revollo *et al.*, 1998) e *in vivo* (Toledo *et al.*, 2002), resultados corroborados por Coronado *et al.* (2006) em humanos.

As DTU TcIII e TcIV apresentam distribuição e associação entre os seus isolados com os hospedeiros pouco conhecidos ou subestimados, devido ao fato de que algumas metodologias utilizadas no passado para a caracterização molecular falhavam aos distingui-los de outros grupos de *T. cruzi* (Macedo e Segatto, 2010). Isolados DTU TcIII são poucos conhecidos, mas acredita-se que sua distribuição é ampla, abrangendo desde a região amazônica até os países ao sul da América do Sul. Populações deste grupo de *T. cruzi* vêm sendo isoladas de cães, tatus, gambás (terrestres) e roedores no Brasil, Argentina e Paraguai. Além disso, apenas triatomíneos relacionados a ambientes terrestres são encontrados infectados com Tc III (Cardinal *et al.*, 2008; Falla *et al.*, 2008; Marcili *et al.*, 2009). A maioria dos isolados serem originados do ciclo de transmissão silvestre, casos humanos são raramente encontrados infectados com este grupo de *T. cruzi* (Chapman *et al.*, 1984; Cardinal *et al.*, 2008; Marcili *et al.*, 2009b).

A DTU TcIV foi descrita pela primeira vez em surto de infecção oral na Amazônia brasileira (Miles *et al.* 1978). Na Venezuela, os parasitos pertencentes a esse grupo são considerados como segundo principal causador de DCh (Miles *et al.* 1981). Nos Estados Unidos da América esse grupo é frequente encontrado em guaxinins (Roelling, 2008) e, na Amazônia brasileira foi encontrado em primatas silvestres, vetores do gênero *Rhodnius* e em humanos oriundos de um surto de transmissão oral (Marcili *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm publicado a ocorrência de mistura de parasitos em infecções naturais de invertebrados e vertebrados (inclusive no ser humano) como resultados de infecções simultâneas, o que leva a constituir em um único hospedeiro a presença de misturas de mais de uma população do parasito (Brenière *et al.*, 1995; Lauria-Pires *et al.*, 1996; Brenière *et al.*, 1998; Solari *et al.*, 2001; Di Noia *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003; Mejía-Jaramillo e Triana, 2005; Rozas *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2008; Lisboa *et al.*, 2008).

Com a caracterização molecular de mais amostras, por toda extensão da área endêmica para DCh, com técnicas mais refinadas que permitem a caracterização direta das amostras biológicas, sem prévia manutenção, manuseio e multiplicação em cultura ou em qualquer outro hospedeiro vertebrado ou invertebrado, ficou evidente que a co-infecção está presente nos dois ciclos de transmissão silvestre e doméstico (Morel *et al.*, 1980; Deane *et al.*, 1984; Tibayrenc *et al.*, 1986; Marques e Araujo, 1988; Steindel *et al.*, 1995; Bosseno *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1998; Solari *et al.*, 1998; Brenière *et al.*, 1998; Di Noia *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003; Burgos *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2008; Steindel *et*

al., 2008; Ramírez *et al.*, 2010 Abolis *et al.*, 2011). Com elevada presença em seus hospedeiros acredita-se que as infecções mistas podem apresentar uma função importante na epidemiologia da DCh, causando efeitos relevantes no hospedeiro que podem alterar a resposta imunológica, lesões histopatológicas e evolução clínica distintas das observadas em monoinfecções.

1.3.3 - Impacto da manipulação do parasito em suas propriedades biológicas

Os isolados de *T. cruzi* podem ser constituídos por uma população heterogênea de parasitos circulantes. Vários trabalhos têm demonstrando que o cultivo do parasito em meios de cultura e a passagem sucessiva em animais de laboratórios podem ter um papel de “filtro biológico”, podendo selecionar populações mais adaptados a esses novos ambientes e influenciar a constituição original dos isolados obtidos (Deane *et al.* 1984; Morel *et al.*, 1986).

O cultivo *in vitro* por longo tempo pode favorecer ou não uma determinada população ou clone de *T. cruzi* em detrimento de outra. Alguns autores asseguram que a diminuição da virulência e infectividade é um fenômeno que está relacionado à seleção de subpopulações que adaptaram melhor ao meio de cultura (Pizzi e Parger 1952; Cavalheiro e Collares, 1965; Chiari, 1973; Magalhães *et al.*, 1985; Contreras *et al.*, 1994). O longo tempo de cultivo além de poder provocar alterações fenotípicas, diminuição infectividade, virulência, pode também provocar mudanças no perfil de isoenzimas e mudanças genotípicas, como as mudanças no perfil de RFLP do kDNA (Romanha *et al.*, 1979; Goldberg e Pereira, 1983; Morel *et al.*, 1986; Carneiro *et al.* 1990). Alves *et al.* (1993) observaram mudanças no perfil de isoenzimas da cepa Y após longo período de manutenção de meios de cultura de composições diferentes. Os autores observaram que o zimodema A (ZA) era mais favorecido no meio que era feito a base de sangue, e as mudanças para o perfil ZB e ZC ocorreram em meios de culturas com menor quantidade de nutrientes.

Mudanças nas propriedades fundamentais do *T. cruzi* após a passagem pelo hospedeiro invertebrado ainda é um fato muito controverso. Alguns autores demonstraram uma redução da parasitemia, da mortalidade e do viscetropismo após a passagem pelo vetor (Phillips, 1960; Cavalheiro e Collares 1965; Franciscon, 1978; Lana, 1981). Magalhães *et al.* (1985; 1996) observaram aumento da virulência em cepas isoladas na Bahia, após a passagem pelo invertebrado, enquanto outros pesquisadores afirmaram que a passagem pelo hospedeiro invertebrado não modifica a virulência do *T. cruzi* (Bahia,

1985). No hospedeiro invertebrado os fatores originados do inseto (enzimas digestivas, microbiota e fatores antimicrobiológicos) podem apresentar um papel seletivo (Garcia *et al.*, 2010).

Alteração nas características biológicas do *T. cruzi* também pode ser observada por longos períodos de manutenção do parasito em hospedeiro vertebrado utilizados no estudo experimental da DCh. O aumento da parasitemia do *T. cruzi* foi documentado após passagens por camundongos (Brenner e Chiari 1963; Brenner *et al.*, 1974; Lana e Chiari 1986; Carneiro *et al.*, 1991; Lana *et al.*, 1996; Veloso *et al.*, 2005). Deane *et al.* (1984) demonstraram a existência de uma seleção de cepas de *T. cruzi* em camundongos infectados inicialmente com duas cepas diferentes. Os autores observaram que ao reisolar e caracterizar essas amostras de parasito, por métodos bioquímicos, havia a presença de apenas uma das cepas utilizadas. Sugerindo que esses hospedeiros poderiam estar atuando como “filtros biológicos”.

1.3.4 - Impacto da diversidade biológica na interação parasito e hospedeiro invertebrado

Durante o ciclo no vetor o *T. cruzi* sofre várias alterações morfológicas. Alguns autores sugerem que tais alterações são provocadas pela alteração nutricional as quais o parasito está sujeito, ao passar a se alimentar de secreções intestinais ou pelas ações de diferentes componentes da digestão do vetor, como saliva, enzimas digestivas, várias mudanças fisiológicas temperatura e osmolaridade (Alvarenga e Brofen, 1997; Kollien e Schaub, 2000).

Um das principais dificuldades no entendimento da dinâmica do *T. cruzi* na natureza é o pouco conhecimento da interação entre os parasitos e os triatomíneos (Garcia e Azambuja, 1991). Há evidências que mecanismos específicos intrínsecos dos vetores e de algumas características genéticas do *T. cruzi* são capazes de impedir ou permitir a transmissão dessas populações de parasitos a outros hospedeiros (Vallejo *et al.*, 2009). Fato esse observado por Dias (1940) após infectar cães com cepas venezuelanas e brasileiras de *T. cruzi* e posteriormente realizar o xenodiagnóstico empregando *Rhodnius prolixus*, triatomíneos originados da Venezuela e do Brasil. Os autores demonstraram uma maior suscetibilidade dos vetores com as cepas da mesma região geográfica, ou seja, os triatomíneos venezuelanos infectaram melhor quando alimentaram em cães infectados com as cepas venezuelanas e os brasileiros com as cepas brasileiras. Perlowagora-Szumlewicz e Muller, (1982) ao avaliarem qual espécie de triatomíneo seria melhor para uso no

xenodiagnóstico em indivíduos na fase aguda ou crônica da infecção realizaram infecções experimentais com cepa Y (DTU TcII) do *T. cruzi* em nove espécies diferentes de triatomíneos constatando que as taxas de infecção não eram as mesmas nas diferentes espécies. Além disso, foi verificado que as espécies vetoras silvestres apresentavam índices de infecção maiores que as espécies vetores domiciliadas. Em trabalhos posteriores, Perlowagora-Szumlewicz *et al.* (1988) e (1990) ao estudarem a interação de nove espécies vetoras com sete cepas de *T. cruzi* observaram que espécies de triatomíneos originárias de ambiente silvestre apresentavam índices de infecções maiores para qualquer dessas cepas utilizadas, enquanto nas espécies vetoras de ambientes domiciliados os índices de infecção foram baixos. Machado (2006) após avaliar a evolução do *T. cruzi* no trato digestivo de *Triatoma brasilienses*, usando populações diferentes dessa espécie, também sugeriu uma melhor associação entre as cepas do parasito com triatomíneos de uma mesma região.

Garcia e Dvorak (1982) ao estudar a taxa de desenvolvimento de dois clones de *T. cruzi* no triatomíneo *Dipetalogaster maximus* verificaram que há diferenças tanto qualitativas quanto quantitativas, nas infecções dessa espécie. Em um estudo análogo, porém utilizando duas espécies de triatomíneos e apenas a cepa Y, Brofen *et al.* (1984), observaram que a cepa desenvolveu melhor na espécie *Panstrongylus megistus* do que no *T. infestans*. Mello *et al.* (1996) ao avaliar o comportamento de três cepas de *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* verificaram no intestino e hemolinfa de *R. prolixus* que o fator hemolítico do estômago desse triatomíneo, capaz de lisar as hemácias, também pode afetar o *T. cruzi*. A cepa Dm28 (DTU TcI) foi resistente a esse fator, mantendo altos níveis de infecção no inseto vetor. Já a cepa Y foi mais sensível e apresentou baixos índices de infecção no *R. prolixus*. Lana *et al.* (1998) verificaram que o *T. infestans* nem sempre apresenta a mesma eficiência na transmissão de diferentes subpopulações de *T. cruzi* e que o genótipo 19/20 (DTU TcI) apresenta maiores valores para infectividade e metaciclogênese do que o genótipo 32 (DTU TcII).

Pinto *et al.* (1998), ao comparar a transmissibilidade de infecções mistas, puderam observar por isoenzimas e RAPD que a maioria (87%) das misturas de infecções biclonais de clones de *T. cruzi* permaneceram presentes depois da passagem no vetor e, que a DTU TcII, que não se desenvolvia bem no vetor, quando associada com a DTU TcI, que apresentava isoladamente alta infectividade nestes insetos, passou a desenvolver melhor no hospedeiro invertebrado. Aguiar (2002) observou que todas as quatro cepas utilizadas em

seu trabalho foram 100% infectantes para o *T. infestans* e, quando combinadas a fim de simular uma infecção policlonal, os índices de infectividade diminuiram.

Esses achados de Pinto *et al.* (1998) e Aguiar (2002) em conjunto sugerem que o comportamento de infecções mistas, em triatomíneos, não é apenas uma justaposição do comportamento dos genótipos clonais presentes, mas sim uma interação dos diferentes genótipos constituintes das infecções mistas, podendo mudar as propriedades biológicas do parasito e conseqüentemente alterar seu comportamento no vetor com influência decisiva na sua transmissibilidade, e, portanto na epidemiologia da doença de Chagas.

1.3.5 - Impacto da diversidade biológica na interação parasito-hospedeiro vertebrado

Muitos estudos experimentais com diversos modelos demonstram que o *T. cruzi* tem uma grande diversidade biológica. Desde os primeiros trabalhos com o *T. cruzi* foi verificado que o parasito apresentava o tropismo para diversos tecidos, embora algumas cepas apresentassem preferência a determinados grupos celulares (Viana, 1911). Existem cepas de *T. cruzi* predominantemente macrofagotrópicas e miotrópicas e tropismo para outros tecidos (Silva e Nussenweig, 1953; Andrade e Andrade, 1966; Brener, 1977; Melo e Brener, 1978, Amaral *et al.*, 1975; Lenzi *et al.*, 1998).

As diferenças morfológicas encontradas no *T. cruzi*, referentes às variedades das formas tripomastigotas sanguíneas de diferentes isolados do parasito, foram descritas e associadas à virulência, tropismo tecidual e patogenicidade do parasito (Brener e Andrade, 1976; Andrade *et al.*, 1985; Andrade e Magalhães, 1997). Chagas (1909) foi o primeiro a observar o dimorfismo das formas sanguíneas de *T. cruzi* em animais infectados e acreditou que essas diferenças estavam associadas ao dimorfismo sexual do parasito. Brumpt (1912) atribuiu que as formas delgadas eram as formas jovens, que gradualmente iriam se desenvolver em formas largas maduras. Ao estudar diferentes isolados de *T. cruzi* ao longo da curva de parasitemia, Brener e Chiari (1963) classificaram o *T. cruzi* de acordo com sua morfologia: forma tripomastigota sanguínea delgada, larga e muito larga. Nessa mesma temática, foi observado, em camundongos experimentalmente infectados com diferentes cepas, que as formas delgadas eram mais infectantes para as células do hospedeiro, mais susceptíveis aos mecanismos imunes, macrofagotrópicas e predominantes em cepas mais virulentas. Ao contrário, as formas largas permaneciam por um maior tempo no sangue periférico, e apresentavam uma baixa capacidade de infectar as células do hospedeiro, eram consideradas mais resistentes aos mecanismos imunológicos, miotrópicas e mais predominantes em cepas de baixa virulência (Brener, 1965; Brener 1969).

Fundamentando-se nas observações de padrões de curva de parasitemia, morfologia e tropismo tecidual, Brener (1977) sugeriu que as cepas Y e CL (DTU TcVI) fossem classificadas como cepas “polares”, na qual a cepa Y seria a representante do polo agressivo e cepa CL do polo mais brando. Essas diferenças morfológicas e biológicas (virulência e patogenicidade, tropismo tecidual e parasitismo para animais de laboratório) foram utilizadas como parâmetros para agrupar cepas de *T. cruzi* que apresentavam padrões semelhantes de comportamento biológico. Assim foi possível classificar este parasito em três distintos tipos (I, II e III). O Tipo I era aquele que apresenta um predomínio de formas delgadas, rápida multiplicação em camundongos, parasitemias altas e precoces, taxas de mortalidades altas e precoces, sendo susceptíveis ou parcialmente resistentes ao benznidazol e nifurtimox. O Tipo II apresenta um predomínio de formas largas, mas com predomínio de formas delgadas no início da infecção, multiplicação lenta em camundongo, picos de parasitemia irregulares entre 12 a 20 dias, mortalidade nula da fase aguda e resistentes ou parcialmente resistentes ao tratamento com benznidazol e nifurtimox. Já o Tipo III apresentava multiplicação lenta com predomínio de formas largas durante a infecção, picos de parasitemia altos entre 20 a 30 dias, baixas taxas de mortalidade durante fase aguda, tropismo para musculatura esquelética e resistência ao tratamento (Andrade, 1974). Os Tipos I, II e III foram correspondentes aos biotipos I, II e III, respectivamente, propostos por Andrade e Magalhães (1997), onde foi possível correlacionar os perfis isoenzimáticos com as propriedades biológicas do *T. cruzi*.

Ao estudar a correlação entre a genética e as propriedades biológicas do *T. cruzi* de diferentes estoques clonais pertencentes aos genótipos 19/20 (TcI), 32 (TcII) e 39 (TcV) inoculados em camundongos (BALB/c), Lana *et al.* (2000) e Toledo *et al.* (2002) observaram que os genótipos 19 e 20 (DTU TcI) apresentam parasitos mais virulentos e maior parasitemia em camundongos comparados aos parasitos do genótipo 32 (DTU TcII), enquanto o genótipo 39 (DTU TcV) apresentou valores intermediários entre os grupos TcI e TcII para os mesmos parâmetros.

Admite-se que a heterogeneidade da população de *T. cruzi* pode estar associada à diversidade clínica da DCh (Montamat *et al.*, 1996; Brenière *et al.*, 1998; Macedo *et al.*, 2002; Macedo *et al.*, 2004). Vários estudos buscam correlacionar linhagens ou clones de *T. cruzi* com as diferentes formas clínicas da DCh, sem, entretanto, demonstrar indícios efetivos desta correlação (Macedo *et al.*, 1992; Devera *et al.*, 2002; D’Ávila *et al.*, 2006; Lages-Silva *et al.*, 2006; D’Avila *et al.*, 2009; Matilla *et al.*, 2010; Del Puerto *et al.*, 2010).

Uma possível explicação para a diversidade das manifestações clínicas é baseada na teoria do Modelo Histotrópico Clonal, proposto por Macedo e Pena (1998), cuja hipótese é que diferentes clones que compõem uma cepa do parasito podem apresentar tropismo para diferentes tecidos e, desta forma, seriam importantes na evolução da infecção, o que repercutiria no curso clínico da DCh. Foi então demonstrado que parasitos isolados do sangue podem ser diferentes daqueles presentes nos tecidos, o que explicaria a dificuldade de relacionar a genética dos parasitos com a forma clínica (Macedo e Pena, 1998; Macedo, 2001; 2002).

Por meio de técnicas moleculares alguns pesquisadores têm verificado que cepas isoladas de hospedeiros invertebrados e vertebrados, provenientes do ambiente silvestre ou domiciliar do ciclo de transmissão, são constituídas de misturas de diferentes populações do parasito (Bosseno *et al.*, 1996; Solari *et al.*, 1998; Brenière *et al.*, 1998; Herrera *et al.*, 2008). Desse modo, as infecções mistas podem apresentar consequências importantes nos indivíduos infectados influenciando as manifestações clínicas, patológicas e imunológicas na DCh de forma distinta e desconhecida quando comparada com infecções monoclonais.

Nesse contexto, Andrade *et al.* (1999), demonstraram claramente diferença no tropismo tecidual quando avaliaram o comportamento de duas populações do *T. cruzi* na fase crônica da infecção em camundongos. Franco *et al.* (2003), utilizando o clone CL-Brener em ratos como modelo experimental, observaram tropismo para músculo esquelético e cardíaco com alta mortalidade, enquanto a cepa monoclonal JG, isolada de pacientes megaesôfago, apresentou mortalidade nula. Quando os animais foram infectados simultaneamente com as duas populações de *T. cruzi* (JG e CL-Brener) com o inóculo 1×10^3 tripomastigotas de cada população, foram observadas mudanças na mortalidade que se apresentou nula ou muito baixa. Neste trabalho os autores avaliaram o tropismo tecidual por meio da metodologia de LSSP-PCR e identificaram apenas a presença de kDNA da cepa JG no músculo cardíaco, órgão que antes era parasitado somente pela clone CL-Brener na infecção monoclonal. Quando as infecções foram feitas com um inóculo de 10^4 tripomastigotas sanguíneos de cada população, o kDNA do clone CL-Brener foi encontrado nos músculo esquelético e esôfago, sugerindo assim a influência do polimorfismo genético e do inóculo das populações infectantes na patogênese da DCh.

Ao avaliar a influência de infecções mistas por diferentes populações de *T. cruzi* em camundongos BALB/c, Martins *et al.* (2006), observaram que o comportamento biológico nestes casos é alterado em comparação às respectivas infecções monoclonais. Martins *et*

al. (2008), analisaram ainda a resposta ao tratamento de infecções mistas comparadas com as infecções monoclonais, demonstrando também alterações no perfil de suscetibilidade ao benzonidazol entre as infecções monoclonais e mistas.

Rodrigues *et al.* (2010) avaliaram a modulação da resposta imune em camundongos submetidos à infecção mista. A infecção simultânea de duas cepas de *T. cruzi* a JG e CL Brener. A cepa JG é uma cepa menos virulenta quando comparada a cepa CL-Brener. Infecções provocadas com apenas a cepa JG apresenta baixa parasitemia, reduzido parasitismo no coração, mortalidade nula e o nível de mediadores pró-inflamatórios semelhantes ao encontrado em camundongos normais. Já a cepa CL-Brener promove altas parasitemias, parasitismo no músculo cardíaco, provocando um aumento nos mediadores pró-inflamatórios e alta mortalidade. Quando os camundongos foram submetidos a infecções com as duas cepas, houve uma indução de mediadores imunidade inflamatória protetora que atenuaram os danos provocados pela inflamação, o que sugere que a composição da população de parasitos na infecção é determinante na gravidade da doença experimental.

2.0 – JUSTIFICATIVA

Considerando que populações do *T. cruzi*, presentes em diversas espécies de hospedeiros triatomíneos e mamíferos, são geneticamente heterogêneas; que esta heterogeneidade pode estar associada à mudanças no curso da infecção, ou da doença nestes hospedeiros; que infecções mistas ou policlonais podem ser encontradas na natureza; que são escassas as informações sobre o impacto das infecções mistas ou policlonais na relação parasito-hospedeiro torna-se necessário a realização de estudos que avaliem a interação entre populações mistas do *T. cruzi* e os diferentes hospedeiros vertebrados e invertebrados à semelhança do que ocorre na natureza.

