

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

Caracterização biológica e molecular de amostras do
***Trypanosoma cruzi* isoladas de escolares e de suas mães residentes no**
Vale do Jequitinhonha, MG.

Autora: Jaquelline Carla Valamiel de Oliveira e Silva

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

Co-Orientadora: Dr^a. Helen Rodrigues Martins

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, 30 de abril de 2009.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.
Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente,
antes que a cortina se feche, e a peça termine
sem aplausos.”*

Charlie Chaplin

Agradeço à minha maravilhosa Família e ao Ramon pelo amor, união e incentivo em todos os momentos da minha vida....

Agradeço inicialmente a Deus, fonte de luz, vida e sabedoria, por me dar forças em todos os momentos da minha vida.

À Marta, por ter me recebido, desde o primeiro dia, de braços abertos e sempre disposta a me ensinar o que é a Ciência....Obrigada pelo incentivo e estímulo principalmente, naqueles momentos que tudo parecia perdido..... Além de ser uma grande profissional, é uma pessoa muito humana, e que tive o prazer de dividir momentos agradáveis e inesquecíveis....

À Helen que me ensinou a dar os primeiros passos neste mundo da ciência.... Agradeço imensamente cada dia de aprendizado e o apoio dado em todos os momentos da realização deste trabalho....

Aos meus grandes amigos do laboratório de doença de Chagas: Auffy, Maykon, Arnaldo, Lucas, Gláucia, Vitin do Bem, Rafaela, Renata e Alexandre por estarem sempre comigo... Com vocês aprendi que a união é fundamental, pois a ajuda de todos foi, com certeza, imprescindível em todas as etapas deste estudo. Meus sinceros agradecimentos!

Aos demais amigos do laboratório de doença de Chagas, que serão sempre lembrados com muito carinho: Géozico, Lívia, Dani Sorriso, Loló, Dani, Jayla, Marcela, Jamile, Lílian Santos, Rafael, obrigada pela maravilhosa convivência.... Todos os momentos que passamos juntos, jamais serão esquecidos.

Aos amigos da turma do Mestrado Larissa, Lílian, Tiago, João, Manuel e em especial à Miriam pela amizade e companheirismo.

À Aninha e aos funcionários do Biotério....Obrigada por tornar meus dias de trabalho em momentos tão prazerosos...Quantas conversas e risos....

À Cida, secretária do NUPEB, por estar sempre disposta a nos atender, com a maior boa vontade, carinho e atenção.

Aos professores do Laboratório de Doença de Chagas, André Talvani, Maria Terezinha e Evandro Marques....Obrigada pela amizade e sugestões tão pertinentes....

À professora Vanjinha.... Obrigada pela amizade, saiba que você é um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido... Continue brilhando e sendo esta pessoa maravilhosa que você é!!!!

À Rosália, meus sinceros agradecimentos pela avaliação clínica dos pacientes. À Andréa Macedo e Hélder pela colaboração na avaliação molecular das amostras.

Aos professores do Laboratório de Imunopatologia: Cláudia, Wanderson, Rodolfo e Alexandre, pela ajuda incondicional... Muito obrigada!

À toda população de Berilo e José Gonçalves de Minas, em especial às suas crianças....

As meninas da República Laço de Fita.... À **Li** minha irmãzinha... Saiba que levarei você sempre comigo....Com você pude aprender o real significado da palavra AMIZADE.. Agradeço pela agradável companhia nestes sete anos de convivência...Você sabe o quanto esforcei para chegar até aqui... Estou muito feliz, pois estamos conquistando mais um dos nossos sonhos, e o mais importante, estamos juntas..... **Debits**, minha grande amiga e companheira... Quantas conversas intermináveis..... Saiba que aproveitei cada segundinho ao seu lado e lhe confesso, quantas saudades de você amiga!!! À **Marisa** pela amizade, alegria e paz que contagia... Saiba que é muito especial e levarei você sempre comigo! À **Mari** obrigada pela companhia e momentos tão prazerosos que passamos juntas. À **Taís**, que tanto admiro em tão pouco tempo de convivência. Amo vocês!!!!

Ao Douglas pela agradável companhia e amizade nestes anos de convivência....

Aos meus maravilhosos pais, obrigada pelo amor e confiança, dedico esta conquista especialmente a vocês. Aos meus irmãos amados, Grá e Rangel, que sempre me dão forças para seguir em frente. À Julinha, minha princesinha e fonte de inspiração, titia ama muito você... A tia Cida e Tio Tião, meus segundos pais, obrigada por tudo... Aos meus irmãozinhos, Paulinha e Renan que tanto amo e admiro....Obrigada pelo carinho e respeito.... Ao meu amor, Ramon, pelo incentivo, carinho e cumplicidade; sem você, talvez a realização deste sonho seria impossível. Aos demais familiares que tanto amo, obrigada por tudo.....

Este estudo explorou a hipótese da correlação entre a genética e as características morfológicas do *T. cruzi* com a evolução clínica da doença de Chagas. Desta forma, amostras de parasitos de seis crianças e quatro de suas mães, residentes em Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, foram isoladas, sendo avaliadas quatro pares de amostras filho/mãe e mais duas amostras de crianças. Foram analisados a clínica dos pacientes por meio de exame clínico, ECG e raio-X do tórax e esôfago contrastado. Cinco crianças apresentaram a forma indeterminada da doença de Chagas e uma a forma cardíaca moderada enquanto todas as mães eram cardíacas com diferentes níveis de alteração. A caracterização morfológica foi feita em amostras isoladas das crianças em grupos de 8 camundongos Swiss, inoculados com 10.000 tripomastigotas sanguíneos, via IP, sendo analisados a curva de parasitemia, o período pré-patente, período patente, pico máximo de parasitemia, dia do pico máximo de parasitemia, morfologia do parasito no sangue periférico e a taxa de mortalidade. Foram realizadas posteriormente, passagens sucessivas do *T. cruzi* nestes animais, inoculados nas mesmas condições, no intuito de verificar seu comportamento após este manuseio. A caracterização morfológica permitiu concluir que todas as cepas apresentaram comportamento similar em camundongos, com 100% de infectividade, baixa virulência, mortalidade nula e predominância de formas largas durante a fase aguda infecção, sendo estas características também observadas após cinco passagens sucessivas. A caracterização bioquímica e molecular foi feita de todas as amostras isoladas das crianças e de suas mães, e consistiu na análise dos perfis de isoenzimas, de rDNA 24 S α , do gene mitocondrial da Citocromo Oxidase II (COII) e de microssatélites. A caracterização bioquímica e molecular revelou que todas as amostras pertencem ao zimodema 2, grupo *T. cruzi* II, subgrupo 2b. Apesar de todas as cepas apresentarem a mesma classificação genética, a análise de microssatélites foi capaz de revelar perfis distintos entre as cepas e idênticos quando os perfis das cepas de cada par filho/mãe foram comparados o que sugere a ocorrência de transmissão congênita. Embora os microssatélites apresentem alto poder para segregar cepas da mesma classificação genética quando comparados com os outros marcadores, a ausência de correlação entre o perfil de microssatélites e a condição clínica de cada par filho/mãe sugere que mais que a genética do parasito, fatores do hospedeiro e/ou o tempo de infecção pode(m) desempenhar um importante papel na determinação da evolução clínica da doença de Chagas