Nesse sentido, o presente trabalho se justifica ao estudar a influência das passagens alternadas de populações mistas do *T. cruzi* em hospedeiros invertebrados, vertebrados e novamente invertebrados exerce sobre o curso da infecção nesses hospedeiros, assim como nessas populações constituídas por clones de *T. cruzi* pertencentes a duas DTU (*Discrete typing unit*) distintas, mais presentes na natureza e de grande importância epidemiológica.

3.0 - OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Avaliar as características biológicas de infecções mistas com clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a duas DTU (*Discreet Typin Unit*) distintas em comparação às respectivas infecções monoclonais, após passagens alternadas entre hospedeiro invertebrado-vertebrado, assim como, o perfil genético de populações do parasito isoladas durante essas passagens.

3.2 - Objetivos específicos

1. Comparar em *Triatoma infestans* o desenvolvimento de infecções mistas e monoclonais quanto aos parâmetros infectividade, multiplicação e metaciclogênese,
2. Comparar em camundongos o desenvolvimento de infecções mistas e monoclonais, após passagem nos triatomíneos, quanto aos parâmetros infectividade, mortalidade e a parasitemia;
3. Comparar novamente em *Triatoma infestans* o desenvolvimento de infecções mistas e monoclonais, após passagens por hospedeiro invertebrado e vertebrado, quanto aos parâmetros infectividade, multiplicação e metaciclogênese;
4. Identificar e caracterizar molecularmente as populações dos parasitos isolados de vetores e camundongos com infecções mistas e monoclonais, após passagens pelos hospedeiros invertebrado, vertebrado e invertebrado, por meio de análises dos perfis de isoenzimas, rDNA e RAPD.

4.0 - ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais adotados nesse estudo foram realizados de acordo com o COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brasil, com protocolo de registro nº 2010/46.

4.1 – Parasitos

Foram utilizados dois estoques clonais do *T. cruzi*, P209 cl1 e CBB cl3, pertencentes aos genótipos principais 20 e 32 (Tibayrenc e Ayala, 1988), correspondentes aos DTU TcI e TcII, respectivamente (Zingales *et al.*, 2009). As amostras foram isoladas de humanos, durante a fase crônica da infecção, procedentes da Bolívia e do Chile, respectivamente (**Tabela II**) e foram clonados por técnicas de micromanipulação e mantidos criopreservados no “Laboratoire de Génétique des Maladies Infectieuses, Unité Mixte de Recherche (UMR) Institute de la Recherche sur le Développement (IRD) /Conceil Nationale de la Recherche Scientific (CNRS), Montpellier, França”, onde foram caracterizados por meio de RAPD e do perfil eletroforéticos de isoenzimas. Amostras destes parasitos foram gentilmente cedidos ao Laboratório de Doença de Chagas da UFOP.

Tabela II - Histórico dos clones de *Trypanosoma cruzi* utilizados nesse estudo.

Clone	País	Local	Hospedeiro	DTU
P209 cl1	Bolívia	Sucre	Humano, fase crônica	I
CBB cl3	Chile	Tulahuen	Humano, fase crônica	II

4.2 – Hospedeiro invertebrado: *Triatoma infestans*

Foram utilizadas ninfas de 3º estágio da espécie *Triatoma infestans* provenientes de colônias do Insetário do Laboratório de Doença de Chagas da UFOP, estabelecidas a partir de insetos gentilmente cedidos pela Dr^a Lileia Gonçalves Diotaiuti, Chefe do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas (LATEC - CPQRR- FIOCRUZ,

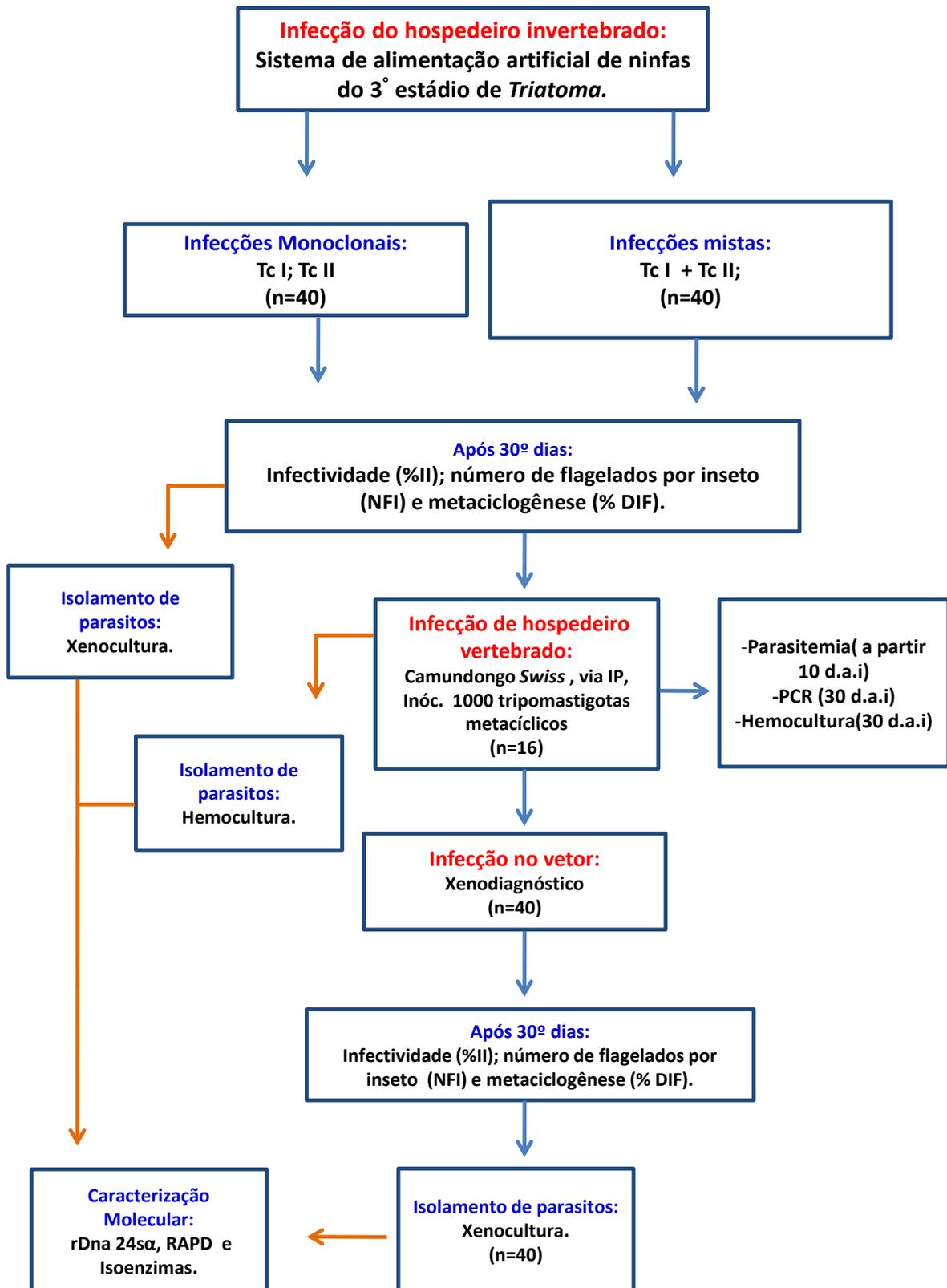
MG), cuja procedência original foi variada. As colônias foram mantidas a temperatura de 27° C e umidade relativa do ar a 65%, e alimentadas quinzenalmente em camundongos.

4.3 – Hospedeiro vertebrado: camundongos Swiss

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss, fêmeas, de 28-30 dias de idade, provenientes do Centro de Ciência Animal – (CCA-UFOP), mantidos sob regime alimentar e de ingestão de água *ad libidum*, em estante ventilada a 26° C.

4.4 - Infecções e avaliações realizadas nos hospedeiros invertebrados e vertebrados

As infecções realizadas nos hospedeiros invertebrado e vertebrado e novamente no invertebrado foram feitas e avaliadas segundo o **Delineamento Experimental** apresentado a seguir:



Delineamento Experimental: Sequência das infecções e avaliações realizadas ao longo de passagens alternadas dos clones de *Trypanosoma cruzi* pelos diferentes hospedeiros invertebrado - vertebrado – invertebrado.

4.5 – Infecções

Foram realizados três grupos experimentais, sendo dois constituídos por insetos expostos a clones distintos (infecções monoclonais) de *T. cruzi* e outro de insetos expostos a infecções mistas (TcI+TcII), conforme descrito na **Tabela III**. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.5.1 – Infecção por xenodiagnóstico artificial do hospedeiro invertebrado: sistema de alimentação artificial (XAH)

A primeira fase do estudo foi avaliada no hospedeiro invertebrado. Cada grupo experimental foi constituído de 20 ninfas de *T. infestans*, que estavam em período de jejum de 20-25 dias.

A infecção foi realizada por meio de um sistema de alimentação artificial (xenodiagnóstico artificial). Esse sistema consiste em uma caixa de acrílico acoplada a um banho-maria com circulação de água que permite manter a estabilização da temperatura em aproximadamente 37°C (**Figura 2**). A solução de sangue citratado de camundongo (0,1 ml de citrato de sódio/ml de sangue) foi adicionada de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose* - Camargo, 1964) e o número de epimastigotas ajustados para $5,0 \times 10^5$ parasitos/mL, contados em câmara de Neubauer. Esta mistura foi utilizada como fonte alimentar e colocada no recipiente adequado do sistema de alimentação artificial onde era constantemente homogeneizada por uma barra magnética (**Figura-2**). Nas infecções mistas a concentração de cada clone constituinte da mistura foi de $2,5 \times 10^5$ parasitos/mL, sendo a concentração final $5,0 \times 10^5$ parasitos/mL.

Em seguida foi calculado o volume de sangue ingerido por cada inseto pela diferença do peso apresentado antes e após o repasto infectante. Foi considerado que 1 mg de peso correspondia a 1 microlitro (μ L) de sangue ingerido. Apenas os insetos que ingeriram volumes semelhantes de sangue foram selecionados para os ensaios experimentais. Os insetos mantidos individualmente em placas de 24 poços. Em cada poço da placa foi colocado tiras de papel de filtro para proteger os insetos da umidade sendo esta proteção trocada quinzenalmente. No trigésimo dia após o repasto sanguíneo infectante os insetos foram avaliados pelos parâmetros descritos na secção 4.6.1.

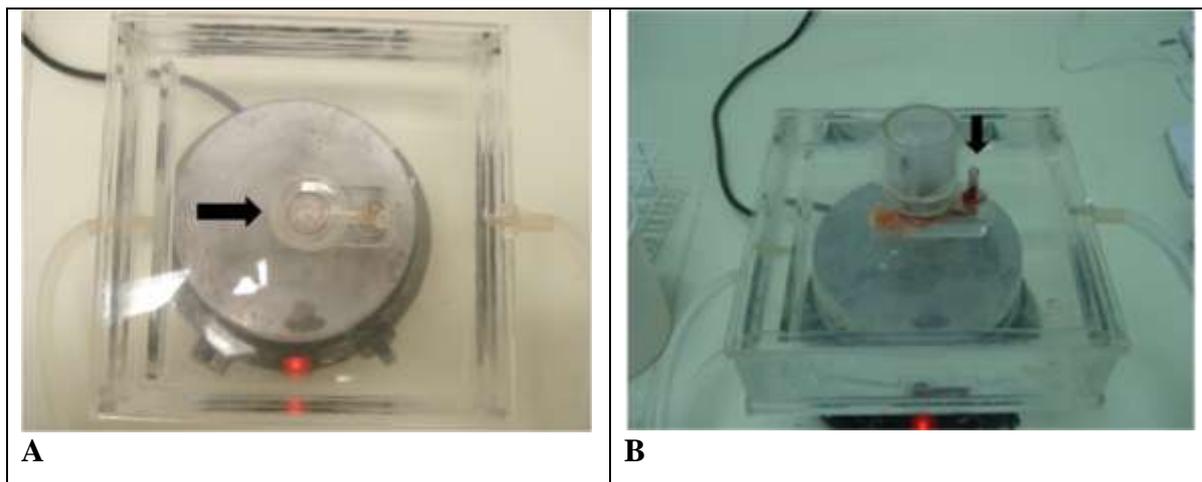


Figura 2 - A - Vista superior do aparelho utilizado no sistema de alimentação artificial. A seta indica o recipiente central coberto por membrana látex onde a mistura de parasitos e sangue é colocada. **B -** Representa o mesmo aparelho com o pote de insetos em alimentação. A seta indica o local de abastecimento do aparelho com o inóculo.

4.5.2 – Infecção artificial no hospedeiro vertebrado (IAHV)

Trinta dias depois de infectados pelo xenodiagnóstico artificial, as formas tripomastigotas metacíclicos obtidas dos insetos provenientes de cada grupo experimental da etapa anterior foram utilizadas para infectar camundongos segundo a metodologia descrita na seção 4.6.1.1. Para cada grupo experimental foram utilizados oito camundongos que foram inoculados pela via intraperitoneal (IP) com $1,0 \times 10^3$ tripomastigotas metacíclicos contados segundo o método descrito por Brener (1962). Estes animais foram avaliados pelos parâmetros descritos no item 4.6.2.

4.5.3 – Infecção por xenodiagnóstico natural do hospedeiro invertebrado (XNHI)

A segunda infecção do hospedeiro invertebrado foi feita mediante a realização de xenodiagnóstico natural nos camundongos provenientes da etapa experimental anterior. A alimentação dos insetos nos camundongos (xenodiagnóstico) foi feita no trigésimo dia de infecção. Para isso, os animais foram anestesiados com tiopental (40-80mg/Kg), acondicionados em pote de acrílico (20 cm de diâmetro x 20 cm de altura) e nestes foram colocadas às ninfas de *T. infestans* para realização do repasto infectante diretamente no hospedeiro (**Figura 3**). As ninfas utilizadas apresentavam as mesmas características descritas anteriormente.



Figura 3 - Repasto infectante de ninfas de terceiro estágio de *Triatoma infestans* em camundongos experimentalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*.

Após o repasto infectante o volume de sangue ingerido por cada ninfa foi calculado conforme descrito anteriormente. No trigésimo dia após o repasto sanguíneo infectante os insetos foram avaliados pelos parâmetros descritos na secção 4.6.1.

A **Tabela III**, sumariza detalhes dos grupos experimentais realizados nos hospedeiros invertebrado, vertebrado e invertebrado na sequência que foram feitos.

Tabela III - Composição dos grupos experimentais realizados nos hospedeiros invertebrado, vertebrado e invertebrado.

Clones de <i>T. cruzi</i> que constituíram o inoculo	Grupos Experimentais	Hospedeiros
P209 cl1 (TcI)	XAHI – TcI	
CBB cl3 (TcII)	XAHI – TcII	Invertebrado (<i>T. infestans</i>) Xenodiagnóstico Artificial
P209 cl1 + CBB cl3 (TcI +TcII)	XAHI - TcI+TcII	
P209 cl1 (TcI)	IAHV – TcI	
CBB cl3 (TcII)	IAHV – TcII	Vertebrado (camundongo)
P209 cl1 + CBB cl3 (TcI +TcII)	IAHV - TcI+TcII	
P209 cl1 (TcI)	XNHI - Tc I	
CBB cl3 (TcII)	XNHI – TcII	Invertebrado (<i>T. infestans</i>) Xenodiagnóstico Natural
P209 cl1 + CBB cl3 (TcI +TcII)	XNHI - TcI+II	

XAHI = Infecção xenodiagnóstico artificial do hospedeiro invertebrado; IAHV = Infecção artificial do hospedeiro vertebrado; XNHI = Infecção por xenodiagnóstico natural do hospedeiro invertebrado.

4.6 - Parâmetros avaliados durante as infecções experimentais

4.6.1 – No hospedeiro invertebrado

No hospedeiro invertebrado foram avaliadas as seguintes variáveis: número de flagelados por insetos (NFI), percentual de infectividade (%INF) e percentual de metaciclogênese (%DIF).

4.6.1.1 – Determinação do número de flagelados por inseto (NFI)

Trinta dias após a infecção (d.a.i), os insetos foram imersos em solução esterilizante de White (0,25 g de HgCl₂, 6,50 g de NaCl, 1,25 mL de HCl concentrado, 250 mL de

etanol a 95% e 750 mL de H₂O), por 90 min (Bronfen, *et al.*,1989). De cada inseto foi retirado o trato digestório que foi transferido para um tubo contendo 20 µL de solução salina tamponada (PBS, pH 7.2). O trato digestório com todo seu conteúdo foi triturado utilizando maceradores de *pellet* (Sigma, USA). A seguir cinco µL desta suspensão foram colocados entre lâmina e lamínula 22 x 22 mm e examinados em microscópio óptico pela objetiva de 40X, sendo os flagelados contados de acordo com Brener (1962). O número de flagelados por insetos foi expresso pela média de parasitos encontrados nos insetos de cada grupo experimental.

4.6.1.2 – Determinação do percentual de infectividade (%INF)

A infectividade foi expressa em percentagem cumulativa de insetos positivos para formas flageladas de *T. cruzi* ao exame a fresco.

4.6.1.3 – Determinação do percentual de metaciclogênese (%DIF)

Para o cálculo do percentual de metaciclogênese o número total de formas evolutivas do *T. cruzi* (epimastigota e tripomastigota metacíclicos) foi contabilizado conforme descrito acima e a proporção de tripomastigotas metacíclicos em relação às epimastigotas expressas em percentual. As formas epimastigotas foram distinguidas das formas tripomastigotas metacíclicas com base na sua morfologia e motilidade (Piesman e Sherlock, 1985). Um total de 100 formas evolutivas foi contabilizado em amostra de mistura do conteúdo intestinal de dez insetos.

4.6.1.4 - Xenocultura (XC)

Foi realizada também, nos insetos expostos ao xenodiagnóstico artificial, a xenocultura. O objetivo foi isolar os parasitos em condições estéreis para posterior caracterização molecular. Para tal a suspensão do conteúdo intestinal dos insetos, obtida conforme descrito no item 4.6.1.1, foi semeada em condições estéreis em três mL de meio LIT acrescidos de 50 µg/mL de gentamicina. Esse material foi avaliado ao microscópio óptico, em objetiva de 40X, e mensalmente até 90 dias após coleta. Nas xenoculturas positivas, os parasitos foram mantidos em crescimento exponencial para obtenção da massa úmida e posterior caracterização molecular. A taxa de positividade da xenocultura foi expressa em percentagem cumulativa de insetos com xenocultura positiva (%XC⁺).

4.6.2 - No hospedeiro vertebrado

4.6.2.1 - Exame de sangue a fresco (ESF)

A contagem de formas tripomastigotas sanguíneas obtidas dos camundongos foi realizada a partir do quarto dia após o inóculo, diariamente, pela técnica de exame de sangue a fresco realizada segundo Brener (1962).

4.6.2.2 - Hemocultura (HC)

As hemoculturas foram realizadas, 30 dias após a inoculação dos camundongos, segundo à técnica Filardi e Brener, (1987), com dois objetivos: (1) verificar se houve infecção nos animais negativos ao exame a fresco e (2) isolar os parasitos para posterior caracterização molecular. Para a realização desta técnica 0,5mL de sangue foi coletado assepticamente do plexo venoso retro orbital do animal e distribuído em dois tubos cônicos de 15 mL contendo três mL de LIT. Os tubos foram mantidos à 28°C, homogeneizados a cada 72h e uma gota do sedimento analisada ao microscópio óptico em objetiva de 40X, a cada 30 dias até o 120º dia após cultivo. A hemocultura foi realizada em todos os animais e os resultados positivos expressos em porcentagem (%HC⁺).

4.6.2.3 - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi realizada apenas em camundongos que apresentaram exame a fresco e hemocultura negativos com o objetivo de detectar a infecção nesses animais. Para tal, 30 dias após a inoculação, um volume de cerca de 0,2 mL de sangue foi retirado pela veia do plexo orbital e transferido para tubos eppendorf contendo 0,4 mL de solução de cloridrato de guanidina (guanidina-HCl) 6M/ácido etilenodietildinitrotetracético (EDTA) 0,2M/pH 8,0 como descrito por Ávila *et al.* (1991). Essa mistura de sangue/Guanidina-HCl/EDTA foi fervida sete dias após a coleta, a 100°C, durante 7 min. O lisado foi estocado à temperatura ambiente (Ávila *et al.*, 1991).

4.6.2.3.1 - Extração de DNA de sangue

Para a obtenção do DNA alíquotas de 200 µL do eluato de sangue foram submetidas à extração do DNA do *T. cruzi* por meio do Wizard® *Genomic DNA Purification Kit* (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

4.6.2.3.2 - Amplificação do kDNA do *Trypanosoma cruzi*

Para a amplificação do kDNA do parasito foi utilizado o protocolo de Gomes *et al.* (1998), com pequenas modificações. A mistura da reação foi preparada com 0,1% de

Triton X-100 (Tampão 10X, Invitrogen São Paulo, SP, Brasil); 75 mM de cloreto de potássio (KCl - Tampão 10X, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 3,5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$ – Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Sigma, St. Louis, MO, EUA) 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 10 pmoles de cada iniciador S35 (cinco'AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA3') e S36 (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA3'), descritos por Ávila *et al.* (1991), sintetizados pela Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil. Foram adicionados a essa mistura 2,0 μ L de DNA extraído da amostra de sangue. A amplificação foi processada em termociclador automático (*Termociladores BioCycler*), nas seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de amplificação constituídos de um passo de desnaturação a 95°C por 1 min, de anelamento a 65°C por 1 min e de extensão a 72°C por 1 min, finalizando com uma etapa de extensão a 72°C por 10 min. O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e revelado com NaOH e formaldeído após coloração pela prata (Santos *et al.*, 1993). Quando positivo, foi visualizado uma banda de 330 pb.