This study intended to explore the hypothesis of straight correlation between *T. cruzi* genetics and biological characteristics with the development of Chagas disease clinical status. For this, *T. cruzi* strains were isolated from two children and four child/mother pairs, from Berilo and José Gonçalves de Minas municipalities, Jequitinhonha Valley, MG. The clinical status of the patients was analyzed by clinical examination, electrocardiogram, rays-X of thorax and esophagus contrasted. Morphobiological characterization of children's strains was studied in groups of eight Swiss mice, inoculated with 10.000 blood trypomastigotes, via IP, being analyzed the parasitemia curve, pre-patent period, patent period, maximum peak of parasitemia, day of maximum of parasitemia, morphology of blood trypomastigotes and mortality. Following, successive blood passages of the strains were performed in these animals, inoculated at the same conditions, to verify their behaviour after this manipulation. Molecular characterization of all strains was performed by the analysis of isoenzymes, rDNA 24S α , COXII gene and microsatellites profiles. Five children displayed the indeterminate clinical form of the disease and one cardiac moderate, whereas all mothers were cardiac with distinct clinical status. All children's strains showed similar behavior in mice, being observed 100% of infection, low virulence, null mortality and predominance of large blood trypomastigotes, being these characteristics also observed after successive blood passages. Despite all strains presented the same genetic classification, the microsatellites analysis was able to reveal distinct profiles for each pair of strains child/mother, suggestive of congenital transmission. Although the microsatellites showed stronger discrimination power to segregate strains of same genetic classification as compared to other markers, the lack of correlation between the microsatellites profile and the clinical status of each pair child/mother suggest that more than parasite's genetic, host factors and/or the length of infection may play important role determining the clinical evolution of Chagas disease.

- Tabela I** - Amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de escolares chagásicos e de suas respectivas mães residentes em Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil, e dados demográficos dos pacientes. 25
- Tabela II** - Condições eletroforéticas e de revelação usadas para os sistemas enzimáticos estudados. 32
- Tabela III** - Sequências dos iniciadores de microssatélites utilizadas na caracterização molecular de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de crianças e de suas mães habitantes dos municípios de Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG..... 35
- Tabela IV** - Dados clínicos e forma clínica dos escolares residentes em Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. 38
- Tabela V** – Parâmetros biológicos avaliados em camundongos Swiss inoculados com amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de crianças dos municípios de Berilo e José Gonçalves de Minas, MG, Brasil..... 41
- Tabela VI** - Perfis eletroforéticos detectados na caracterização enzimática de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de crianças e de suas mães residentes nos municípios de Berilo e José Gonçalves de Minas, MG, Brasil. Pareamento filho/mãe: 855/2337; 817/1663; 795/103; 829/2339. Amostras isoladas de crianças: 1661 e 806..... 46
- Tabela VII** - Tamanho dos alelos em pares de bases de cinco locos de microssatélites observados em amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas das crianças e de quatro de suas mães residentes em Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. Amostras 855/2337; 829/2339, 795/103 e 817/1663 representam pareamento de amostras isoladas de pares filho/mãe. Amostras 1661 e 806 representam amostras de *T. cruzi* isoladas de crianças. 50

- Figura 1** - Polimorfismo dos tripomastigotas sanguíneos. A: forma fina; B: forma intermediária; C: forma larga. 30
- Figura 2** - Curvas de parasitemia observadas em camundongos Swiss inoculados com 10.000 tripomastigotas sanguíneos das amostras de *Trypanosoma cruzi* (829, 795, 855, 817, 806 e 1661) isoladas de crianças dos municípios de Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. 40
- Figura 3** - Polimorfismo das formas tripomastigotas sanguíneas observadas durante o período patente da infecção aguda em camundongo Swiss infectado com a 10000 tripomastigotas sanguíneos da amostra 806 de *Trypanosoma cruzi*. 43
- Figura 4** - Polimorfismo das formas tripomastigotas sanguíneas observadas durante o período patente da infecção aguda em camundongo Swiss infectado com a 10.000 tripomastigotas sanguíneos da amostra 817 de *Trypanosoma cruzi*. 43
- Figura 5** - Curvas de parasitemia observadas em camundongos Swiss inoculados com 10.000 tripomastigotas sanguíneos da amostras 855, 829, 817 e 806 de *Trypanosoma cruzi* na primeira passagem sanguínea e após cinco passagens sucessivas em camundongos. 44
- Figura 6** – Perfis eletroforéticos das enzimas GPI (A) e G6PD (B) de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas das crianças e de quatro de suas mães residentes nos municípios de Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. Pareamento filho/mãe: 855/2337; 817/1663; 795/103; 829/2339. Amostras de crianças: 1661 e 806. 45
- Figura 7** – Perfis da região divergente D7 para o gene rDNA 24 S α obtidos de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas das crianças e de quatro de suas mães. PM: Marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen, USA). Pareamento filho/mãe: 855/2337; 817/1663; 795/103; 829/2339. Amostras isoladas de crianças: 806 e 1661. 47
- Figura 8** – Padrões de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) gerados a partir de produtos amplificados por PCR do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II das amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas das crianças e de quatro de suas mães após digestão enzimática empregando AluI. PM: Marcador de peso molecular de 25 pares de base (pb). Pareamento filho/ mãe: 855/2337; 817/1663; 795/103; 829/2339. Amostras isoladas de crianças: 806 e 1661. 48
- Figura 9** – Tamanho dos alelos em pares de bases de dois locos de microssatélites observados nas amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas das crianças e de quatro de suas mães, residentes em Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. Amostras 855/2337; 829/2339, 795/103 e 817/1663 representam pareamento filho-mãe. Amostras 1661 e 806 representam amostras de *T. cruzi* isoladas das crianças. A - representa tamanho dos alelos em pares de bases do loco TAC15; B - representa tamanho dos alelos em pares de bases do loco AAT. 49

ATP	Adenosina Trifosfato
d.a.i.	Dias após a infecção
dNTP's	2'-desoxinucleotídeos-5'-trifosfato
DPMP	Dia do pico máximo de parasitemia
DTU	Discrete Typing Unity
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodietildinitrotetracético
FNS	Fundação Nacional da Saúde
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GDH1	Glutamato desidrogenase NAD ⁺
GDH2	Glutamato desidrogenase NADP ⁺
GPI	Glicose-6-fosfato isomerase
IDH	Isocitrato desidrogenase
INF	Infectividade
IP	Intraperitoneal
Kdna	DNA do cinetoplasto
LIT	Liver Infusion Triptose
LSSP-PCR	Low-Stringency Single specific Primer PCR
MitCOII	Gene mitochondrial Citocromo Oxidase subunidade II
MN	Teste de Mann-Whitney
MOR	Mortalidade
PAR	Parasitemia
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMP	Pico Máximo de Parasitemia
PITs	Postos de Informação de Triatomíneos
PCDCh	Programa de controle da doença de Chagas
PPP	Período Pré-Patente
PP	Período Patente
RAPD	Randomly Amplified polymorphic DNA
Rdna	Gene ribossômico 24S α
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rpm	Rotações por minuto

rRNA	Ácido ribonucléico ribosomal
X^2	Teste do qui-quadrado
Z	Zimodema

1.0 Introdução	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas	2
1.2 Revisão da Literatura.....	4
1.2.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e suas características biológicas fundamentais	4
1.2.2 Variabilidade genética do <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.2.3 Genética do <i>T. cruzi</i> e suas implicações biológicas, epidemiológicas e clínicas	14
1.2.4 Doença de Chagas no município de Berilo e José Gonçalves de Minas..	18
1.3 Justificativa	20
3.0 Objetivos	21
3.1 Objetivo Geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4.0 Casuística, Material e Métodos	23
4.1 Amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i> e casuística.....	24
4.2 Avaliação clínica dos pacientes.....	27
4.3 Infecções Experimentais.....	27
4.3.1 Caracterização biológica das amostras de <i>T. cruzi</i> isoladas das crianças na primeira passagem sanguínea em camundongos Swiss	27
4.3.1.1 Parâmetros Avaliados	27
4.3.1.1.1 Infectividade (INF)	27
4.3.1.1.2 Parasitemia (PAR).....	28
4.3.1.1.3 Período Pré-patente (PPP).....	28
4.3.1.1.4 Período Patente (PP)	28
4.3.1.1.5 Pico Máximo de Parasitemia (PMP).....	29
4.3.1.1.6 Dia do Pico Máximo (DPMP)	29
4.3.1.1.7 Mortalidade (MOR)	29
4.3.1.1.8 Passagens sucessivas dos parasitos em camundongos Swiss.....	29
4.3.1.1.9 Caracterização morfológica dos parasitos no sangue periférico	30
4.4 Caracterização bioquímica e molecular das amostras de <i>T.cruzi</i>	30
4.4.1 Caracterização Isoenzimática.....	30