4.6.3 - Infectividade (%INF)

A infectividade foi determinada pela positividade do exame a fresco registrada diariamente até 60^o dia após a inoculação (d.a.i.). Nos animais persistentemente negativos foram realizadas também hemocultura e PCR. Os resultados finais da infectividade foram expressos em percentagem cumulativa de resultados positivos destas três técnicas.

4.6.4 - Parasitemia (PAR)

A avaliação da parasitemia foi realizada, diariamente, pela contagem de formas tripomastigotas sanguíneas a partir do quarto dia de infecção pelo exame a fresco, segundo a técnica descrita por Brener (1962).

4.6.5 - Mortalidade (MORT)

A mortalidade dos animais foi avaliada diariamente até o 90^o d.a.i. e expressa em percentagem cumulativa.

4.7 - Caracterização isoenzimática e molecular dos *T. cruzi* de todas as infecções experimentais (hospedeiro invertebrado, vertebrado e invertebrado)

4.7.1 - Obtenção do extrato celular para caracterização isoenzimática e molecular

A massa úmida dos parasitos obtidos por xenocultura e hemocultura foi submetida à extração enzimática segundo Godfrey e Kilgour, (1976). Os parasitos foram descongelados em banho de gelo e submetidos à lise osmótica em estabilizador enzimático (Ditiotreitol - 2,0 mM, ácido ϵ -amino capróico - 2,0 mM, EDTA, 2,0 mM, pH 7,0) na proporção de 1:1 (p/v=mg/ μ L) da solução. O lisado permaneceu por 20 min em banho de gelo à temperatura de 4°C, seguida de centrifugação a 15000 g, por 15 min, a 4°C. O extrato enzimático foi alíquotado e armazenado a -70°C até o momento da realização da eletroforese de isoenzimas. O sedimento também foi conservado a -70°C para posterior obtenção de DNA.

4.7.2 - Caracterização isoenzimática

A eletroforese de isoenzimas foi realizada segundo metodologia de Ben Abderrazak *et al.* (1993), em sistema horizontal sob refrigeração (Helena, Beaumont, Texas, EUA), utilizando membrana de acetato-celulose (Helena, Beaumont, TE, EUA). As membranas foram submersas por 20 min em tampão específico para cada sistema enzimático estudado. Os extratos foram depositadas sobre a superfície da membrana de celulose com auxílio de um aplicador (Helena, Texas, EUA). As membranas foram colocadas entre os eletrodos. As condições da eletroforese e os reagentes usados na reação encontram-se descritos na **(Tabela-V)**.

Todas as enzimas analisadas apresentam migração anódica. As bandas protéicas foram visualizadas após o término da corrida eletroforética e após a realização de reações bioquímicas específicas. A mistura reacional contém todos os reagentes necessários à atividade enzimática, acrescida de agente revelador. Após a revelação, a reação foi interrompida com solução de ácido acético 5% e as membranas foram lavadas em água destilada e fotografadas sendo as imagens armazenadas no computador. Foram empregados três sistemas enzimáticos para identificação dos grupos de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, escolhidos devido à eficiência em diferenciá-los: glicose-6-fosfato-1- desidrogenase (G6PD) [E.C.1.1.1.49]; glicose-6-fosfato isomerase (GPI) [E.C.5.3.1.9]; isocitrato desidrogenase (IDH) [EC1.1.1.42].

Tabela IV - Condições eletroforéticas e de revelação usadas para os sistemas enzimáticos estudados.

Glicose-6-fosfato isomerase [E.C.5.3.1.9] – GPI	Isocitrato desidrogenase [EC.1.1.1.42] – IDH	Glicose-6-fosfato-1-desidrogenase [EC.1.1.1.49] - G6PD
Extrato: concentrado	Extrato: concentrado	Extrato: concentrado
Tampão de embebeção: ShawIII* (1:4) ¹	Tampão de embebeção: 30 ml ShawIII	Tampão de embebeção: HR
Tampão de migração: Shaw III	Tampão de migração: Shaw III	Tampão de migração: HR
Voltagem: 200V	Voltagem: 200V	Voltagem: 200V
Tempo: 25 minutos	Tempo: 25 minutos	Tempo: 20 minutos
Mistura reacional:	Mistura reacional:	Mistura reacional:
5,0mg de frutose 6-fosfato	10mg de ácido isocítico DL	10mg de D-glicose-6-P
4,6U de G-6-P DH	Mgcl ₂ 15Mm	Mgcl ₂ 15Mm
Mgcl ₂ 15Mm	5,0mg de NADP	5,0mg de NADP
5,0mg de NADP	3,0mg de MTT	3,0mg de MTT
3,0mg de MTT	2,5mg de PMS	2,5mg de PMS
2,5mg de PMS	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente
Temperatura ambiente	Tris-HCl 0,1M, pH 8	Tris-HCl 0,2M pH 7
Tris-HCl 0,2M, pH 7		

Descrição dos Tampões

* Shaw III: 0,15M Tris, 0,043M ácido cítrico/pH 7,0

** HR (Eletra HR Tampão; Helena, Beaumont, TE, EUA): Tris-Barbital, barbital sódico/pH 9,0

G6PD: Glicose-6-Fosfato Desidrogenase. NADP: Nicotinamida Adenina Difosfato. MTT: Brometo de 3-(2,5Difeniltetrazolium. PMS: sulfato de fenazina. ¹: tampão diluído em água (v/v).

4.7.3 – Extração do DNA genômico

A extração do DNA foi realizada a partir do sedimento obtido após a extração isoenzimática, por meio do *Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)*, segundo as orientações do fabricante. O volume de 100 µL de sedimento de parasito foi adicionado 500 µL de solução de lise celular, que foi homogeneizado por 10 min e posteriormente, centrifugado por 1 min a 15.000 g. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi homogeneizado no vortex por quinze segundos. Ao *pellet* foram adicionados 200 µL de solução de lise nuclear, 0,8 µL de RNase e a solução foi incubada por 15 min a uma temperatura de 37°C. Após resfriamento, foi adicionado 75 µL de solução protéica homogeneizou no vortex vigorosamente por trinta segundos e centrifugado por 3 min a 15.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e foi adicionado 200 µL de isopropanol a solução foi homogeneizada e centrifugada por 1 min a 15.000 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi homogeneizado por 15 seg. Adicionou-se 200 µL de Etanol 70% solução foi homogeneizada e centrifugada por 1 min a 15.000 g. O sobrenadante foi descartado e ao DNA precipitado foi adicionado 50 µL solução de hidratação e armazenada a 4°C.

4.7.4 - Dosagem do DNA genômico

A dosagem do DNA foi realizada em aparelho de dosagem de proteína (NanoVue Plus[™], GE Healthcare) e sua concentração foi ajustada para 3 ng/µL.

4.7.5 - Amplificação da região 3' do gene rDNA 24Sα

Para a amplificação do domínio divergente do gene ribossômico rDNA 24Sα, a reação foi processada em volume final de 10 µl contendo 10 mM tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 3,5 mM MgCl₂ (Promega), 0,625 unidades de Taq DNA polimera (Promega), 0,1% Triton X-100 (buffer B, Promega) 0,2 mM de cada dNTP, 0,25µM dos iniciadores D71 (3'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-5') e D72 (3'-TTTTTCAGAATGGCCGAACAGT-5'), 1 ng/µL de DNA de cada amostra. A PCR foi realizada em termociclador (*Termociladores BioCycler*). Foi utilizado o seguinte protocolo de amplificação: 30 ciclos com desnaturação inicial a 94°C por 1 min, outro passo desnaturação por 30 seg., anelamento a 60°C por 30 seg. e extensão a 72°C por 30 seg. O produto amplificado foi analisado após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corado pela prata (Souto *et al.*, 1996). A visualização do fragmento de 125pb indica que a população de *T. cruzi* pertence ao DTU TcII, do fragmento de 110pb DTU TcI.

4.7.6 - Caracterização pelo perfil de RAPD

4.7.6.1 - Amplificação do DNA genômico

O perfil de RAPD foi determinado com base na técnica de Steindel *et al.* (1993) com algumas modificações. Cada reação foi realizada em um volume final de 10 µl, contendo 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,1% Triton X-100, 1,5 mM de MgCl₂, 125 µM da mistura de cada dNTPs da (*Pharmacia Biotech*), 1 U de Taq DNA polimerase (*Fermentas Life Sciences*), 6,4 pmoles do iniciador e 3 ng de DNA genômico. A amplificação seguiu o seguinte protocolo: desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguida de dois ciclos térmicos para anelamento, alongamento e desnaturação respectivamente, a 30°C por 2 min, 72°C por 1 min e 95°C por 30 seg. e 33 ciclos com temperatura de anelamento a 40°C e, extensão final a 72°C por 5 min. A PCR foi realizada num termocilador (*Termociladores BioCycler*). Para a realização desta reação foram utilizados dois iniciadores A7 - (GAAACGGGTG) e A10 - (GTGATCGCAG) da *Operon Technologies* (Alameda Califórnia, CA, USA). O produto de amplificação foi submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%.

O polimorfismo das bandas geradas por RAPD, obtido pelos dois iniciadores (A7 e A10), foi monitorado com o marcador de peso molecular de 1 Kb. As bandas avaliadas variaram de 600pb a 3.500 pb.

Os clones P209 cl1 e o CBB cl3 foram utilizados como referências das DTU TcI e DTU TcII respectivamente.

4.8 - Análise estatística

Nas análises das taxas de infectividade no triatomíneo e camundongo (%IFN), percentual de metaciclogênese (%DIF), hemocultura positiva (%HC⁺), xenocultura positiva (%XC⁺) e mortalidade (MORT) foram utilizados o teste estatístico do qui-quadrado (χ^2) e/ou teste exato de Fisher (Snedecor e Cochran 1989). Os valores atribuídos à diferença de peso dos insetos antes e depois de alimentados, o volume de sangue ingerido e o número de flagelados por insetos (NFI) foram expressos em médias \pm erro padrão (EP) e a análise feita por meio de análise de variância dos dados, empregando o teste de Tukey (Snedecor e Cochran, 1989). Valores ($P < 0,05$) foram considerados significativos. Para as análises dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 ou e Software Action versão 2.3.

5.0 – RESULTADOS

Os valores de todos os parâmetros avaliados foram obtidos de experimentos realizados em duplicada (n=40 para os insetos e n=16 para os camundongos) e considerados conjuntamente por terem sido semelhantes.

5.1 – Avaliação da infecção por xenodiagnóstico artificial do hospedeiro invertebrado (XAHI)

5.1.1 – Número de parasitos ingeridos

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os volumes de sangue ingerido e, conseqüentemente, o número teórico de parasitos ingeridos pelos insetos que realizaram o repasto infectante em sistema de alimentação artificial semelhante (**Tabela V**).

Tabela V - Peso dos *Triatoma infestans* antes e após o repasto artificial infectante com formas epimastigotas de clones de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcII e TcI+TcII (infecção mista).

Grupo Experimental	Peso médio antes do repasto (mg)	Peso médio após repasto (mg)	Inóculo (parasitos/inseto)
XAHI TcI	7,8 ($\pm 0,3$)	39,6 ($\pm 9,6$)	14.99 (± 4.63)
XAHI TcII	8,8 ($\pm 0,1$)	40,1 ($\pm 9,5$)	15.66 (± 4.46)
XAHI TcI + TcII	10,4 ($\pm 0,2$)	41,9 ($\pm 9,2$)	16.05 (± 3.66)

Teste de Tukey ($P > 0,05$)

5.1.2 – Mortalidade dos insetos após alimentação artificial

No grupo de insetos infectados com TcI (XAHI TcI) houve mortalidade de cinco insetos, no grupo infectados com TcII (XAHI TcII) um inseto morreu e no grupo infectado com infecção mista (XAHI TcI+TcII) seis insetos morreram.

5.1.3 – Número de flagelados por inseto (NFI)

A contagem do NFI 30 dias após o repasto infectante revelou a presença de [240; $\pm 55,22$] flagelados nos insetos infectados com clone de TcI; de [88.42; ± 25.67] nos insetos infectados com o clone das TcII e de [36; ± 13.01], nos infectados com mistura de clones das TcI + TcII. Foi observada diferença significativa entre o NFI entre os grupos infectados com TcI e TcII e com a mistura TcI + TcII (**Tabela-VI**).

Tabela VI - Número de flagelados por insetos (NFI), percentual de infectividade (%INF) e percentual de diferenciação (%DIF) em *Triatoma infestans* infectados por clones de *Trypanosoma cruzi* TcI, TcII e TcI+TcII (infecção mista) trinta dias após o xenodiagnóstico artificial infectante.

Grupo Experimental	NFI	%INF	%DIF
XAHI TcI	240; $\pm 55.22^{ab}$	71.4% - 25/35 ^{*#}	12%
XAHI TcII	88.42; $\pm 25.67^a$	38.4% - 15/39 [*]	6% ^c
XAHI TcI + TcII	36.0; $\pm 13.01^b$	29.4% - 10/34 [#]	20% ^c

a e b = Diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

* e # = Diferenças significativas pelo teste do Qui-quadrado ($P < 0,05$)

c = Diferenças significativas pelo teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$)

5.1.4 – Percentual de infectividade (%INF)

Os insetos que realizaram repasto sanguíneo em sistema de alimentação artificial contendo apenas o clone de TcI apresentaram maior porcentagem de índice de infecção (%INF) (71.4% - 25/35), seguidos dos que se alimentaram apenas do clone de TcII (38.4% - 15/39). Os que apresentaram menor índice foram aqueles que realizaram o repasto com a mistura de dois clones de *T. cruzi* (TcI + TcII) (29.4% - 10/34), que foram similares ao índice observado entre os animais do infectados com clone de TcII (**Tabela - VI**). A diferença entre o %INF do grupo infectado com TcI foi significativa em relação aos demais ($P < 0, 05$) TcII e o do TcI+TcII (infecção mista).

5.1.5 – Percentual de metaciclôgênese (%DIF)

Como pode ser observado na **Tabela - VI**, o grupo de insetos infectados com TcI o %DIF foi de 12%, enquanto nos triatomíneos infectados com clone de TcII o %DIF foi de 6%. No grupo infectado com a mistura de clones de TcI+TcII o % DIF foi de 20%. Houve diferença significativa apenas entre os grupos infectado com TcII e infecção mista (TcI+TcII) ($P < 0,05$).

5.2 – Avaliação da infecção nos hospedeiros vertebrado (IAHV)

5.2.1 – Parasitemia (PAR)

As infecções monoclonais com clones das DTU TcI e TcII no hospedeiro vertebrado (IAHV) não apresentaram parasitemia patente durante todo tempo de observação. Já os animais infectados com tripomastigota metacíclicos de insetos alimentados em sistema de alimentação artificial (xenodiagnóstico artificial) contendo a mistura de clones (TcI+TcII), apenas um dos animais apresentou parasitemia patente. Isto aconteceu em um único dia (28º dia após o inóculo). A parasitemia registrada foi muito baixa e de 250 parasitos/0,01 mL de sangue.

5.2.2 – Hemocultura (HC)

As taxas de positividade da hemocultura entre dos animais infectados com formas metacíclicas de clones de TcI e TcII submetidos a infecções monoclonais, foi de 44% (7/16) e de 19% (3/16), respectivamente. Nos animais submetidos à infecção mista, (TcI+TcII), observou-se a maior taxa de positividade (62% - 10/16). Foi encontrada diferença significativa entre a taxa de positividade de hemoculturas entre os grupos infectado com clone de TcII e o grupo com infecção mista (TcI+TcII) ($P < 0,05$) (Figura-7).

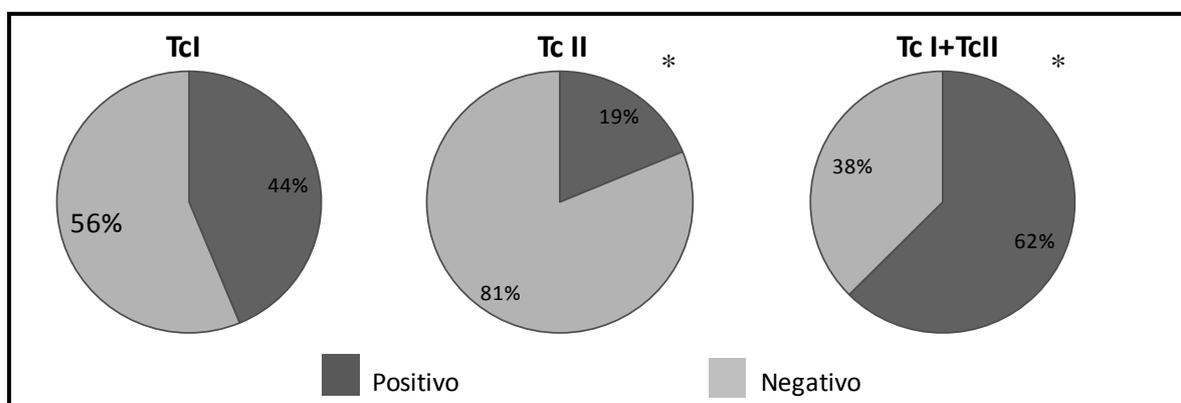


Figura 4 - Percentual de positividade de hemoculturas de camundongos infectados com isolados de clones de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcII (infecções monoclonais) e TcI+TcII (infecção mista) após a passagem no hospedeiro invertebrado.

* = Diferença significativa ($P < 0,05$).

χ^2

5.2.3 – Mortalidade (MORT)

Após os noventa dias de infecção não foi observada mortalidade nos animais de nenhum dos grupos experimentais.

5.2.4 – Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Os resultados da PCR realizada no sangue dos camundongos que apresentavam exame a fresco e hemocultura negativa foram sempre negativos.

5.3 – Avaliação da infecção por xenodiagnóstico natural do hospedeiro invertebrado (XNHI)

5.3.1 – Número de parasitos ingeridos no repasto em sistema de alimentação artificial

A **tabela VII** demonstra o volume médio de sangue que cada inseto ingeriu. Nesta etapa não foi possível estimar qual a quantidade de parasitos ingeridos uma vez que a parasitemia dos camundongos no trigésimo dia de infecção foi subpatente. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os volumes de sangue ingerido.

Tabela VII - Peso dos *Triatoma infestans* antes e após o repasto infectante em camundongos infectados com isolados de clones de *Trypanosoma cruzi*.

Grupo Experimental	Peso médio antes do repasto (mg)	Peso médio após repasto (mg)	Peso médio de sangue ingerido (mg)
XNHI – TcI	8,5 ($\pm 1,3$)	40,7 ($\pm 8,0$)	32,2 ($\pm 7,8$)
XNHI– TcII	12,4 ($\pm 1,4$)	40,6 ($\pm 12,2$)	28,2 ($\pm 9,8$)
XNHI - TcI +TcII	10,8 ($\pm 2,0$)	42,3 ($\pm 6,8$)	31,5 ($\pm 5,3$)

5.3.2 – Mortalidade dos insetos após a alimentação natural

Não foi observada mortalidade em nenhum inseto dos grupos experimentais.

5.3.3 - Número de flagelados por inseto (NFI)

A estimativa do NFI revelou que o grupo de triatomíneos que alimentaram em camundongos inoculados com população mista de TcI+TcII, apresentou os valores [174,12; $\pm 54,60$], seguido do grupo de insetos que alimentaram em camundongos

inoculados com o clone de TcI [3,5; $\pm 3,5$] e, finalmente, o grupo TcII, não apresentou nenhum inseto positivo (**Tabela – VIII**).

Tabela VIII - Número de flagelados por insetos (NFI), percentual de infectividade (%INF) e percentual de metaciclogênese (%DIF) em triatomíneos que realizaram o repasto em camundongos infectados com tripomastigota metacíclicos de *Trypanosoma cruzi*.

Grupo	NFI	%INF	%DIF
Experimental			
XNHI – TcI	3,5; $\pm 3,5^a$	1/40 [#]	0 ^c
XNHI– TcII	-	0/40*	-
XNHI - TcI +TcII	174,12; $\pm 54,60^a$	16/40* [#]	20 ^c

a = Diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

* e # = Diferenças significativas pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,01$)

c = Diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,05$).

5.3.4 – Percentual de infectividade (%INF)

O exame dos insetos infectados no xenodiagnóstico natural revelou positividade variável, considerando a origem dos camundongos nos quais os insetos alimentaram. Entre os que alimentaram em camundongos inoculados com tripomastigotas metacíclicos de clone de TcI, a positividade foi de 2,5% (1/40). No grupo de insetos alimentados em camundongos inoculados com o clone de Tc II, não foi detectada infecção em nenhum deles (0/40). Já o grupo dos que alimentaram em camundongos inoculados com tripomastigotas metacíclicos contendo populações mistas (TcI+TcII), apresentou o maior % INF (40% = 16/40), sendo significativamente diferente dos demais grupos ($P < 0,01$) (**Tabela - VIII**).

5.3.5 - Percentual de metaciclogênese (%DIF)

A metaciclogênese, observada 30 dias após o xenodiagnóstico nos insetos que se alimentaram em camundongos infectados com formas tripomastigotas metacíclicas foi de 20% e observada apenas nos insetos do grupo de infecção mista (TcI+Tc II) (**Tabela - VIII**).

5.3.6 – Xenocultura (%Xc⁺)

A xenocultura foi realizada individualmente, em todos os insetos de todos os grupos experimentais. A positividade da xenocultura foi de 10% (4/40), 0% (0/40) e 40% (16/40) nos grupos infectados com a TcI, TcII e Tc I+Tc II (mista), respectivamente. Foram encontradas diferenças significativas entre o grupo infectado com a TcI e TcI+TcII (infecção mista) ($P < 0,05$), TcII e TcI+TcII (infecção mista) ($P < 0,01$) e TcI e TcII ($P < 0,05$).