4.4.1.1 Obtenção do extrato celular e caracterização isoenzimática.....	30
4.4.2 Caracterização molecular	33
4.4.2.1 Extração de DNA	33
4.4.2.1.1 Caracterização pela amplificação da região 3' do gene rDNA 24 S α	33
4.4.2.1.2 Caracterização pela PCR do gene Mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade II (CO II).....	34
4.4.2.1.3 Caracterização pela PCR de Microssatélites	35
4.4.2.1.3.1 Determinação do Tamanho dos Alelos de Microssatélites..	36
4.5 Análise de dados.....	36
5.0 Resultados.....	37
5.1 Aspectos Clínicos das Crianças e mães.....	38
5.2 Caracterização biológica das amostras de <i>T. cruzi</i> isoladas das crianças	39
5.2.1 Parâmetros avaliados na primeira passagem sanguínea	39
5.2.1.1 Infectividade (INF)	39
5.2.1.2 Parasitemia (PAR).....	39
5.2.1.3 Período pré-patente (PPP)	40
5.2.1.4 Período patente (PP).....	41
5.2.1.5 Pico Máximo de Parasitemia (PMP) e Dia do Pico Máximo (DPMP)	41
5.2.1.6 Mortalidade (MOR)	42
5.2.1.7 Caracterização morfológica dos parasitos no sangue periférico.....	42
5.2.1.8 Caracterização biológica após passagens sucessivas em camundongos.....	44
5.2.1.8.1 Parasitemia (PAR)	44
5.2.1.8.2 Mortalidade.....	44
5.3 Caracterização Bioquímica e Molecular	45
5.3.1 Análise do perfil eletroforético de isoenzimas (Zimodema)	45
5.3.2 Amplificação da região 3' do gene rDNA 24 S α	46
5.3.3 PCR do gene Mitocondrial Citocromo Oxidase, subunidade II (CO II)	47
5.3.4 PCR de Microssatélites	48

6.0 Discussão	51
7.0 Conclusões.....	63
8.0 Perspectivas.....	65
9.0 Referências Bibliográficas	67
10.0 Anexos.....	86

1.0 Introdução

1.1 *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Tripanosomatidae. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se a existência de aproximadamente 15 milhões de indivíduos infectados por este parasito na América Latina, com incidência anual de 41.200 novos casos e 12.500 mortes em decorrência de danos irreversíveis ao coração e ao trato digestivo (WHO, 2007).

Esta enfermidade é uma das doenças parasitárias com maior impacto social e econômico na América Latina (DIAS & SCHOFIELD, 1999; PRATA, 2001). Além disso, é a mais letal de todas as moléstias endêmicas de origem infecciosa, apresentando um efeito devastador neste continente. A doença de Chagas é considerada a sexta doença negligenciável mais importante do mundo (HOTEZ *et al.*, 2006) e devido a sua prolongada cronicidade gera maior prejuízo econômico (SCHOFIELD *et al.*, 2006; WHO, 2007).

Considerada no passado uma enfermidade dos que viviam em condições precárias no interior, o êxodo rural e a imigração transformaram-na em uma calamidade urbana e um problema de saúde em países não endêmicos, onde passou a ser transmitida verticalmente, por transfusão sanguínea ou por órgãos transplantados (WHO, 1991; DIAS, 1992; PRATA, 2001). Assim, a doença de Chagas que atingia predominantemente a população mais pobre e de zona rural, passou a atingir um espectro social muito mais amplo.

Neste contexto, muitos esforços têm sido realizados no sentido de controlar a transmissão desta doença que causa tanto ônus aos países endêmicos, inclusive ao Brasil (SCHOFIELD & DIAS, 1991). O controle efetivo desta endemia pôde ser alcançado, inquestionavelmente, mediante desenvolvimento social e melhoramento das condições de vida das populações.