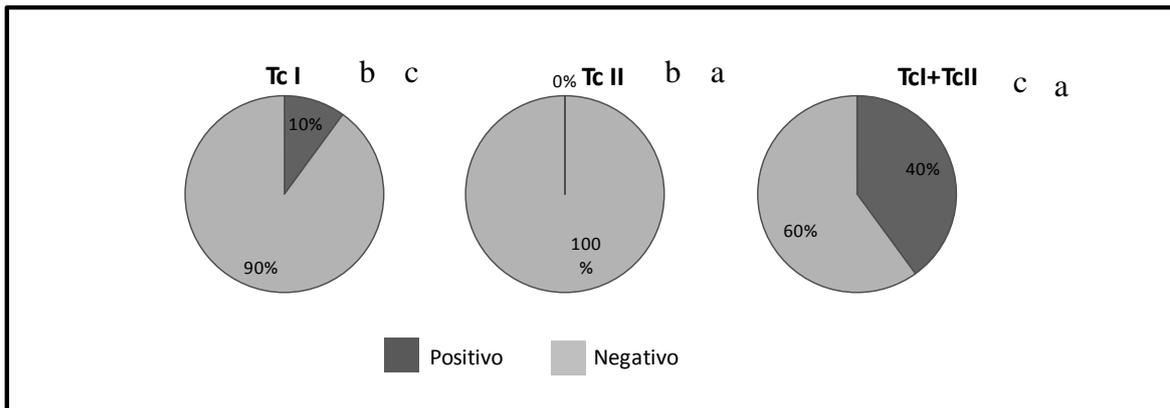


Figura 5 : Percentual de xenocultura positiva (%XC) de triatomíneos infectados com clones de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcI+TcII (infecção mista) trinta dias após do repasto em camundongos infectados com tripomastigoras metacíclicas.

b e c = Diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,05$)

a = Diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,01$)

5.5 - Caracterização isoenzimática e molecular dos isolados de *Trypanosoma cruzi* após passagem entre os hospedeiros invertebrados e vertebrados

No total foram obtidas 23 massas úmidas de isolados do *T. cruzi* para caracterização isoenzimática e molecular (Tabela-VII).

Tabela IX - Código de identificação, hospedeiro de origem, DTU de *Trypanosoma cruzi* que constituiu o inóculo, e origem das amostras submetidas à caracterização molecular e isoenzimática.

Amostra	Identificação da Amostra	Hospedeiro	DTU que constituiu o inóculo	Origem das amostras
1	XAHI-TcI-A	Invertebrado	<i>T. cruzi</i> I	Mistura de insetos
2	XAHI-TcI-B	Invertebrado	<i>T. cruzi</i> I	Mistura de insetos
3	XAHI-TcII-A	Invertebrado	<i>T. cruzi</i> II	Mistura de insetos
4	XAHI-TcII-B	Invertebrado	<i>T. cruzi</i> II	Mistura de insetos
5	XAHI-TcI+TcII-A	Invertebrado	Mista	Mistura de insetos
6	XAHI-TcI+TcII-B	Invertebrado	Mista	Mistura de insetos
7	IAHV-TcI-A1	Vertebrado	<i>T. cruzi</i> I	Camundongo 2
8	IAHV-TcI-A2	Vertebrado	<i>T. cruzi</i> I	Camundongo 3
9	IAHV-TcI-B1	Vertebrado	<i>T. cruzi</i> I	Camundongo 11
10	IAHV-TcII-A	Vertebrado	<i>T. cruzi</i> II	Camundongo 4
11	IAHV-TcII-B	Vertebrado	<i>T. cruzi</i> II	Camundongo 5
12	IAHV-TcI+TcII-A1	Vertebrado	Mista	Camundongo 1
13	IAHV-TcI+TcII-A2	Vertebrado	Mista	Camundongo 2
14	IAHV-TcI+TcII-A3	Vertebrado	Mista	Camundongo 3
15	IAHV-TcI+TcII-B1	Vertebrado	Mista	Camundongo 12
16	IAHV-TcI+TcII-B2	Vertebrado	Mista	Camundongo 14
17	XNHI-TcI-A1	Invertebrado	<i>T. cruzi</i> I	Alimentou cam. 2
18	XNHI-TcI-A2	Invertebrado	<i>T. cruzi</i> I	Alimentou cam. 3
19	XNHI-TcI-B	Invertebrado	<i>T. cruzi</i> I	Alimentou cam.11
20	XNHI-TcI+TcII-A1	Invertebrado	Mista	Alimentou cam.1
21	XNHI-TcI+TcII-A2	Invertebrado	Mista	Alimentou cam.2
22	XNHI-TcI+TcII-A3	Invertebrado	Mista	Alimentou cam.2
23	XNHI-TcI+TcII-B	Invertebrado	Mista	Alimentou cam.10

XAHI - Infecção por xenodiagnóstico artificial do hospedeiro invertebrado

IAHV - Infecção nos hospedeiros vertebrado

XNHI - Xenodiagnóstico natural do hospedeiro invertebrado

A: Experimento 1

B: Experimento 2 (replica)

5.5.1 – Análise do perfil isoenzimático

5.5.1.1 - Infecções monoclonais

A análise do perfil de isolados de todos os hospedeiros (invertebrado, vertebrado e invertebrado) infectados com clones TcI apresentou perfil de Zimodema I nas três enzimas (GPI, IDH e G6PD).

Os isolados de todos hospedeiros (invertebrado, vertebrado e invertebrado), infectados com clones TcI apresentaram perfil de TcI na caracterização isoenzimática. Por outro lado, os isolados de insetos infectados com clones de TcII, apresentaram perfil de TcI na GPI (canaletas 10, 11 e 12 – **Figura – 7**) obtidas de insetos (XAHI), camundongos (IAHV) e novamente em insetos (XNHI) respectivamente, enquanto nas enzimas de IDH e G6PD estas mesmas amostras apresentaram o perfil TcII. Foi então observado no perfil da GPI mudança de perfil de TcII para o perfil tipo TcI.

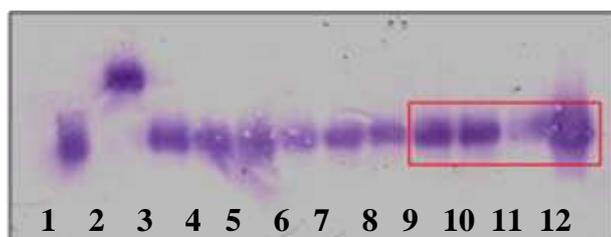


Figura 6 - Perfil isoenzimático da enzima GPI dos isolados de *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros invertebrado, vertebrado e invertebrado infectados com clones de TcI e TcII.

1: Ref. TcI; **2:** Ref. TcII; **3:** amostra 1; **4:** amostra 2; **5:** amostra 7; **6:** amostra 8; **7:** amostra 17; **8:** amostra 18; **9:** amostra 1 **10:** amostra 4; **11:** amostra 10; **12:** amostra 11.

5.5.1.2 - Infecções mistas

Todas as figuras referentes à caracterização isoenzimática dos isolados de infecções mistas mostram resultados de toda a sucessão de passagens a que os parasitos foram submetidos. Entretanto os comentários foram feitos seguindo a ordem natural dos experimentos, ou seja, XAHI seguido de IAHV e depois de XNHI.

- **Isolados da infecção artificial do hospedeiro invertebrado (XAHI)**

Dois isolados foram obtidos da primeira infecção em triatomíneos. A **amostra 6** apresentou perfil de infecção mista na enzima GPI (**canaleta-4-Figura-8**), enquanto a **amostra 5** apresentou o perfil de TcI. Já o perfil eletroforético da enzima IDH desses mesmos isolados (2/2) foi de TcI. Esses mesmos isolados quando foram analisados pelo

perfil eletroforético da enzima G6PD apresentaram perfis de TcII. Esses resultados foram interpretados como indicadores da presença de infecções mistas no hospedeiro invertebrado infectado por xenodiagnóstico artificial (canaletas 3 e 4 - **Figura-8**), confirmando assim um dos resultados observados pelo perfil da GPI.

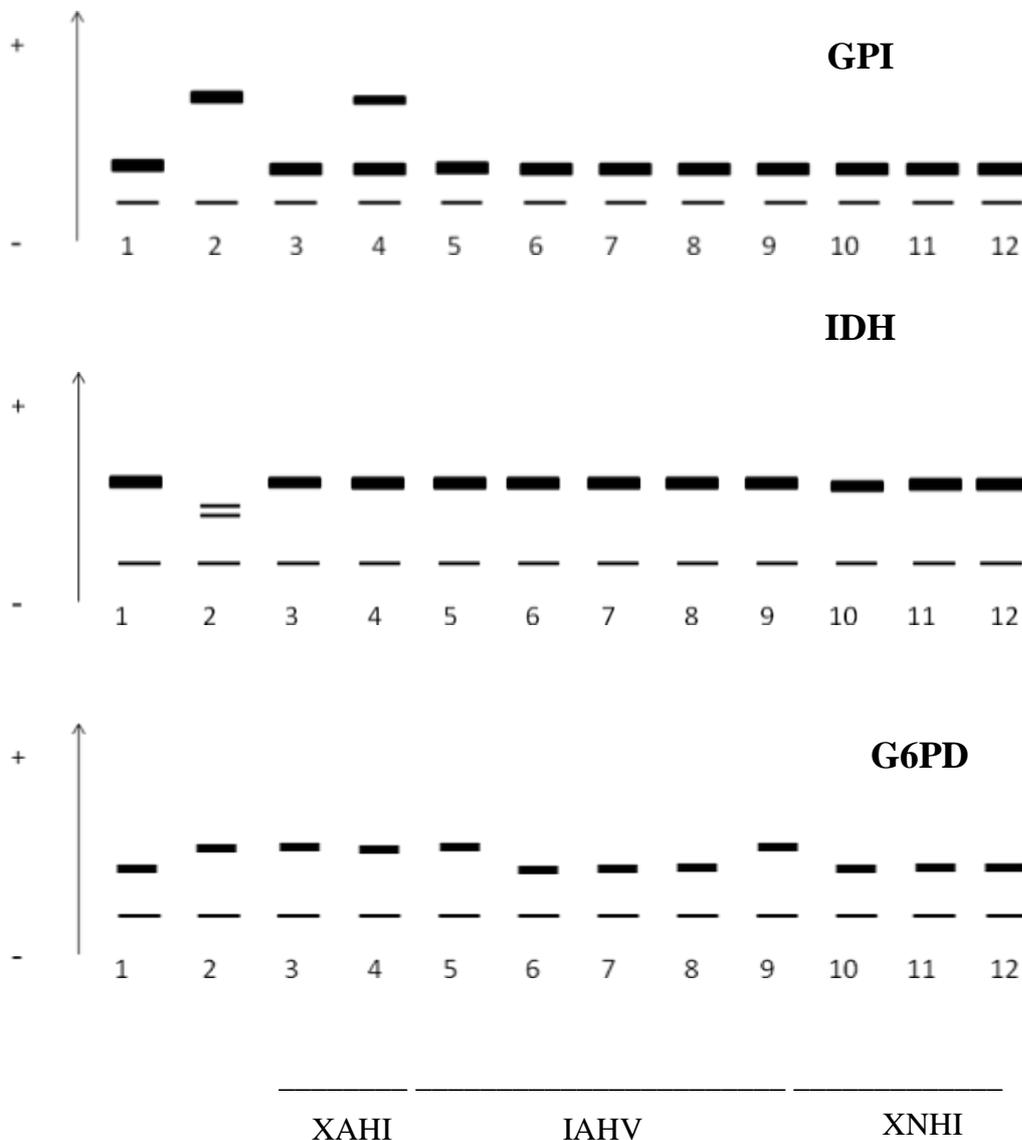


Figura 7 - Diagrama representativo do perfil eletroforético das enzimas (GPI, IDH e G6PD) dos isolados *Tripanosoma cruzi. cruzi* provenientes do grupo de infecção mista. **1:** Ref. TcI (P209 c11); **2:** Ref. TcII (CBB c13); **3:** amostra 5; **4:** amostra 6; **5:** amostra 12 ; **6:** amostra 13; **7:** amostra 14; **8:** amostra 15; **9:** amostra 16; **10:** amostra 20; **11:** amostra 22; **12:** amostra 23.

- **Isolados da infecção por xenodiagnóstico artificial do hospedeiro vertebrado (IAHV)**

Cinco isolados foram obtidos dos camundongos. Quando os parasitos foram isolados dos camundongos infectados por infecção mista todas as amostras apresentaram o perfil da TcI nas enzimas GPI e IDH. As **amostras 12 e 16** apresentaram perfil da DTU TcII na enzima G6PD, enquanto as **amostras 13, 14 e 15** apresentaram o perfil enzimático característico da DTU TcI. No hospedeiro vertebrado a presença da DTU TcI foi mais destacada, e a infecção mista foi detectada em dois isolados de *T. cruzi* neste hospedeiro (canaletas 5 e 9 - **Figura-8**) quando se considerou o conjunto de perfis observados nos três sistemas enzimáticos utilizados.

- **Isolados da infecção natural artificial no hospedeiro invertebrado (XNHI)**

Quatro isolados foram obtidos da segunda infecção em triatomíneos. As análises dos perfis eletroforéticos dos isolados de *T. cruzi* dos hospedeiros invertebrados que se infectaram por xenodiagnóstico natural (XNHI) ao se alimentarem em camundongos infectados com infecções mistas (TcI+TcII), revelaram que todos os parasitos apresentaram o perfil da DTU TcI em todas as enzimas analisadas (**Figura-8**).

5.5.2 – Análise da amplificação da região 3' do gene rDNA 24Sa

5.5.2.1 - Infecções monoclonais

Foi observado que pela análise da região 3' do gene rDNA 24Sa (**Figura-9**), que as amostras isoladas dos insetos e camundongos infectados apenas com parasitos TcI apresentaram o perfil de banda de 110pb, característico de TcI (canaletas 4, 5 e 6), enquanto todas as amostras do isoladas dos insetos e camundongos infectados com apenas TcII apresentaram o perfil de 125pb, característico da TcII (canaletas 7, 8, e 9).

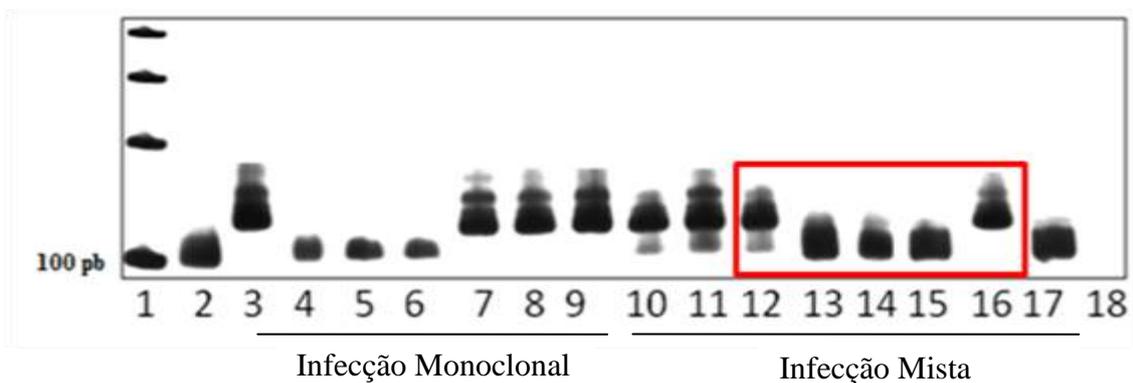


Figura 8 - Gel de poliacrilamida a 6% representativo da amplificação pela PCR, da região 3' do gene rDNA 24 Sa para os clones P209 c11 e CBB c13 de *Trypanosoma cruzi* e seus isolados após passagem alternada entre hospedeiro invertebrado (XAHI) vertebrado (IAHV) e invertebrado (XNHI). Canaletas: **1**: Ref. PM 100 pb; **2**: Referência TcI; **3**: Referência Tc II; **4**: amostra-1; **5**: amostra 7; **6**: amostra 17; **7**: amostra 3; **8**: amostra 10; **9**: amostra 11; **10**: amostra 5; **11**: amostra 6; **12**: amostra 12; **13**: amostra 13; **14**: amostra 14; **15**: amostra 15; **16**: amostra 16; **17**: amostra 22; **18**: Branco. **Retângulo representa isolados do grupo IAHV.**

5.5.2.2 – Infecção Mista

- **Isolados da infecção artificial do hospedeiro invertebrado (XAHI)**

Os isolados dos insetos que alimentaram por xenodiagnóstico artificial com mistura de clones TcI+TcII (infectado com infecções mistas), (canaletas 10 e 11 - **Figura-9**) apresentaram o perfil de infecção mista, sendo reveladas bandas referentes aos 110/125pb no perfil eletroforético do gene rDNA 24Sa, características de TcI e TcII respectivamente.

- **Isolados da infecção artificial do hospedeiro vertebrado (IAHV)**

A caracterização dos isolados originados do hospedeiro vertebrado (**Figura-9**), revelou que o perfil predominante (3/5) do gene rDNA 24 Sa foi de TcI, ou seja, 110pb (canaletas 13, 14 e 15). Um isolado, **amostra 12** (canaleta 12) apresentou perfil característico de infecção mista 110/125pb e o isolado **amostra 16** (canaleta 16) apresentou perfil característico de TcII com este marcador.

- **Isolados de xenodiagnóstico natural no hospedeiro invertebrado (XNHI)**

Quando os parasitos provenientes de infecção mista por xenodiagnóstico artificial passaram pelo hospedeiro vertebrado e voltaram para o invertebrado por meio do xenodiagnóstico natural, a caracterização pelo perfil do gene rDNA 24Sa dos isolados dos insetos só revelou o perfil TcI de 110pb (**Figura-9**).

5.5.3 – Análise do perfil RAPD

5.5.3.1- Infecção monoclonal

As amostras isoladas de todos hospedeiros (XAHI, IAHV e XNHI) do grupo experimental infectado com TcI apresentou perfil de RAPD esperado da DTU I. Nos hospedeiros infectados com TcII, o padrão de bandas da DTU TcII foi observado após a passagem nos hospedeiro invertebrado e vertebrado, tanto para o iniciador A10 (**Figura-10**) bem como para o A7 (não apresentado). No grupo de insetos que se alimentaram em camundongos infectados (XNHI) com clones da DTU TcII não foi possível o isolamento do parasito no hospedeiro invertebrado que permitisse a realização da caracterização por este marcador.

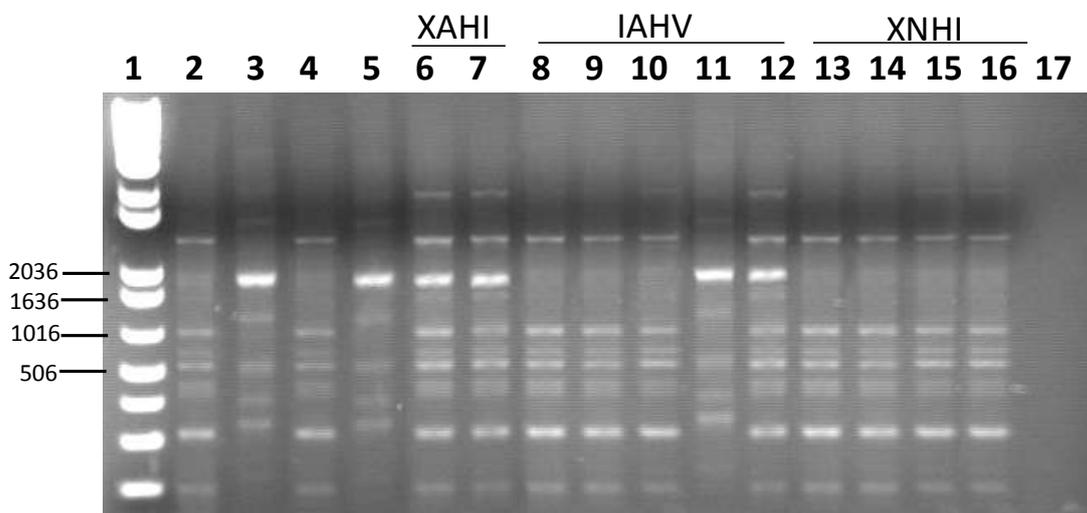


Figura 9 - Gel de Agarose 1% representativo com os perfis de RADP obtidos pelos iniciadores (A10) para os clones P209 c11 e CBB c13 de *Trypanosoma cruzi* e seus isolados após passagem alternada entre hospedeiro invertebrado (XAHI) e vertebrado (IAHV). Canaletas: **1:** Ref. PM 1 Kb; **2;** Ref. TcI clone P209 c11; **3:** Ref. TcII clone CBB c13; **4:** Amostra 17; **5:** Amostra 10; **6:** Amostra 5; **7:** Amostra 6; **8:** Amostra 13; **9:** Amostra 14; **10:** Amostra 15; **11:** Amostra 16; **12:** Amostra 12; **13:** Amostra 20; **14:** Amostra 21; **15:** Amostra 22; **16:** Amostra 23; **17:** branco.

5.5.3.2 - Infecção mista

- **Isolados da infecção por xenodiagnóstico artificial no hospedeiro invertebrado (XAHI)**

As amostras isoladas na etapa XAHI apresentaram o perfil de infecção mista, com bandas características de TcI e TcII na caracterização por RAPD (canaletas 6 e 7 - **Figura-10**).

- **Isolados da infecção artificial do hospedeiro vertebrado (IAHV)**

Quando foram avaliados os isolados do IAHV houve uma grande heterogeneidade nos resultados da caracterização por RAPD. Três amostras (3/5) apresentaram o perfil de TcI (canaleta 8, 9 e 10 – **Figura-10**), uma (1/5) perfil de Tc II (canaleta 11 – **Figura- 10**) e a **amostra 12** (canaleta 12) apresentou perfil de infecção mista (TcI+TcII) (**Figura-10**).

- **Isolados da infecção por xenodiagnóstico natural no hospedeiro invertebrado (XNHI)**

A caracterização dos isolados do XNHI por RAPD revelou em todos os isolados de triatomíneos o perfil apenas de TcI (canaletas 13, 14, 15 e 16 - **Figura-10**).

5.6 Identificação individual dos isolados caracterizados molecularmente (isoenzima + rDNA24Sa + RAPD)

A **Figura-11** apresenta um resumo dos perfis genéticos de *T. cruzi* encontrados nas infecções monoclonais e mistas em cada passagem pelo hospedeiro invertebrado (XAHI) seguida do hospedeiro vertebrado (IAHV) e novamente no hospedeiro invertebrado (XNHI) encontrados com os diferentes marcadores moleculares utilizados isoenzima, rDNA e RAPD.

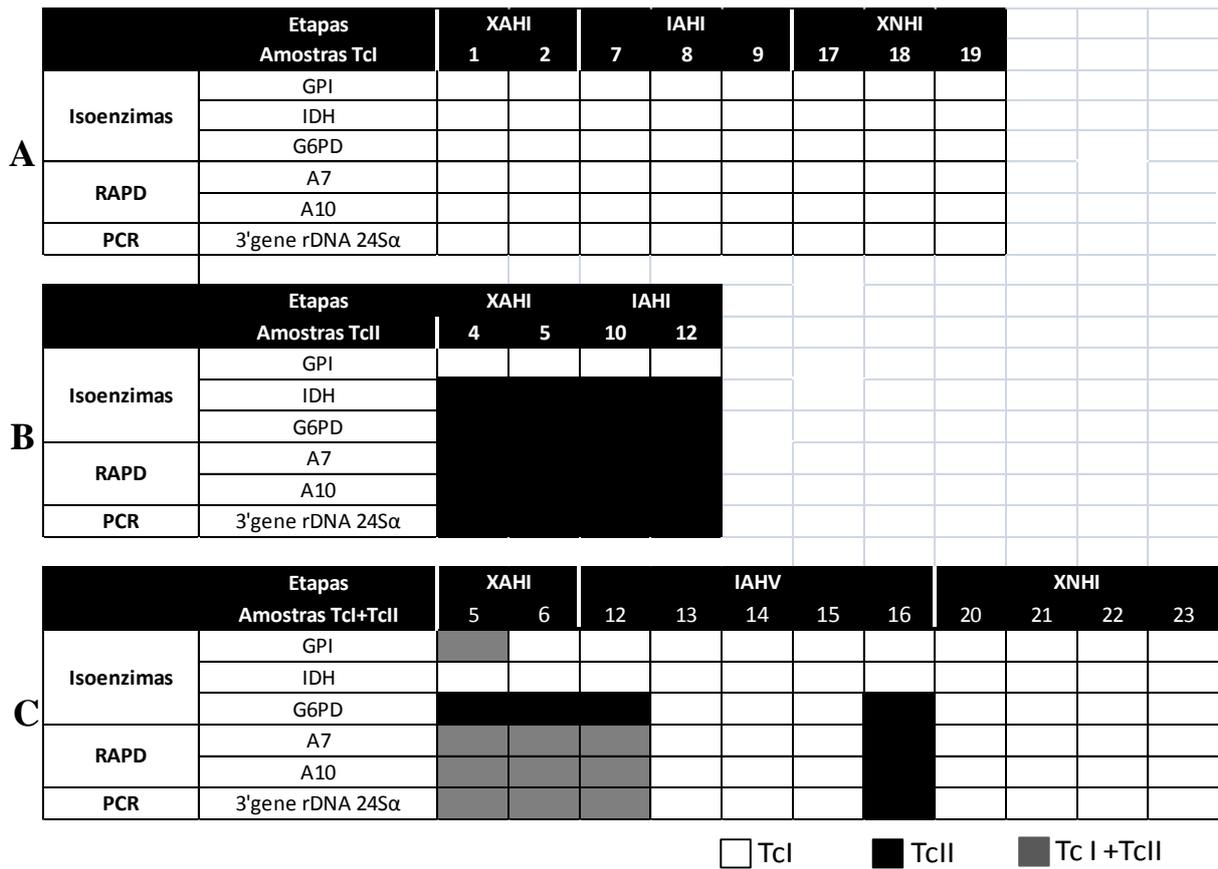


Figura 10 - Resultado da caracterização isoenzimática e molecular dos isolados de *T. cruzi* originados dos hospedeiros invertebrados (XAHI)-vertebrado (IAHV)-invertebrado (XNHI) infectados com TcI (A), TcII (B) e mistura dos clones TcI+TcII (C).

6.0 – DISCUSSÃO

Com o avanço no conhecimento da epidemiologia molecular do *T. cruzi* vários estudos têm demonstrado a presença natural de infecções mistas em hospedeiros invertebrados e vertebrados (Bosseno *et al.*, 1996; Solari *et al.*, 2001; Di Noia *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003; Mejia *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2008; Lisboa *et al.*, 2008; Abolis *et al.*, 2011), o que pode apresentar alterações na dinâmica de transmissão do parasito e ter uma influência importante na epidemiologia na DCh. Além disso, estudos experimentais com infecções mistas de *T. cruzi* pertencentes a grupos genéticos distintos demonstraram que esse tipo de infecção produz alterações significativas na relação parasito-hospedeiro. Nesse sentido, Pinto *et al.*, (1998) e (2000) observaram que o desenvolvimento de clones do *T. cruzi* em infecções mistas no inseto vetor foi alterado, sendo um grupo mais favorecido do que outro quando as amostras foram isoladas após o desenvolvimento nesse hospedeiro. Semelhantemente, no hospedeiro vertebrado, também, foram observadas mudanças significativas nas propriedades biológicas do parasito em infecções mistas que resultaram em novas propriedades, não esperadas, considerando-se o comportamento das populações individuais (Lana *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2006).

Considerando que as populações mistas estão presentes naturalmente em hospedeiros com infecção pelo *T. cruzi* e, que experimentalmente estas resultaram em mudanças significativas no comportamento biológico do parasito em seus hospedeiros, é razoável supor que essas infecções poderiam repercutir inclusive na dinâmica de transmissão, como por exemplo, perda da multiclonalidade da população do parasito durante a passagem alternada pelos diferentes hospedeiros, invertebrado e vertebrado. Desse modo, neste estudo buscamos, de forma detalhada e minuciosa, verificar o impacto da infecção mista composta por estoques clonais de *T. cruzi*, pertencentes a dois grupos genéticos distintos, por meio de passagens alternadas entre hospedeiro invertebrado (*T. infestans*) e vertebrado (camundongo Swiss) e invertebrado (*T. infestans*) novamente, a fim de investigar o papel destas no estabelecimento da infecção e evolução do parasito.

A fim de alcançar essa proposta, foi utilizada a espécie de triatomíneo *T. infestans* como modelo, por ser um importante vetor na DCh no Cone Sul da América, amplamente adaptado ao ambiente domiciliar e adaptado às condições laboratoriais, além de já ter sido muito utilizado por outros autores como modelo em estudos de interação *T. cruzi* - vetor.

Os resultados obtidos em *T. infestans* neste estudo corroboram os de outros autores que demonstraram que infecções mistas alteram o desenvolvimento da infecção e podem influenciar a transmissibilidade do *T. cruzi* por este hospedeiro na natureza (Pinto *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2000; Lana *et al.*, 2000). A análise dos resultados obtidos quando avaliados “durante a primeira passagem no hospedeiro invertebrado”, ou seja, xenodiagnóstico artificial do hospedeiro invertebrado (XAHl) revelou que o grupo TcI apresentou maior %INF, NFI e %DIF que o grupo de TcII. Corroborando achados de outros autores que, ao estudarem o desenvolvimento de infecções monoclonais de *T. cruzi* em *T. infestans*, também observam que os parasitos caracterizados com pertencentes a DTU I (grupo TcI, Zingales *et al.*, 2009) se desenvolvem melhor do que os caracterizados como a DTU TcII (grupo TcI e TcV), produzindo mais flagelados e maiores taxa de tripomastigotas metacíclicos infectantes para o hospedeiro vertebrado (Schaub, 1989; Alvarenga e Brofen, 1997; Lana *et al.*, 1998). Garcia *et al.* (1984) também observaram que no gênero *Rhodnius* clones da DTU TcI desenvolvem melhor do que as clones da DTU Tc II. Contudo, já foi demonstrado que uma mesma cepa de *T. cruzi* apresenta variação na taxa de infectividade, no número de flagelados por inseto e na porcentagem de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos, quando avaliadas em diferentes gêneros de insetos vetores, havendo uma tendência dos insetos vetores locais serem mais susceptíveis a cepas de *T. cruzi* originárias da mesma região geográfica (Dias, 1934; Zeledón, 1974; Perlowagora-Szumlewics *et al.*, 1990; Kollien e Schaub, 2001).

Estes mesmos parâmetros, avaliados em *T. infestans* expostos a infecções mistas (TcI+TcII), revelaram comportamento biológico (%INF e NFI) semelhante ao observado nos insetos expostos à infecção monoclonal com XAHl-TcII, apresentando diferença significativa em relação ao grupo de insetos infectados com XAHl-TcI. Nesse caso, seria esperada uma maior influência do clone da DTU TcI na mistura, porque este se apresentou quando isolado mais adaptado ao vetor que o clone da DTU TcII. Pinto *et al.* (1998), que também avaliaram infecções biclonais de *T. cruzi*, sugeriram que em infecções mistas não ocorreria apenas à justaposição entre os clones da mistura, mas sim uma interação entre eles com consequentes alterações nas propriedades biológicas do parasito que não podem ser previstas tendo como pressuposto o conhecimento prévio da genética do parasito e sua correlação com suas propriedades biológicas já demonstrado por outros autores (Laurent *et al.*, 1997; Revolo *et al.*, 1998; Lana *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2006). Mesmo considerando a ocorrência de um elevado desvio padrão entre as médias das

diversas características dos parasitos de um mesmo grupo genético, Lana *et al.* (1998) demonstraram em seu conjunto, que cada grupo genético apresenta tendências e valores distintos, especialmente entre aqueles pertencentes às DTU TcI e DTU TcII.

Araujo *et al.*, (2007) ao utilizarem como modelo o triatomíneo da espécie *T. brasilienses* expostos à infecção com cepas de *T. cruzi* pertencentes as DTU TcI e DTU TcII, observaram que os padrões de colonização do trato digestório por populações mistas foram diferentes quando comparados com os padrões de colonização de populações monoclonais. Na infecção simultânea com as duas populações de *T. cruzi* a colonização do trato digestório aconteceu de maneira mais eficiente, sugerindo uma possível estimulação recíprocas da interação das diferentes linhagens de parasito. Roode *et al.*, (2005), estudando também em *Plasmodium chabaudi* o papel de infecções mistas na evolução dos parasitos no vetor, observaram diferenças entre a infecção monoclonal e as infecções mistas, sendo a taxa de infecção menores nos insetos que foram submetidos a infecções mistas.

A metaciclogênese é um evento crucial no ciclo de vida do *T. cruzi* no inseto vetor, uma vez que este fenômeno determina a diferenciação para a forma tripomastigota metacíclica, que é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. A avaliação desse parâmetro em nosso estudo mostrou um aumento na %DIF nas infecções mistas (%DIF XAHI TcI+TcII = 20%), comparativamente com as monoclonais, (%DIF XAHI-TcI= 12% e %DIF XAHI TcII = 6%). São diversos os fatores capazes de induzir a metaciclogênese, entre eles o cAMP excretado pelos túbulos de Malpighi e presente na urina de triatomíneos; o pH e a osmolalidade do meio; outros metabólicos presentes no trato intestinal desses insetos, o estado nutricional do inseto e as característica genéticas do *T. cruzi* e do vetor (Schaub, 1989a; Schaub, 1989b; Perlowagora-Szumlewicz e Moreira, 1990; Kollien e Schaub, 2000; Schaub, 2009).

A avaliação da infecção no hospedeiro vertebrado, por meio do exame de sangue a fresco, não foi capaz de detectar parasitos circulantes no sangue periférico dos camundongos que foram inoculados apenas com um dos clones utilizados (Grupos XAHV-TcI e XAHV-TcII). Já entre os animais inoculados com infecção mista do *T. cruzi* (Grupo IAHV-TcI+TcII), foi detectada parasitemia patente, embora bem reduzida, apenas no 28º dia após o inóculo e em único animal. Uma possível explicação para a baixa taxa de infecção dos camundongos é o fato que a passagem do *T. cruzi* pelo hospedeiro invertebrado pode provocar mudanças nas características biológicas do *T. cruzi* e, esse

efeito tem sido amplamente discutido na literatura (Lana, 1981; Magalhães *et al.*, 1985, 1996). As análise comparativa de nossos resultados com outros dados obtidos por nosso grupo, utilizando os mesmos clones de *T. cruzi* TcII sugerem que houve uma aumento do período pré-patente no animais infectados com formas metacíclicas quando comparados com camundongos (linhagem Balb/c e Swiss albina) infectados com formas sanguíneas nos quais a parasitemia foi patente (Toledo *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2006; Santos, 2007) mais precocemente e em níveis mais elevados inclusive com os clones aqui estudados (P209 cl1–TcI e CBB cl3–TcII). Alguns autores confirmam essas observações mostrando que a passagem de certas cepas de *T. cruzi* pelo triatomíneo induz um retardo na parasitemia, adiando o pico de parasitemia e diminuição da carga parasitária (Rego e Garnhan, 1956; Phillips, 1960, Cavalheiro e Collares, 1965; Franciscon, 1978; Lana, 1981). Por outro lado, Bahia (1985) ao avaliar estes aspectos da interação do parasito com seus hospedeiros, não observaram alterações significativas no desenvolvimento da infecção após passagens cíclicas entre o hospedeiro invertebrado e vertebrado. Por outro lado, Magalhães *et al.* (1985) e (1996), estudando cepas isoladas da Bahia, observaram aumento da virulência após sua passagem em duas espécies de insetos vetores, *P.mesgistus* e *T. infestans*.

Contudo, a análise comparativa dos resultados obtidos por Lana *et al.*, (2000) Toledo *et al.* (2002) e Martins *et al.* (2006) deve ser feita considerando as diferenças do protocolo experimental empregado. Toledo *et al.* (2002) e Martins *et al.* (2006) utilizaram formas tripomastigoras sanguíneas para infectar camundongos da linhagem Balb/c, além do inóculo de 1×10^4 . Lana *et al.* (2000) utilizaram formas tripomastigotas metacíclicas provenientes de meios de cultura. No presente estudo, foram utilizadas formas tripomastigotas metacíclicas originadas de triatomíneos, camundongos da linhagem *Swiss* e o número de parasitos do inóculo foi dez vezes menor. Tais diferenças podem justificar o baixo índice de infectividade encontrado em nosso estudo, reforçando a idéia de que tanto a forma evolutiva, quanto a origem desta, bem como o número e a via do inóculo influenciam a taxa de infectividade e a evolução da infecção no hospedeiro, além de sua baixa virulência e seu *background* genético (Andrade *et al.*, 2002; Bahia *et al.*, 2002). Chamamos a atenção para o fato de que o pequeno inóculo utilizado no trabalho foi devido à dificuldade de obter parasitos do hospedeiro invertebrado. Por outro lado, o inóculo menor do que o habitualmente utilizado nos estudos experimentais pode ser considerado

uma estratégia interessante, pois aproxima mais dos verdadeiros inóculos que possivelmente acontecem nos ciclos naturais de transmissão do parasito.

A hemocultura foi realizada para confirmar a infecção nos camundongos, revelando que 44% dos animais do grupo com TcI e 19% do grupo com TcII. No grupo IAHV-TcI+TcII a positividade da hemocultura foi 62%, significativamente maior que a do grupo IAHV TcII. Esses resultados permitem sugerir que clones dos grupos TcI e TcI+TcII apresentam uma maior capacidade de multiplicação no hospedeiro vertebrado quando comparados aos clones do grupo TcII, o que já tinha sido observado por Lana *et al.*, (2000) que obtiveram percentual de hemocultura positivas de 100% e 79% para grupo de TcI e TcII, respectivamente. Toledo *et al.* (2002) observaram, taxas de infectividade ao exame a fresco para os mesmos de 98,3% para TcI e 67,11% para TcII, enquanto Martins *et al.*, (2006) observaram percentual positividade da hemocultura de 90% para TcI e 89.6% para TcII.

Quando os animais expostos à infecção mista foram avaliados foi possível observar maior taxa de infectividade (62%) destes comparativamente às infecções monoclonais. Martins *et al.* (2006) analisaram infecções mistas constituídas dos mesmos genótipos utilizados neste estudo, e observaram um aumento na taxa de positividade da hemocultura nos grupos infectados com infecções mistas (TcI+TcII). As mudanças observadas por estes autores não determinaram um padrão de comportamento que fosse característico de um ou de outro clone que constituiu a população mista uma vez que foram observados efeitos de estimulação e de inibição em relação à curva de parasitemia. Os nossos resultados também revelaram um aumento no número de camundongos infectados quando submetidos à infecção mista, infecção esta comprovada por hemocultura. Em conjunto esses dados sugerem que a interação de duas populações no hospedeiro vertebrado, em algumas situações, pode ser benéfica para o parasito, possibilitando aumento de sua capacidade de multiplicação no mesmo, que, conseqüentemente, favorecendo a sua transmissão para outros hospedeiros.

Já Franco *et al.* (2003) ao estudar infecções mistas em ratos, infectados com a cepa monoclonal JG (DTU TcII) e clones da cepa CL Brener (DTU TcVI), não observaram alterações no perfil da curva de parasitemia, mas relataram mudança no tropismo tecidual e nas taxas de mortalidade desses clones quando associados. A infecção pelo clone da cepa CL Brener foi letal para os animais; aqueles infectados com a cepa JG apresentaram baixos índices de mortalidade, enquanto a infecção com as duas cepas resultou em 0% de

mortalidade. Rodrigues *et al.* (2010) ao analisarem o efeito de infecção mista das cepas JG e CL Brener em camundongos BALB/c que apresentam diferentes perfis da curva de parasitemia em relação às infecções individuais verificaram que entre os animais inoculados com as duas populações, a curva de parasitemia apresentou valores intermediários aos observados entre os animais inoculados com apenas uma das cepas.

Na tentativa de confirmar a infecção nos camundongos inoculados e considerando a baixa positividade da hemocultura em alguns grupos e a alta eficiência da PCR na detecção do DNA do parasito em amostras de sangue de camundongo (Miyamoto *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008), a PCR foi também realizada em amostras provenientes do sangue dos camundongos que apresentaram resultados negativos nos exames parasitológicos (ESF e HC). Nenhum dos animais foi positivo por esta técnica, demonstrando que os animais provavelmente não se infectaram, uma vez que Miyamoto *et al.* (2006) demonstraram eficiência da PCR em detectar a infecção em 100% dos camundongos infectados com clones da DTUs TcI e TcII aqui estudados e em 100% e 86,5%, respectivamente dos camundongos com infecção mista envolvendo clones destes mesmos grupos genéticos (Martins *et al.*, 2008). No entanto, para confirmar essa hipótese de que os animais não estavam infectados testes sorológicos deveriam ser realizados pesquisando a presença de anticorpos anti-*T. cruzi*. Possivelmente a sorologia acrescentaria muito pouco nesta investigação tendo em vista o grande volume de material biológico coletado para realização dos exames parasitológicos realizados e alta sensibilidade de alguns deles (hemocultura e PCR) em camundongos (Miyamoto *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008).

A PCR, em nosso caso, não adicionou resultados positivos em relação à hemocultura, e os resultados semelhantes em ambos os métodos foi de certa forma esperado uma vez que na hemocultura foi utilizado um volume de 0,5 mL sangue do hospedeiro, aproximadamente duas vezes maior do que o utilizado na PCR, uma técnica mais sensível. O desempenho da hemocultura também se deve ao fato da infecção nos animais ser recente e pelo fato de que Luz (1998), estudando a sensibilidade da hemocultura artificial, pode perceber que esta técnica foi positiva com baixos números de parasitos presentes na amostra (aproximadamente a um parasito por tubo).

Com a realização do xenodiagnóstico nos animais infectados com forma tripomastigotas metacíclicas foi reproduzido todo o ciclo biológico do *T. cruzi*. As avaliações realizadas no inseto foram o exame a fresco do conteúdo intestinal e a xenocultura. Observou-se que o %INF nos grupos monoinfectados XNHI-TcI e XNHI-

TcII foram reduzidas devido ao baixo número de parasitos encontrados no hospedeiro vertebrado, refletindo nas análises observadas no hospedeiro invertebrado na etapa subsequente. A infecção dos triatomíneos expostos à infecção mista apresentou índices maiores de NFI, %INF e %DIF do que os grupos com infecção monoclonal.

No grupo do XNHI-TcII, não foram encontrados insetos positivos. Já entre os do grupo XNHI-TcI+TcII, o %INF foi de 40%. A positividade observada nas xenoculturas foram maiores, não sendo, entretanto observado, um aumento significativo em relação ao exame a fresco do conteúdo do trato digestório dos insetos. Almeida *et al.* (1973), ao realizar o xenodiagnóstico em animais com e sem parasitemia patente, observaram que os triatomíneos que se alimentaram em animais com parasitemia patente apresentaram números variados de formas de *T. cruzi* em suas fezes, já os que alimentaram nos animais com parasitemia subpatente foi encontrado menor número de parasitos. Neal e Miles (1977) sugeriram que seria necessária pelo menos a presença de 177 parasitos para infectar *Rhodnius prolixus*, e que o número ideal seria de 1×10^3 a 1×10^4 . Em contrapartida, no presente estudo foi possível encontrar triatomíneos infectados quando estes se alimentaram em camundongos com parasitemia subpatente, sugerindo que o número mínimo de parasitos para infectar os triatomíneos é variável e pode estar relacionado com características genéticas de ambos hospedeiros e do próprio parasito.

Como relatado por outros autores (Neal and Miles, 1977), o número de parasitos necessários para infectar os insetos é relativamente alto, o que explicaria os resultados aqui observados, uma vez que foi baixa a parasitemia ou mesmo ausente em alguns dos camundongos avaliados com as metodologias aqui empregadas (EF e HC negativos). No grupo da mistura de populações a infecção foi maior que nos grupos com infecções monoclonais (XNHI- TcI e XNHI-TcII), revelando um favorecimento na capacidade de transmissão de um hospedeiro para outro, o que poderia explicar as altas taxas de infecções mistas encontradas na áreas endêmicas (Bosseno *et al.*, 1996), demonstrando assim que a esta interação pareceu ser um fator favorável para continuidade do ciclo biológico do *T. cruzi* nas condições aqui trabalhadas.

Nesse sentido é importante destacar que o grupo XNHI TcI+TcII (infecção mista) apresentou perfis biológicos (%INF e %DIF) semelhantes ao grupo XAHI TcI+TcII e o NFI foi significativamente maior infectado com epimastigotas, revelando que a infecção mista realmente favoreceu a transmissão do parasito nas passagens entre os hospedeiros, sugerindo efeito sinérgico na associação de DTU distintas à semelhança do observado por

Pinto *et al.* (1998). Este evento reforça a nossa hipótese que a infecção mista favorece a transmissão entre os hospedeiros uma vez que o NFI aumentou nesse grupo e que essa variável sugere a habilidade do parasito desenvolver no triatomíneo e refletindo na capacidade de poder infectar outros hospedeiros.

A análise global dos resultados apresentados por diferentes estudos comprovam que em infecções mistas, há uma interação entre as diferentes populações do parasito, o que determina um comportamento biológico que não seria, necessariamente, característico do observado em infecções com apenas uma população de parasitos. Os resultados aqui apresentados também confirmam estas observações, revelando haver uma interação entre as populações de *T. cruzi* em infecções mistas. Nesse caso, especificamente, foram observadas alterações significativas na sua capacidade de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e vertebrado, que implicariam mudanças na capacidade de transmissão do parasito entre os seus diferentes hospedeiros.

No intuito de investigar melhor essa questão, após a infecção e alternância de populações nos hospedeiros invertebrado e vertebrado foi feito o isolamento e a caracterização molecular dos parasitos recuperados dos triatomíneos por xenodiagnóstico ou por hemocultura dos camundongos.

A partir dos resultados obtidos em alguns trabalhos com a caracterização molecular dos isolados do *T. cruzi*, foi verificado, em geral, que a passagem de apenas um clone ou cepa de um hospedeiro para outro não alterou o seu padrão genético original, como já foi observado por outros autores, possibilitando a utilização dessas metodologias na identificação dos re-isolados obtidos de infecções mistas (Lana, 1981; Garcia *et al.* 1984; Bahia, 1985). Contudo, a análise do perfil eletroforético da enzima GPI, nos isolados de infecções monoclonais da DTU TcII, revelou uma mudança no seu perfil, que passou a ser característico do observado na DTU TcI. A mudança no perfil da enzima GPI já foi relatada por outros pesquisadores ao analisar uma mesma população após sucessivas passagens em meio de cultura ou no hospedeiro vertebrado (Romanhã, 1982; Carneiro *et al.*, 1990; Veloso *et al.*, 2005; Veloso, 2007). Alves *et al.* (1993) avaliaram a estabilidade genética de clones da cepa Y de *T. cruzi* em distintos meios de cultura e observaram mudanças no perfil da enzima GPI, no sentido do zimodema ZA para o ZB e ZC. O perfil ZA foi observado entre os parasitos mantidos no meio com a presença de sangue, enquanto o ZB e o ZC foram mantidos em meios pobres em nutrientes, soro fetal bovino (10% v/v) e soro fetal bovino (5% v/v), respectivamente. Desse modo, a mudança encontrada no

presente trabalho pode ser reflexo das mudanças de ambientes pelos quais os parasitos passaram. Verificamos ainda que a mudança de perfil genético revelada pela GPI não foi acompanhada pelos outros sistemas e marcadores moleculares utilizados (enzimas: G6PD e IDH, rDNA e RAPD). Nossos dados confirmam ainda o observado por Lana e Toledo (2004) que verificaram mudanças de perfil genético de clones em camundongos infectados com os clones *T. cruzi* aqui estudados, além de outros, após tratamento com benzonidazol, em todas as direções (TcI para TcII, TcII para TcI, TcV para TcI e TcI para TcIV). Resultados como estes demonstram que clones de *T. cruzi* não apresentaram a estabilidade genética esperada (Tibayrenc e Ayala, 1988) e sim grande plasticidade genética que no caso de Lana e Toledo (2004) poderiam ser resultantes da pressão da droga e do sistema imune do hospedeiro vertebrado.

A caracterização dos isolados provenientes do hospedeiro invertebrado (XAHI) por meio de RAPD e rDNA indica a presença das duas populações do parasito em todas as amostras coletadas de insetos submetidos à infecção mista. Por meio da caracterização isoenzimática, em 50% destas mesmas amostras foi observado perfil de infecções mistas pela enzima GPI, e nos outros sistemas enzimáticos apenas perfis de TcI. Pela enzima IDH, todos os perfis foram característicos de TcI, ao contrario da G6PD que revelou perfis característicos de TcII. Esses resultados mostram que as amostras isoladas desse hospedeiro constituíram mistura das duas populações e que a sensibilidade para demonstrar essas populações variou entre os diferentes sistemas enzimáticos. Além disso, ficou evidente pela análise do rDNA que o padrão de TcII foi mais predominante (bandas mais fortes), o que sugere que este grupo de *T. cruzi* estava mais presente na amostra, embora esses dados não foram confirmados quantitativamente pelas metodologias empregadas neste estudo.

A análise isoenzimática foi a que teve menor sensibilidade na detecção das duas populações de *T. cruzi*, à semelhança do já observado em estudos que avaliaram amostras re-isoladas de cães submetidos à reinfecção com cepas de diferentes zimodemas (Machado *et al.*, 2001) ao contrário das demais técnicas aqui empregadas na caracterização molecular que revelaram a presença das duas populações de *T. cruzi* estudadas em uma mesma amostra.

Considerando a análise comparativa dos dados moleculares e biológicos encontrados na primeira passagem do *T. cruzi* no invertebrado (XAHI), foi possível notar que embora a caracterização molecular tenha mostrado a mistura de clones (TcI + TcII) em

todas as amostras avaliadas, o perfil biológico relacionado à %INF e NFI foi semelhante ao do grupo infectado com TcII, o que sugere predomínio dessa população no hospedeiro invertebrado. Como não foram empregadas técnicas moleculares quantitativas nesse estudo não se pôde comprovar tal observação. No entanto, essa mesma tendência foi observada por Pinto *et al.* (1998) que verificaram a presença predominante de TcII em relação a TcI, paradoxalmente mais virulentos e infectantes nas infecções monoclonais.

Bosseno *et al.* (1996) ao avaliarem a ocorrência natural de infecções mistas pelo *T. cruzi* em *T. infestans* na Bolívia verificaram uma alta presença 74.2% e 63.4% dos genótipos 20 e 39, respectivamente e pela primeira vez um elevado índice (43.2%) de infecção mista constituídas por esses mesmos dois genótipos (DTU TcII + TcV), sugerindo ausência de seleção natural destas DTU de *T. cruzi* neste hospedeiro. Pinto *et al.* (1998) e (2000) detectaram após estudos experimentais, a presença de misturas de populações após a passagem no hospedeiro invertebrado em 87% dos isolados, sugerindo que o *T. infestans* não seria considerado um filtro biológico importante nas condições trabalhadas. Entretanto, Aguiar (2002), estudando o comportamento de quatro clones do *T. cruzi* em espécies vetoras de diferentes tribos *Triatomini* e *Rhoniini*, pode observar uma seleção positiva para o clone CL Brener no *T. infestans*, nas infecções mistas. Uma das explicações para uma melhor adaptação de algumas populações *T. cruzi* aos insetos vetores é a variação deste microambiente entre as diferentes espécies e/ou populações de triatomíneos (Garcia e Azambuja, 1991; Kollien e Schaub, 2000; Garcia *et al.*, 2010). Para algumas cepas e/ou clones isso poderia representar um ambiente hostil decorrente de variações nas atividades de enzimas envolvidas na digestão sanguínea, que poderiam favorecer o predomínio de um determinado grupo de *T. cruzi*.

Em relação à caracterização molecular dos isolados originados do hospedeiro vertebrado, encontramos uma grande heterogeneidade de resultados entre as técnicas executadas. Considerando à análise de duas técnicas (rDNA e RAPD), obtivemos um percentual de 60% das amostras com perfil de DTU TcI, 20% para DTU TcII e 20% com perfil infecção mista (TcI+TcII), mas quando avaliamos em conjunto as três metodologias empregadas, observamos apenas os perfis TcI e TcI+TcII (infecção mista) em 60% e 40%, dos camundongos respectivamente. Como foi discutido anteriormente, no material utilizado como inóculo para o hospedeiro vertebrado, havia aparentemente um predomínio de TcII sobre TcI, mas quando estas populações foram adquiridas pelo hospedeiro vertebrado mediante o inóculo artificial pela via IP a constatação foi inversa e os

marcadores moleculares demonstraram que TcI foi predominante nesse novo hospedeiro, sugerindo a redução do TcII. Deane *et al.* (1984) demonstraram seleção de cepas pelo camundongo após uma infecção inicialmente dupla em camundongos, estabelecida por inóculo simultâneo e equivalentes de formas sanguíneas das cepas Y e F de *T. cruzi*. O predomínio de cepa Y foi observado quando realizou repiques semanais a cepa F foi predominante apenas quando foram realizados repiques mensais.

Como já demonstrado em outros estudos, a DTU TcI tem maior capacidade que DTU TcII de desenvolver infecção aguda no hospedeiro vertebrado (Andrade, 1976; Lana *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2006) vertebrados o que pode explicar em parte este resultado. Outras hipóteses podem ser levantadas para compreender o predomínio da população de TcI no hospedeiro vertebrado, dentre elas a relação parasito-hospedeiro vertebrado, um assunto amplamente discutido tanto em relação ao homem quanto em modelos experimentais. Neste contexto, a morfologia dos *T. cruzi* no sangue periférico também apresenta importante influência no desenvolvimento do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado bem como no seu tropismo celular e nas manifestações clínico-patológicas (Chiari e Brener 1963; Brener; 1965; Andrade, 1974). A DTU TcI, equivalente ao Tipo III ou Biodema III, é considerada um grupo que apresenta formas largas e musculatura esquelética e a DTU TcII, equivalente ao Biodema II, apresenta predomínio de formas delgadas no início da infecção, mas com predomínio de formas largas mais tardiamente e macrofagotrópica (Andrade, 1974). Além disto, trabalhos de Krettli e Brener (1976) e (1982) demonstraram que a cepas com predomínio de formas largas, mais resistentes ao mecanismo de lise mediada por complemento (importante mecanismo da resposta imune humoral atuante no controle da parasitemia) permanecem no sangue do hospedeiro vertebrado ao longo fase crônica, ao contrário do observado com a cepa Y que apresenta predomínio de formas delgadas, sendo assim facilmente destruídas por este fenômeno.

Nesse sentido, como os parasitos foram isolados pela técnica de hemocultura, isto pode sugerir que o TcI é mais predominante no sangue periférico devido ao seu tropismo celular e predomínio de formas largas. Contudo essa hipótese não pode ser comprovada, pois não foi possível estudar as características morfológicas dos clones de *T. cruzi* estudados em função da baixa parasitemia encontrada nos camundongos.

Já foi também comprovado experimentalmente que clones pertencentes ao DTU TcI apresentam maior infectividade para células *Vero*, maior infectividade e virulência

para camundongos do que populações pertencentes à DTU TcII (Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998; Lana *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2002). Esses fatos nos sugerem que a população de TcI é mais virulenta para o hospedeiro vertebrado que a população de TcII, o que foi comprovado quando isolamos um maior número de isolados de camundongos com perfil de TcI. Por outro lado, em humanos de alguns países do Cone Sul da América, ocorre geralmente o inverso, ou seja, predomínio de cepas TcII, TcV e TcVI, embora TcI seja também encontrado no ambiente silvestre infectando barbeiros, inclusive no ambiente domiciliar (Brenière *et al.*, 1995; Bosseno *et al.*, 1996; Brenière *et al.*, 1998; Brenière *et al.*, 2002; Bastrenta *et al.*, 2003). Essa situação, entretanto, parece variar dependendo da região geográfica já que Coronado *et al.* (2006) descreveram no Chile, maior prevalência da DTU TcI em humanos e de TcV em *T. infestans*.

Bosseno *et al.* (1996) ao observar a proporção dos genótipos 20 e 39 e de infecções mistas nos vetores originados de várias áreas da Bolívia demonstraram uma ausência de seleção natural no ciclo do *T. cruzi*. Entretanto, Brenière *et al.* (1998) ao analisar jovens também da Bolívia, observaram um predomínio do genótipo 39 em humanos e que a seleção clonal pode ocorrer em função da pressão da resposta imune contra a infecção. Alguns estudos demonstram que cepas isoladas de pacientes na fase aguda da DCh apresentam uma composição genética mais complexa do que das obtidas na fase crônica (Macedo *et al.*, 2004). Steindel *et al.* (2008) caracterizaram amostras da região Sul do Brasil, onde aconteceu o surto de DCh por transmissão oral vinculado ao consumo de caldo de cana de açúcar e, observaram a presença de infecções mistas nos vetores e reservatórios que as cepas isoladas de humanos foram classificadas como DTU TcII. Isso demonstra que os dois grupos de *T. cruzi* circulam entre os reservatórios animais e vetores e que aparentemente há seleção da DTU TcII que predomina em humanos após a ingestão de triatomíneos com infecções mistas (TcI+TcII). Os animais sinantrópicos como cães, gatos e roedores podem apresentar papel importante na manutenção de populações de *T. cruzi* entre os dois ciclos de transmissão por frequentarem ambos. Cada animal pode apresentar diferente suscetibilidade às diferentes DTU. Em estudos experimentais com de Sanches *et al.*, (1990); Laurent *et al.* (1997); Toledo *et al.* (2002) demonstraram que camundongos infectados com TcI apresentam alta infectividade e parasitemia em comparação aos infectados com TcII. Esta realidade poderia também estar explicando a maior predominância de TcI nos camundongos (roedores) aqui utilizados.

A caracterização das amostras dos parasitos que voltaram para o hospedeiro invertebrado demonstrou que todos os isolados apresentaram o perfil de TcI por todas as técnicas utilizadas. Esses resultados revelaram que após as passagens alternadas entre os hospedeiros invertebrados e vertebrados, pode ter ocorrido modulação das infecções mistas por estes hospedeiros, funcionando como filtro biológico, favorecendo a população de TcI que apresenta características morfológicas (predomínio de tripomastigotas sanguíneos largos na fase aguda) e biológicas (maior infectividade e capacidade de multiplicação nos hospedeiros invertebrado e vertebrado) mais favoráveis. Contudo, a observação da seleção de uma população do *T. cruzi* em infecções mistas não indica necessariamente a extinção da outra, e que uma população que não detectada em certo momento pelas metodologias e marcadores utilizados pode estar presente em baixos níveis e poderá vir a ser evidenciada quando as condições do meio forem favoráveis (Machado *et al.*, 2001; Veloso *et al.*, 2005; Moreira, 2009).

Desse modo, ao longo das passagens entre os diferentes hospedeiros, a multiclonalidade dos clones foi diminuindo, confirmando a hipótese levantada por Macedo e Pena (1998), uma vez que só foram encontradas misturas após a segunda passagem dos parasitos pelo hospedeiro invertebrado e predomínio da população de TcI no hospedeiro vertebrado. A competição dentro de um hospedeiro tem sido considerada um importante mecanismo evolutivo entre outras espécies de parasitos (Roode *et al.*, 2005). Quando diferentes clones compartilham os mesmos recursos ou a resposta imune de um mesmo hospedeiro, a dinâmica populacional fica afetada (Read e Taylor, 2001). A co-infecção, em um mesmo hospedeiro, com diferentes cepas ou clones de parasitos, pode provocar uma competição por recursos que afetariam o seu desenvolvimento, a multiplicação, bem como a sua sobrevivência e, do mesmo modo, o sucesso de transmissão entre os hospedeiros (Read e Taylor, 2001). Considerando infecções mistas, a seleção natural tem sido descrita por favorecer organismos mais virulentos em alguns modelos experimentais por outros organismos infecciosos (Read e Taylor, 2001; Roode *et al.*, 2004; 2005; Gower e Webster, 2005). No presente estudo, observamos um predomínio ao longo das passagens entre os hospedeiros invertebrado-vertebrado-invertebrado, da DTU I, mais virulenta.

Na DCh são descritos dois ciclos de transmissão, o silvestre e doméstico nos quais a presença ou predominância das diferentes DTU de *T. cruzi* podem variar, dependendo da região geográfica considerada. A DTU TcI é frequentemente encontrado no ciclo silvestre (Zingales *et al.*, 1998), salvo os casos humanos que também se encontram na região da

América Central e amazônica albergando TcI. Nesta última região configura-se um ciclo específico, pois não há a colonização de vetores nos domicílios e que entram em contato com os seres humanos são geralmente insetos silvestres que foram atraídos pelas luzes das residências que em geral não possuem paredes protetoras como no centro e sudeste e nos países do Cone Sul (Miles *et al.* 1983; Coura *et al.*, 1994; Coura *et al.*, 2002). Já a DTU TcII é predominante no ciclo doméstico de transmissão nos países do Cone Sul da América Latina e acredita-se que essa DTU de *T. cruzi* está associada a espécies do gênero *Triatoma*, habitats de ambiente terrestre associados com rochas e ninhos de mamíferos (Gaunt e Miles, 2000).

No presente trabalho foi realizada uma simulação experimental de alternância de hospedeiros que ocorre no ciclo de transmissão natural do *T. cruzi*, avaliando infecções mistas por clones de dois grupos genéticos distintos desse parasito (DTU TcI e TcII). Em síntese, foi observado que no vetor com infecção mista, o grupo de TcII foi mais favorecido, tonando-se mais adaptado ao inseto na presença de TcI considerando o comportamento biológico e a amplificação de bandas mais fortes de TcII na PCR do gene 24Sα. Além disso, a infecção mista pareceu favorecer a transmissibilidade desses clones entre os hospedeiros, já que as taxas de infecção (NFI e %INF) no hospedeiro vertebrado foram maiores quando empregado inóculo proveniente das infecções mistas, comparado às monoclonais. Contudo, durante as passagens do hospedeiro vertebrado e novamente invertebrado, a infecção por TcII não foi capaz de completar o ciclo e somente TcI foi detectado, sugerindo que esta população é mais adaptada ao hospedeiro vertebrado que aquela ou mais fácil de ser adquirida e possivelmente mais transmitida pelo vetor.

Desse modo, durante as passagens de infecções mistas por clones de *T. cruzi* entre os hospedeiros invertebrado-vertebrado-invertebrado podem ocorrer modificações na dinâmica populacional da mistura original, decorrentes tanto da interação entre esses clones na mistura como do papel do hospedeiro que pode funcionar como “filtro biológico” favorecendo a população mais adaptada. Estes fatos devem ser considerados ao analisar fatores relacionados à epidemiologia DCh tais como distribuição geográfica de parasitos de DTU distintas e sua transmissão entre os diferentes hospedeiros ao longo de seu ciclo biológico natural.

7.0 – CONCLUSÕES

- A infecção mista de ninfas de *T. infestans* submetidas ao xenodiagnóstico artificial (XAHl) com clones de *T. cruzi* das DTU TcI+TcII revelou um comportamento biológico (NFI e %INF) semelhante ao observado nos insetos expostos à infecção monoclonal com a DTU TcII, e significativamente diferente em relação ao grupo de insetos infectados com DTU TcI.
- A caracterização dos re-isolados de *T. cruzi* provenientes das ninfas de *T. infestans* anteriores pelos marcadores moleculares (rDNA e RAPD) revelou a presença das duas populações do parasito (TcI+TcII) em todas as amostras, sendo o mesmo confirmado com o conjunto de sistemas enzimáticos utilizados (GPI+IDH+G6PD), revelando assim a presença e o sucesso da infecção mista nesta primeira passagem dos parasitos pelo vetor.
- A infecção camundongos inoculados com tripomastigotas metacíclicos (IAHV) originados de ninfas de *T. infestans* submetidas ao xenodiagnóstico artificial (XAHl) com clones de *T. cruzi* das DTU TcI+TcII apresentou %INF significativamente maior em relação ao grupo de camundongos infectados com DTU TcII e semelhante à encontrada na monoinfecção com a DTU TcI, mais virulenta para camundongos, indicando que a mistura de parasitos de grupos genéticos distintos apresentou melhor desenvolvimento neste hospedeiro vertebrado e em relação ao observado anteriormente no invertebrado (XAHl).
- A caracterização dos re-isolados de *T. cruzi* provenientes dos camundongos anteriores pelos marcadores moleculares (Isoenzimas, rDNA e RAPD) revelou em 60% (3/5) das amostras a presença da DTU TcI, 0% de TcII e 40% (2/5) com infecção mista (TcI+TcII), indicando assim o desaparecimento ou baixa presença da DTU TcII neste hospedeiro que pode ter ocorrido pela sua menor capacidade de infectar e/ou desenvolver no vertebrado, ou a sua eliminação pelo sistema imune, ou efeito inibitório de

uma população sobre a outra, ou competição entre as diferentes populações de *T. cruzi* presentes.

- As infecções das ninfas de *T. infestans* submetidas ao xenodiagnóstico natural (XNHI) nos camundongos infectados com infecção mista (TcI+TcII) apresentaram comportamento biológico (NFI, %INF e %DIF) com valores significativamente maiores do que os grupos que se alimentaram nos camundongos com infecção monoclonal (TcI ou TcII).
- A caracterização dos re-isolados de *T. cruzi* provenientes das ninfas de *T. infestans* que alimentaram em camundongos infectados com infecção mista (TcI+TcII) pelos marcadores moleculares (Isoenzimas, rDNA e RAPD) revelou ausência da DTU TcII e presença apenas da DTU TcI, indicando, dentre outros fatores, uma possível filtragem biológica da TcII e o maior sucesso da TcI neste hospedeiro.
- Em conjunto os resultados sugerem que as passagens dos parasitos pelos hospedeiros distintos representariam “filtros biológicos” selecionando populações do *T. cruzi* o que pode provocar profundas consequências na sua transmissão natural com diversas repercussões na epidemiologia da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOLIS NG., MARQUES DE ARAÚJO S., TOLEDO M., FERNANDEZ M.A., GOMES M.L. (2011). *Trypanosoma cruzi* I-III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. *Acta Trop.* **120**(3):167-72.
- AGUIAR R.S. (2002). Comportamento intra-vetorial de populações de *T. cruzi* analisado através de polimorfismos de sequências repetitivas. Dissertação mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte. 97pp.
- ALVARENGA N.J. e BROFEN E. (1997). Metaciclo gênese do *Trypanosoma cruzi* como parâmetro de interação do parasita com o triatomíneo vetor. *Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.* **30**(3):247-250.
- ALMEIDA S.P., MILES M.A., MARSDEN P.D. (1973). Proof of the developmental stages of *Rhodnius neglectus* by susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Bras Biol.* **33**(1):43-52.
- ALVES A.M., TANURI A., DE ALMEIDA D.F., VON KRUGER W.M. (1993) Reversible change in the isoenzyme electrophoretic mobility pattern and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* **77**(2): 246-253.
- AMARAL C.F.S., TAFURI W.L., BRENER Z. (1975). Frequência do parasitismo encefálico em camundongos inoculados experimentalmente com diferentes cepas do *T. cruzi*. *Rev.Soc Bras Med Trop* **9**: 243-246.
- ANDRADE S.G. e ANDRADE Z. A. (1966). Estudo histopatológico comparativo das lesões produzidas por duas cepas do *Trypanosoma cruzi*. Hospital 1268-1278.
- 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**: 163-72.
- ANDRADE S.G. e MAGALHÃES J. B. (1997). Biodemes and zimodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* 27-35.
- ANDRADE S.G. (1985). Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* 39-46.
- ANDRADE L.O., MACHADO C.R.S., CHIARI E., PENA, S.D.J., 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. (1974). Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev.Pat.Trop.* 65-121

- AÑEZ N., CRISANTE G., DA SILVA F.M., ROJAS A., CARRASCO H., UMEZAWA, E.S., STOLF A.M., RAMIREZ J.L. e TEIXEIRA M.M. (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.
- ARAÚJO C.A.C., CABELLO P. H., JANSEN A.M. (2007). Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: In vitro and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. *Acta Tropica*.**101**, 225–231.
- ÁVILA, H. A., SIDMAN D. S., COHEN L. M., MILLIKAN R. C., SIMPSON L. (1991). Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **48**, 211-222.
- AZAMBUJA P., FEDER D. AND GARCIA E.S. (2004). Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: Impact on the establishment of the parasite, *Trypanosoma cruzi*, in the vector. *Exp Parasitol.* **107**: 89–96.
- AZAMBUJA P., RATCLIFFE N.A., GARCIA E.S. (2005). Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *An Acad Bras Cienc.* **77** (3), 397-404.
- BAHIA M.T. (1985) Comportamento de biológico de cepas do *Trypanosoma cruzi* no invertebrado. Dissertação mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.100pp.
- BAHIA M. T., TAFURI W. L., CALIARI M. V., VELOSO V. M., CARNEIRO C. M., COELHO G. L., LANA, M. (2002). Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. *Rev. Soc. Bras.Med. Trop.*, **35**, 339-345.
- BASTRENTA B., MITA N, BUITRAGO R., VARGAS F., FLORES M., MACHANE M., YACSIK N., TORREZ M., LE PONT F., BRENIÈRE F. (2003). Human mixed infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **98**(2):255-64.
- BARRETTO M.P. (1979). Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Z.Brener e Z.A.Andrade (Orgs.).Rio de Janeiro, Guanabara Koogan Ed.
- BEN-ABDERRAZAK S., GUERRINI F., MATHIEU-DAUDE F., TRUC P., NEUBAUER K., LEWICKA K., BARNABE C. e TIBAYRENC M. (1993). Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. *Methods Mol.Biol.* **21**, 361-382.

- BOSSENO M.F., TELLERIA J., VARGAS F., YAKSIC N., NOIREAU F., MORIN A. e BRENIERE S.F. (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., YAKSIC N., VARGAS F. e BRENIERE S.F. (2000) Selection of *T. cruzi* clonal genotypes (clonet 20 and 39) isolated from Bolivian triatomines following subculture in liquid medium. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **95**, 601-607.
- BRACK C. (1968) Elektronmikroskopische Untersuchungen zum lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. Unter besonderes Berücksichtigung der Entwicklungsformen im Übertrager *Rhodnius prolixus*. *Acta Trop.* **25**: 289-356.
- BRENER Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **4**, 389-396.
- BRENER Z. e CHIARI E. (1963). Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **19**, 220-224.
- BRENER Z. (1965). Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol.* **59**:19-26.
- BRENER Z. (1969). The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann Trop Med Parasitol.* **63**(2):215-20.
- BRENER Z. COSTA C.A.G. e CHIARI C.A. (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev. Inst. Trop. São Paulo.* **18**(6):450-455.
- BRENER Z. (1972). A new aspect of *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate host. *J. Protozool.* **19**, 23-27.
- BRENER Z. e CHIARI E. (1971). The effects of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **65**(5), 629-636.
- BRENER Z. (1977). Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presentig distinct characteristics. PAHO, *Scientific Publication* **347**, 11-21.
- BRENER Z. (1979). O parasito: relações hospedeiro-parasito. In: In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Z. Brener e Z.A. Andrade (Orgs.). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan Ed., pp 1-41.
- BRENER Z., COSTA C.A. e CHIARI C. (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **18**, 450-455.

- BRENER Z. (1992). *Trypanosoma cruzi*: Taxonomy, morphology and life cycle. In: Wendel S., Brener Z., Camargo M. e Rassi A. Chagas disease: its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo, ISTB Brazil - SBHH, 31-48.
- BRENER Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.* **27**: 347-382.
- BRENIÈRE S.F., BOSSENO M.F., TELLERIA J., CARRASCO R., VARGAS F., YAKSIC N., NOIREAU F. (1995). Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**: 179-184.
- BRENIÈRE S.F., BOSSENO M.F., TELLERIA J., BASTRENTA B., YACSIK N., NOIREAU F., ALCAZAR J.L., BARNABE C., WINCKER P. e TIBAYRENC, M. (1998). Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. *Exp. Parasitol.* **89**, 285-295.
- BRENIÈRE S.F., BOSSENO M.F., NOIREAU F., YACSIK N., LIEGEARD P., AZNAR C., HONTEBEYRIE M. (2002). Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **97**(3):289-95.
- BRIONES R.S.M., 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 had implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Biochem. Pathog.* **104**, 219-232.
- BRISSE S., BARNABÉ C., TIBAYRENC M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* **30**(1):35-44.
- 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.* Sep;31(11):1218-26.
- BRISSE S., HENRIKSSON J., BARNABÉ C., DOUZERY E.J., BERKVENS D., SERRANO M., ET AL. (2003). Evidence of genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Genet. Evol.* **2**, 173-183.
- BRONFEN E., DIAS J.C.P, GOUVEIA S.C. (1984). Infecção experimental do *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* (Silva e Nussenzweig, 1953). *Rev Pat Trop* **13**: 1-7.
- BRONFEN E., DE ASSIS ROCHA F.S., MACHADO G.B. PERILLO M.M. ROMANHA A.J. CHIARI E. (1989) Isolation of *Trypanosoma cruzi* samples by xenodiagnosis and hemoculture from patients with chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **84**(4):237-40.
- BRUMPT E. (1912). Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhisus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex boueti* e *Ornithodoros moubata*. *Bull.Soc.Path.Exót.* 360-367.

- BRUJIN M.H.J. (1988) Diagnostic DNA amplification no respite for the elusive parasite. *Parasitol. Today*. **4**, 293-295.
- BURGOS J.M., DIEZ M., VIGLIANO C., BISIO M., RISSO M., DUFFY T., CURA C., BRUSSES B, FAVALORO L, LEGUIZAMON M.S., LUCERO R.H., LAGUENS R., LEVIN M.J., FAVALORO R., SCHIJMAN A.G. (2008) 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):485-95.
- BUSCAGLIA C.A. e DI NOIA, J.M. (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes.Infect.* **5**, 419-427.
- CAMARGO E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. i. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev.Inst.Med.trop.São Paulo* **12**, 93-100.
- CAMPBELL D. A., WESTENBERGER S. J., STURM, N. R. (2004) The Determinants of Chagas Disease: Connecting Parasite and Host Genetics. *Current Molecular Medicine* **4**(6): 549-562.
- CASTRO D.P., MORAES C.S., GARCIA E.S., AZAMBUJA P. (2007) Inhibitory effects of d-mannose on trypanosomatid lysis induced by *Serratia marcescens*. *Exp Parasitol* **115**: 200-204.
- 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.
- CARLIER Y. e TRUYENR C. (2010). Maternal Fetal Transmission of *Trypanosoma cruzi* In: Telleria J., e Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier, London. 239-282pp.
- CARNEIRO M., CHIARI E., GONCALVES A.M., DA SILVA PEREIRA A.A., MOREL C.M. e ROMANHA A.J. (1990). Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop.* **47**: 35-45.
- CARNEIRO M., ROMANHA A.J. e CHIARI E. (1991). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **86**: 387-393.
- CARVALHO-MOREIRA C.J., SPATA M.C., COURA J.R., GARCIA E.S., AZAMBUJA P., GONZALEZ M.S, MELLO C.B. (2003). In vivo and in vitro metacyclogenesis tests of two strains of *Trypanosoma cruzi* in the triatomine vectors *Triatoma pseudomaculata* and *Rhodnius neglectus*: short/long-term and comparative study. *Exp Parasitol.* **103**(3-4):102-11.
- CAVALHEIRO J.R. e COLLARES E.F. (1965). Estudos sobre o comportamento, em camundongos, de uma amostra altamente virulenta de *T. cruzi* (amostra Y), após passagens em triatomíneos, ratos e culturas. *Rev Brasl Biol* **25**: 169-175.

- CDC. (2011). Ciclo Biológico *Trypanosoma cruzi*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>> Acesso 10 de novembro 2011.
- CHAGAS C. (1909). Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etilógico de nova entidade morbida do homem. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 159-218.
- CHAGAS C. (1916). Tripanosomíase Americana. Forma aguda da moléstia. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **1**: 159-218.
- CHAPMAN M.D., BAGGALEY 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.
- CHIARI E., TAFURI W.L., ALVARENGA N.J., SOARES S.J. (1973). Observações sobre o comportamento no hospedeiro vertebrado de diferentes culturas do *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **15**: 225-260.
- CORONADO X., ZULANTAY I., ROZAS M., APT W., SÁNCHEZ G., RODRÍGUEZ J., ORTIZ, S., SOLARI A. (2006). Dissimilar distribution of *Trypanosoma cruzi* clones in humans after chemotherapy with allopurinol and itraconazole. *J Antimicrob Chemother.* 2006 **58**(1):216-9.
- CONTRERAS V.T., ARAQUE W., DELGADO V.S. (1994). *Trypanosoma cruzi*: metacyclogenesis in vitro-. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **89**: 253-259.
- 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**(4):251-4.
- COURA J.R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **102** Suppl 1, 113-122.
- COURA J.R., JUNQUEIRA A.C., FERNANDES O., VALENTE S.A. e MILES M.A. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* **18**, 171-176.
- COURA J.R., e VIÑAS P.A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* **465**: S6-S7.
- D'ÁVILA D.A., GONTIJO E.D., LAGES-SILVA E., MEIRA W.S.F., CHIARI E., GALVÃO L.M.C. (2006). Random amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* isolates from chagasic patients with different clinical forms. *Parasitol Res* 98: 455-461.

- D'AVILA D.A., MACEDO A.M., VALADARES H.M., GONTIJO E.D., DE CASTRO A.M., MACHADO C.R., CHIARI E., GALVÃO L.M. (2009). Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J Clin Microbiol.* 6:1718-25.
- DEANE L. M. (1964) Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* *Rev. Bras. Mal Doen. Trop.* 16, 27-48 In : Valente, S.A.S.: Valente, V. C. e Neto H. F. (1999) Considerations on the epidemiology and Transmission Of Chagas disease in The Brazilian Amazon. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz* **94** (Suppl.1), 395-398
- DEANE M.P., LENZI H.L. e JANSEN A. (1984). *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **79**, 513-515.
- 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.
- DEL PUERTO R., NISHIZAWA J.E., LIHOSHI N., ROCA Y, AVILAS C., GIANELLA A., LORA J., VELARDE F.U., MIURA S., HIGO H., KOMIYA N. MAEMURA K.M., HIRAYAMA K. (2010) Lineage analysis of circulation *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 4(5): e687.
- DE SOUZA W., (2002). Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol. Res.* **88**, 1013-1025.
- DEVERA R., FERNADES O. e 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.
- DEVERA R., ILLARRAMENDI X., MONTOYA-ARAUJO R., PIRMEZ C., FERNANDES O. e COURA J.R. (2002). Biodemes of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from humans from three endemic areas in Minas Gerais State. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **35**, 323-330.
- DIAS NETO E., STEINDEL M., PASSOS L.K., DE SOUZA C.P., ROLLINSON D., KATZ N., ROMANHA AJ., PENA S.D., SIMPSON A.J. (1993) The use of RAPDs for the study of the genetic diversity of *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma cruzi*. *EXS.* **67**:339-45.
- DIAS E. (1934). Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **28**: 1-110.
- DIAS E. (1940). Transmissão do *Schizotrypanum cruzi* entre vertebrados por via digestiva. *Brasil Medico.* **54**, 775.
- DIAS J.C.P. (2000). Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad. Saude Publica* **16** (Suppl 2), 43-59.

- DIAS J.C.P. (1979). Mecanismos de transmissão. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas (Zigman Brener e Zilton Andrade). pp. 152 - 174. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro - RJ.
- DIAS J.C.P. (1993). Situación actual de la enfermedad de Chagas em las Américas. In: Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. R.J. Madoery, e M.L. Cámara (Orgs.). Buenos Aires, Congresso Nacional de Medicina.
- DIAS J.C.P. e NETO V. A. (2011). Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **44**, (Sup.2):68-72
- DIAS J.C., PRATA A. e CORREIA D. (2008). Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **41**, 193-196.
- DIAS J.C.P., SILVEIRA A.C. e SCHOFIELD C.J. (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**, 603-612.
- DI NOIA J.M., BUSCAGLIA C.A., DE MARCHI C.R., ALMEIDA I.C e FRASCH A.C. (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: 401-413.
- DOS SANTOS D.M. (2007). Influência da variabilidade genética (evolução clonal) do *Trypanosoma cruzi* na reativação da doença de Chagas após imunossupressão com ciclofosfamida. Dissertação de mestrado, UFOP, Ouro Preto. 101pp.
- DVORAK J.A. e HARTMAM D.L. (1980). *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *J. Protozool.* 27, 472-474.
- FERNANDES M.C., CORTEZ M., GERALDO YONEYAMA, K.A., STRAUS, A.H., YOSHIDA, N., MORTARA, R.A. (2007). Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and hostcell microdomains. *Int. J. Parasitol.* **37**, 1431-1441.
- FERNANDES O, MANGIA RH, LISBOA CV, PINHO AP, MOREL CM, ZINGALES B, CAMPBELL DA, JANSEN AM. (1999). The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology.* **118** (Pt 2),161-6.
- FILARDI L.S. e BRENER Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg.* **81**, 755-759.
- FRANCO D.J., VAGO A.R., CHIARI E., MEIRA F.C., GALVAO L.M. e MACHADO, C.R. (2003). *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp. Parasitol.* **104**, 54-61.

- FRANCISCON J.U. (1978). Manutenção cíclica do *Trypanosoma cruzi* em laboratório. Dissertação mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 71pp.
- FREITAS J.M., AUGUSTO-PINTO L., PIMENTA J.R., BASTOS-RODRIGUES L., GONÇALVES O., MACEDO A.M., MACHADO C.R. e PENA S.D. (2006). Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 226-235.
- GARCIA E.S., e AZAMBUJA P., (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today* **7**, 240-244.
- GARCIA E.S. e DVORAK J.A. (1982). Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. *Am J Trop Med Hyg.* **31**(2):259-62.
- GARCIA E.S., RATCLIFFE N.A., WHITTEN M.M., GONZALEZ M.S., AZAMBUJA P., (2007). Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi* *Rhodnius prolixus* interactions. *J. Insect Physiol.* **53**, 11-21.
- GARCIA E.S., GENTA F.A., AZAMBUJA P. e SCHAUB G.A. (2010). Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology.* **26**: 499–505.
- GAUNT M. e MILES M. (2000). The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **95**(4):557-65.
- GAUNT M,W., YEO M., FRAME I.A., STOTHARD 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**(6926):936-9.
- 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.
- GOLDBERG S.S. e PEREIRA A.A. (1983). Enzyme variation among clones of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool* **69**: 91-96.
- GOMES ML, MACEDO AM, VAGO AR, PENA SD, GALVAO LM, CHIARI E (1998). *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp. Parasitol.* **88**: 28-33.
- GONZALEZ M.S., NOGUEIRA N.F., MELLO C.B., DE SOUZA W., SCHAUB G.A., AZAMBUJA P., GARCIA E.S. (1999) Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol.* **2**(2):100-8.
- GOWER C.M., WEBSTER J.P. (2005). Intraspecific competition and the evolution of virulence in a parasitic trematode. *Evolution.* **59**(3):544-53.

- GUHL F. e AUFDERHEIDE A. (2010). Chagas Disease in Pre-Colombian Civilizations In: In: Telleria J., e Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier, London. 25-44pp.
- HERNÁNDEZ R., RIOS P., VALDÉS A.M. e PIÑERO D. (1990) Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* **41**(2):207-12.
- HERRERA H.M., LISBOA C.V., PINHO A.P., OLIFIERS N., BIANCHI R.C., ROCHA F.L, MOURÃO G.M., JANSEN A.M. (2008). The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102:1133-9.
- JANSEN A.M. e ROQUE A. L. R. (2010) Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. In: Telleria J., e Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier, London.
- KOLLIEN A.H. e SCHAUB G.A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol. Today* **16**, 381-387.
- KRETTLI A.U. e BRENER Z. (1976). Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol.* 116(3):755-60.
- KRETTLI A.U. e BRENER Z. (1982). Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* **129**, 2009-2012.
- LANA M. (1981). Caracterização do *Trypanosoma cruzi*, cepa Berenice, isolada da mesma paciente em diferentes períodos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte. 91pp.
- LANA M. e CHIARI C.A. (1986). Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice e Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi* isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **81**: 247-253.
- LANA M., CHIARI C.A., CHIARI E., MOREL C.M., GONÇALVES A.M., ROMANHA A.J. (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.
- LANA M., DA SILVEIRA P.A., BARNABE C., QUESNEY V., NOEL S. e TIBAYRENC M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.* **90**, 20-25.
- LANA M., DA SILVEIRA P.A., BASTRENTA B., BARNABÉ C., NOEL S. e TIBAYRENC M. (2000). *Trypanosoma cruzi*: infectivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice. *Exp. Parasitol.* **96**, 61-66.

- LANA M. e MACHADO, E.M.M. (2010). Biology of *Trypanosoma cruzi* and Biological Diversity. In: Telleria J., e Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier, London.
- LANA M. e TOLEDO M.J.O. (2004). Genetic instability in *Trypanosoma cruzi* stocks. In: VII International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infections Disease (MEEGID VII), Valência, p.124.
- LAURIA-PIRES L., BOGLIOLO A.R., TEIXEIRA A.R.L. (1996). Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients. II. Isozyme and RFLP characterizations. *Exp.Parasitol.* **82**, 182-190.
- LAURIA-PIRES L., SANTANA J.M., TAVARES F.S. e TEIXEIRA A.R.L. (1997) Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients: I - Behavioral characterization in vitro. *Rev.Soc. Bras. Med. Tropical.* **30**(2): 197-192.
- LISBOA C.V., PINHO A.P., MONTEIRO R.V., JANSEN A.M. (2007) *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. *Exp Parasitol.* **116**(2), 150-5.
- LISBOA C.V., PINHO A.P., HERRERA H.M., GERHARDT M., CUPOLILLO E, JANSEN A.M. (2008). *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Vet Parasitol.***156**, 314-8.
- LLEWELLYN M.S., MILES M.A., CARRASCO H.J., LEWIS M.D., YEO M., VARGAS J., TORRICO F., DIOSQUE P., VALENTE V., VALENTE S.A., GAUNT M.W., (2009). 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.
- LENT H e WYGODZINSKY P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat History.* **163**, 127 - 520.
- LENZI H., CASTELO-BRANCO M.T.L., PELAJO-MACHADO M., OLIVEIRA D.N., LIMA M.T., GATTASS C.R. (1998). *Trypanosoma cruzi*: compromise of reproductive system in acute murine infection. *Acta Trop* **71**, 117-129.
- LUZ Z.M.P. (1998). Hemoculturas em Indivíduos na Fase Crônica pelo *Trypanosoma cruzi*: Modificações na Metodologia Visando à Simplificação e Aumento da Sensibilidade da Técnica, Dissertação mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, 87 pp.
- MACEDO A.M. e PENA S.D.J. (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today* **14**, 119-123.

- MACEDO A.M., MARTINS M.S., CHIARI E. 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., OLIVEIRA R.P. e PENA, S.D. (2002). Chagas disease: role of genetic variation in pathogenesis. *Expert.Rev.Mol.Med.* **4**, 1-16.
- MACEDO A.M., PIMENTA J.R., AGUIAR R.S., MELO A.I., CHIARI E., ZINGALES B., PENA S.D. e OLIVEIRA R.P. (2001). Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **96**, 407-413.
- MACEDO A.M., MACHADO C.R., OLIVEIRA. R.P. e PENA S.D.J. (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. e SEGATTO M. (2010). Implications of *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Diversity in the Pathogenesis of Chagas Disease. In: Telleria J., e Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier, London., 489-522 pp.
- MACHADO E.M.M., FERNANDES A. J., MURTA S. M. F., VITOR R. W. A., CAMILO JUNIOR D. J. PINHEIRO S. W. LOPES E. R., ADAD S. J., ROMANHA A.J., DIAS J. C. P. (2001). A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **65**(6): 958-965.
- MACHADO E.M.M. (2006). Interação do *Trypanosoma cruzi* e do *Trypanosoma rangeli* com o inseto vetor: fatores que influenciam o estabelecimento do parasito e o seu desenvolvimento. Tese doutorado. Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz/ Centro de pesquisas René Rachou, Rio de Janeiro/Belo Horizonte. 133pp.
- MAGALHÃES J.B., PONTES A.L. e ANDRADE S.G. (1985). Comportamento das cepas Y e Peruana do *Trypanosoma cruzi* nos camunudongos, após passagem em diferentes meios. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz.* **80**(1): 41-50.
- MAGALHÃES J.B., ANDRADE S.G., SHERLOCK I. (1996). *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomines (biological and biochemical patterns). *Rev Inst Med Trop São Paulo.* **38**: 23-28.
- MANTILA J.C., ZAFRA G.A, MACEDO A.M e GONZÁLEZ C.I. (2010) Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Human Pathology.***41**(4):610-3.
- MARCILI A., LIMA L., VALENTE V.C., VALENTE S.A., BATISTA J.S., JUNQUEIRA, A.C., et al., (2009). Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect. Genet. Evol.* **9**: 1265-1274.

- MARCILI A., VALENTE, V.C., VALENTE S.A., JUNQUEIRA A.C., DA SILVA F.M., PINTO A.Y., 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**: 615-623.
- MARIN-NETO J.A., CUNHA-NETO E., MACIEL B.C. e SIMÕES M.V. (2007). Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. (2007). *Circulation.* **115**:1109-1123.
- MARKERT C.L., MØLLER F., (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci.* **45**(5):753-63.
- MARQUES DE ARAÚJO S. e CHIARI E. (1988). Caracterização biológica de clones das cepas Y, Cl e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **83**, 175-181
- MARTINS H.R. (2005). Impacto de infecções mistas por clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos grupos genéticos principais sobre propriedades biológicas do parasito em camundongos Balb/c. Dissertação de mestrado, UFOP, Ouro Preto. 87pp.
- MARTINS H.R. (2008). Tratamento com benzonidazol de infecções mistas por clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais. Tese de doutorado, UFOP, Ouro Preto. 176pp.
- MARTINS H.R., TOLEDO M.J., VELOSO V.M., CARNEIRO C.M., MACHADO-COELHO G.L., TAFURI W.L., BAHIA M.T., VALADARES H.M., MACEDO A.M. e LANA M. (2006). *Trypanosoma cruzi*: Impact of dual-clone infections on parasite biological properties in BALB/c mice. *Exp.Parasitol.* **112**, 237-246.
- MARTINS H.R., FIGUEIREDO L.M., VALAMIEL-SILVA J.C., CARNEIRO C.M., MACHADO-COELHO G.L., VITELLI-AVELAR D.M., BAHIA M.T., MARTINS-FILHO O.A., MACEDO A.M. e LANA M. (2008). Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *J.Antimicrob.Chemother.* **61**, 1319-1327.
- MIYAMOTO C.T., GOMES M.L., MARANGON A.V., ARAÚJO S.M., BAHIA M.T., LANA M., TOLEDO MJ. (2006). *Trypanosoma cruzi*: Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with diferent clonal genotypes. *Experimental Parasitol.* **112**: 198–201.
- MEJÍA-JARAMILLO A.M e TRIANA O. (2005). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* in blood and organs of infected mice determined by LSSP-PCR. *Biomedica.* **25**, 76-86.
- MEJÍA-JARAMILLO A.M., PEÑA V.H. e TRIANA-CHÁVEZ O. (2009). *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. *Exp. Parasitol.* **121**, 83-91.

- MELO R.C. e BRENER Z. (1978). Tissue tropismo of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.* **64**(3), 475-482.
- MELLO C.B., AZAMBUJA P., GARCIA E.S. e RATCLIFFE N.A. (1996). Differential in vitro and in vivo behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* **82**, 112-121.
- MILES M. A., APT B.W., WIDMER G., POVOA M.M., e SCHOFIELD C.J. (1984). Isoenzyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. *Trans. R. Soc. Trop.Med. Hyg.* **78** (4): 526-35.
- MILES M.A., FELICIANGELI M.D. e DE ARIAS A.R. (2003). American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* **326**, 1444-1448.
- MILES M.A. (1983) The epidemiology of South American trypanosomiasis-biochemical and immunological approaches and their relevance to control. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **77**(1):5-23.
- MILES M.A., CEDILLOS R.A., POVOA M.M., DE SOUZA A.A., PRATA A. e MACEDO V. (1981). Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? *Lancet.* **1**, 1338-1340.
- MILES M.A., LLEWELLYN M.S., LEWIS M.D., YEO M., BALEELA R., FITZPATRICK S., GAUNT M.W. e MAURICIO I.L. (2009) The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology.* **136**(12):1509-28.
- 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**(3):217-25.
- MILES M.A., SOUZA A., POVOA 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**(5656):819-21.
- MONCAYO A. (1999). Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz.* **94** (Sup. 1), 401-404.
- MONCAYO A. e SILVEIRA A. C. (2010). Current Trends and Future Prospects for Control of Chagas Disease. In: Telleria J., e Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier, London.
- MONCAYO A. e SILVEIRA A. C. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **104** (Sup. I), 17-30.

- MONTAMAT E.E., DE LUCA D'ORO G.M., GALLERANO R.H., SOSA R. e BLANCO A. (1996). Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: correlation with clinical picture. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **55**: 625-628.
- MONTILLA M.M., GUHL F., JARAMILLO C., NICHOLLS S., BARNABE C., BOSSENO M.F., BRENIERE S.F. (2002). Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 66(4), 394-400.
- MOREL C. e SIMPSON L. (1980)a. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **29**, 1070-1074.
- MOREL C., CHIARI E., CAMARGO E.P., MATTEI D.M., ROMANHA A.J. e SIMPSON L. (1980)b. 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**, 6810-6814.
- MOREL C.M., DEANE M.P., GONÇALVES A.M. (1986). The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol Today.* **2**: 97-100.
- MOREIRA L.F. (2009) Tropismo tecidual dos genótipos principais de *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c com infecções mistas, não tratados e tratados na fase aguda da infecção, avaliados pela técnica de LSSP-PCR. Dissertação de mestrado, UFOP, Ouro Preto. 131pp.
- NÓBREGA A.A., GARCIA M.H., TATTO E., OBARA M.T., COSTA E., SOBEL J. e ARAUJO WN. (2009). Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.*15(4):653-5.
- NEAL R.A. e MILES R.A. (1977). The sensitivity of culture methods to detect experimental infections of *Trypanosoma cruzi* and comparison with xenodiagnosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **19**: 170-176.
- OLIVEIRA R.P., BROUDE N.E., MACEDO A.M., CANTOR C.R., SMITH C.L. e PENA S.D. (1998). Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 3776-3780
- PEREIRA DA SILVA, L.H. (1959). Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, **1**: 99-118.

- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A. e MULLER, C.A. (1982). Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 1- Comparative xenodiagnosis with nine triatomine species of animal with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **77**(1): 37:53.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A. e MULLER C.A. (1987). Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 2 — Attempts to upgrade the efficiency and reliability of xenodiagnosis in chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **82**:259-72.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A., MULLER C.A., MOREIRA C.J.C. (1988) Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 3 - on the interaction of vector species and parasite strain in the reaction of bugs to infection by *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Saúde públ.* **22**(5):390-400.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A., MULLER C.A., MOREIRA C.J.C. (1990) studies in search of a suitable experimental insect model for Xenodiagnosis of hosts with chagas' disease 4—the reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species To chronic infection with different *Trypanosoma Cruzi* stocks*. *Rev.Saúde públ.* **24** (5):165-177.
- PINTO A.S., DE LANA M., BASTRENTA B., BARNABE C., QUESNEY V., NOEL S. e TIBAYRENC M. (1998). Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. *Parasitol. Res.* **84**, 348-353.
- PIESMAN, J. e SHERLOCK, IA., (1985). *Trypanosoma cruzi*: kinetics of metacyclogenesis in adult and nymphal *Panstrongylus megistus*. *Experimental Parasitology.* **59**: 231-238.
- PIZZI T. e PRAGER R.S. (1952). Estabilización de la virulencia de uma cepa de *Trypanosoma cruzi* por la pasaje seriada en ratones de constitución genética uniforme: analisis cuantitativo Del curso de la infección. *Biológica* **16/17**: 3-12.
- PHILLIPS N.R. (1960). Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi* considerations regarding the stardardization of materials. *Amer. Trop. Med.Parasit.* **54**: 60-70.
- PRATA A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect.Dis.* **1**, 92-100.
- RAMÍREZ J.D., GUHL F., RENDÓN L.M., ROSAS F., MARIN-NETO J.A., MORILLO C.A. (2010). Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis.*4(11):e899.
- RASSI A. J., RASSI A. e LITTLE W.C. (2000). Chagas's heart disease. *Clin Cardiol* **23**(12):883-889

- RASSI A., JUNIOR A. R., e RASSI G. G. (2000). Fase Aguda In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas (Brener, Z., Andrade, Z.A. e Barral-Netto, M orgs), pp. 75 -87, Rio de Janeiro: Editora Guanabra-koogan.
- RASSI A., REZENDE J.M., LUQUETTI A.O., e JUNIOR A. R. (2010). Clinical phases and forms of Chagas Disease. In: Telleria J., e Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier, London.
- RASSI A.J., RASSI A. e MARIN-NETO J. A., (2010) Chagas disease. *Lancet*. **375**: 1388–402
- RÊGO S. M., e GARNHAM P. C. C. (1956).The “Y” strain of *Trypanosoma cruzi*; leishmanial development in the spleen of mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. e Hyg.* **50**: 299-300.
- READ A. F. e TAYLOR L. H. (2001). The Ecology of Genetically Diverse Infections. *Science*. **292**: 1099-1102.
- READY P.D. e MILES M.A. (1980). Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **74(2)**:238-42.
- RIBEIRO A.L.P. e ROCHA M.O.C. (1998) Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev. Soc. Bras Med. Trop.* **31**: 301-314.
- ROODE, J.C., PANSINI, R., CHEESMAN, S., HELINSKI, M.E.H., HUIJBEN, S., WARGO, A.R., BELL, A.S., CHAN, B.H.K., WALLIKER, D., READ, A.F. (2005). Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 7624–7628.
- ROODE J.C., CULLETON R., CHEESMAN S.J., CARTER R., READ A.F. (2004). Host heterogeneity is a determinant of competitive exclusion or coexistence in genetically diverse malaria infections. *Proc Biol Sci.* **271**:1073-80.
- RODRIGUES C.M., VALADARES H.M.S., FRANCISCO A.F., ARANTES J.M., CAMPOS C.F., et al. (2010) Coinfection with Different *Trypanosoma cruzi* Strains Interferes with the Host Immune Response to Infection. *PLoS Negl Trop Dis* **4(10)**: 549-562
- ROMANHA A.J. (1982). Heterogeneidade Isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*, PhD Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 110 pp.
- ROMANHA A.J., DA SILVA PEREIRA A.A., CHIARI E. e KILGOUR V. (1979). Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp Biochem. Physiol B* **62**: 139-142.
- ROZAS M., BOTTO-MAHAN C., CORONADO X., ORTIZ S., CATTAN P.E., SOLARI A. (2007). Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**: 647-653.

- SANTOS D.M (2007). Influência da variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* na reativação da doença de Chagas experimental após imunossupressão com ciclofosfamida. Dissertação mestrado, UFOP, Ouro Preto. 86pp.
- SANTOS F.R., PENA S.D.J, EPPLEN J.T. (1993). Genetic e population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genetic*. **90**: 655-656.
- SCHAUB G.A. (1989)a. Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors? *Parasitology Today*. **5**:185-188.
- SCHAUB G.A. (1989)b. *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol*. **68**, 260-273.
- SCHAUB G.A. (2009). Interactions of Trypanosomatids and Triatomines In: Stephen J. Simpson and Jérôme Casas: Advances in Insect Physiology, Vol. 37, Burlington: Academic Press pp.177-242.
- SCHMUNIS G. A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **102** (Suppl. I). 75-85
- SCHMUNIS G. A. (1999). Prevention of Transfusional *Trypanosoma cruzi* Infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **94**, (Suppl.) I: 93-101
- SCHOFIELD C.J. e DIAS J.C. (1999). The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv.Parasitol*. **42**, 1-27.
- SCHOFIEL C.J. e GALVÃO C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica* 110, 88-100.
- SCHOFIELD C.J. (2000). Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cad Saúde Publica*. 2000;**16** (Sup2):89-92.
- SILVA L.H.P. e NUSSENZWEIG V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia Clin.Biol*. 191-203.
- SILVEIRA A.C. (2000) Profilaxia. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas (Brener, Z., Andrade, Z.A. e Barral-Netto, M orgs), pp. 75 -87, Rio de Janeiro: Editora Guanabra-koogan.
- SILVEIRA A.C. (2000) Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. *Cad. Saúde Pública*, **16**(Sup. 2):35-42
- SIMPSON A.J., DIAS NETO E., STEINDEL M., CABALLERO O.L., PASSOS L.K., PENA S.D. (1993) The use of RAPDs for the analysis of parasites *EXS*. **67**:331-7.
- SNEDECOR G. W. e COCHRANW.G. (1989). Statistical Methods. 8ªed., Iowa State, University Press. Ames, p. 503.

- SOLARI A., CAMPILLAY R., ORTIZ S. e WALLACE A. (2001). Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp.Parasitol.* **97**: 226-233.
- SOLARI A., WALLACE A., ORTIZ S., VENEGAS J. e SANCHEZ G. (1998). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean insect vectors. *Exp.Parasitol.* **89**: 312-322.
- SOUTO R.P. e ZINGALES B. (1993). Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62**, 45-52.
- SOUTO R.P., FERNANDES O., MACEDO A.M., CAMPBELL D.A. e ZINGALES B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**, 141-152.
- STEINDEL M., DIAS J.C.P., e ROMANHA A.J. (2005). Doença de Chagas: Mal que Ainda Preocupa. *Ciência Hoje.* **37**(217), 32-38.
- STEINDEL M., DIAS N.E., DE MENEZES C.L., ROMANHA A.J. e SIMPSON A.J. (1993). Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol.Biochem.Parasitol.* **60**, 71-79.
- STEVENS J.R. e GIBSON W.C. (1999). The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cad. Saúde Pública*, **15**(4):673-684.
- STURM N.R. e CAMPBELL D.A. (2009) Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.***115**(1-2):35-43.
- STURM N.R., DEGRAVE W., MOREL C. e 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.
- TAKANO-LEE M. e EDMAN J.D. (2002) Lack of manipulation of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) vector competence by *Trypanosoma cruzi*. *J Med Entomol.* **39**(1):44-51.
- TENOVER F.C. (1988). Diagnostic deoxyribonucleic probes for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 82-101.
- TEIXEIRA A. R.L., NASCIMENTO R. J., STURM R. (2006) Evolution and pathology in Chagas disease: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **101**(5): 463-491
- TIBAYRENC M. e AYALA F.J. (1988). Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution.* 277-292.

- TIBAYRENC M. e BRENIERE S.F. (1988). *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **83** (Sup 1):249-55.
- 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**(1):85-104.
- TIBAYRENC M., CARIOU M.L., SOLIGNAC M. (1981). Genetic interpretation of flagellate zymograms of the genera *Trypanosoma* and *Leishmania*. *C R Seances Acad Sci.* **292**(9):623-5.
- TIBAYRENC M., NEUBAUER K., BARNABE C., GUERRINI F., SKARECKY D. e AYALA F.J. (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**, 1335-1339.
- TIBAYRENC M., WARD P., MOYA A. e 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.
- TOLEDO M.J., DE L.M., CARNEIRO C.M., BAHIA M.T., MACHADO-COELHO G.L., VELOSO V.M., BARNABE C., TIBAYRENC M. e TAFURI W.L. (2002). Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp.Parasitol.* **100**, 161-172.
- TOLEDO M.J., BAHIA M.T., CARNEIRO C.M., MARTINS-FILHO O.A., TIBAYRENC M., BARNABE C., TAFURI W.L. e DE L.M. (2003). Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**, 223-230.
- 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**(2):458-76.
- TORRES J.P., ORTIZ S., SOLARI A. (2003). *Trypanosoma cruzi* isolate from Chile are heterogeneous e composed of mixed populations when characterization by Schizodeme e Southern analyses. *Parasitol.* **128**: 161-168.
- TOYÉ P. J. (1974). Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **68**, 147
- VALENTE S. A. S., VALENTE V.C. e NETO H. F. (1990). Considerations on the Epidemiology and Transmission of Chagas Disease in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **94**, (Supl. I): 395-398.

- VALLEJO G.A., GUHL F., SCHAUB G.A., (2009). Triatominae - *Trypanosoma cruzi*/T. rangeli: vector-parasite interactions. *Acta Trop.* **110**, 137-147.
- VELOSO V.M. (2007). Doença de Chagas experimental em cães da raça Beagle: avaliação, clínica, parasitológica, histopatológica e molecular. Tese de Doutorado, Belo Horizonte, UFMG, 124pp.
- VELOSO V.M., ROMANHA A.J., LANA M., MURTA S.M., CARNEIRO C.M., ALVES C.F., BORGES E.C., TAFURI W.L., MACHADO-COELHO G.L., CHIARI E. e BAHIA M.T. (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.
- VIANNA G. (1911). Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas". *Mem Inst Oswaldo Cruz* **3**: 276-294.
- WELSH J. e MCCLELLAND M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18(24):7213-8.
- WESTENBERGER S.J., BARNABÈ C., CAMPBELL D.A., STURM N.R., (2005). Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics.* **171**, 527-543.
- 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.* 25;**18**(22):6531-5.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1991). Control of Chagas disease. Report of a Expert Committee. *WHO Technical Report Series* **811**, p. 95.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1997). Andean countries initiative launched in Colômbia. *TDR News* 53.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2002). Report of the Expert Committee on the Control of Chagas disease. *Technical Report Series* 905, p.85.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010). Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010). *Weekly epidemiological record.* **34**, 334-346.
- ZAFRA G., MANTILLA J.C., VALADARES H.M., MACEDO A.M., GONZÁLEZ C.I. (2008). Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian chagasic patients. *Parasitol Res.***103**(3),731-4.
- ZELEDÓN R. (1997). Infection of the insect host by *Trypanosoma cruzi*. In: Atlas of Chagas' Disease Vectors. (Carcavalho, R Girón, I.G Jurberg, J.e Lent, H.,) Fiocruz. 1:271-287

- ZELEDON R. (1974). Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. In Ciba Foundation Symposium, Amsterdam, Elsevier, Excerpta Medieu 20: 5 1-77.
- 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). Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.**104**(7):1051-4.
- ZINGALES B., SOUTO R.P., MANGIA R.H., LISBOA C.V., CAMPBELL D.A., COURA J.R., JANSEN A. e FERNANDES O. (1998). Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int.J.Parasitol.* **28**, 105-112.
- ZINGALES B., STOLF B.S., SOUTO R.P., FERNANDES O., BRIONES 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.
- YEO M., ACOSTA N., LLEWELLYN M., SÁNCHEZ H., ADAMSON S., MILES GA., LÓPEZ E., GONZÁLEZ N., PATTERSON JS., GAUNT M.W., DE ARIAS A.R. e MILES M.A . (2005). Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* **35**(2):225-33.