As iniciativas dos países do Cone Sul (Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai), em 1991, e dos países Andinos (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela), em 1997, foram imprescindíveis no controle da Doença de Chagas em vários países latino-americanos. A finalidade destas iniciativas foi interromper o ciclo domiciliar da infecção com a eliminação dos vetores domésticos (particularmente o *Triatoma infestans*), responsáveis pela transmissão do *T. cruzi* no espaço doméstico ou peridoméstico, redução e eliminação da transmissão por transfusão sanguínea, além do

tratamento específico de recém-nascidos, crianças e dos casos agudos detectados (DIAS *et al.*, 2002b; WHO, 2007).

Não há dúvidas que tais estratégias de controle no Brasil têm obtido excelentes resultados nos últimos anos (DIAS *et al.*, 2008). Houve redução significativa do risco de transmissão da doença no país, já que foi observado um grande impacto na diminuição de hospitalizações, na prevalência da infecção, na morbidade e, mesmo, na mortalidade (SCHOFIELD & DIAS, 1999; VINHAES & DIAS, 2000; PRATA, 2001; DIAS *et al.*, 2002b; DIAS, 2006; DIAS, 2007). Além disso, a redução de prevalência da infecção em crianças de baixa idade, documentada por inquéritos sorológicos realizados em várias regiões do país, evidencia o sucesso do controle da transmissão vetorial e sanguínea (SCHMUNIS *et al.*, 1996; WHO, 1997; DIAS, 2000a; DIAS, 2000; MONCAYO, 2003; BORGES *et al.*, 2006; DIAS, 2007). O declínio na transmissão vetorial resultou na diminuição de gestantes e doadores de sangue infectados, o que consequentemente reduziu os riscos de transmissão transfusional e congênita (DIAS, 2002; DIAS *et al.*, 2002b; SCHOFIELD *et al.*, 2006; DIAS, 2007). Sabe-se que a transmissão congênita possui baixa importância epidemiológica (PRATA, 1999), mas ainda constitui uma via potencial, de manutenção da endemia chagásica no Brasil. Desta forma, é recomendável tornar rotineira a investigação de gestantes chagásicas no pré-natal e garantir o tratamento de recém-nascidos infectados (SILVEIRA *et al.*, 2000).

Apesar destes avanços, seria ingênuo pensar que o problema de controle da doença de Chagas está resolvido no Brasil. É nítida a progressiva perda de vontade política e de competência técnica para o seu permanente e necessário controle vetorial, além da diminuição da participação popular nas estratégias de combate (DIAS, 2000). Sabe-se que a ausência de uma vigilância epidemiológica atuante e eficaz representa risco de re-colonização domiciliar dos triatomíneos, sobretudo nos bolsões de pobreza e nas regiões politicamente menos representativas (SCHOFIELD *et al.*, 2006; WHO, 2007).

Associado a estes fatores, deve-se considerar o enorme contingente de pessoas, principalmente adultos, com cardiopatia chagásica crônica nas regiões endêmicas, necessitando de assistência médica e social (WHO, 2002; DIAS, 2006; DIAS, 2007). Diante desta realidade constata-se que a doença permanece ainda como um sério problema de saúde pública.

Em relação à evolução clínica do paciente, diversos trabalhos têm demonstrado que a doença de Chagas apresenta um espectro clínico diverso, podendo os pacientes

apresentar a forma indeterminada (assintomática), cardíaca, digestiva ou mista da doença, apresentando esta última associação de manifestações cardíacas e digestivas (DIAS, 1992; PRATA, 1999; MACEDO *et al.*, 2004; WHO, 2007; COURA, 2007). Esta diversidade de manifestações clínicas tem sido observada, principalmente quando pacientes de diferentes regiões geográficas da América Latina são avaliados (WHO, 2007), fator este que pode estar associado com a heterogeneidade genética das populações de *T. cruzi* nelas encontrada (MACEDO & PENA., 1998; MACEDO *et al.*, 2001; DEVERA *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2004). Apesar das evidências de que o curso da infecção induzida por diferentes cepas possa influenciar na morbidade da doença (ANDRADE, 1974; MELO & BRENER, 1978; MONTAMAT *et al.*, 1996; ANDRADE & MAGALHAES, 1997; GUEDES *et al.*, 2007) não há ainda nenhuma demonstração segura de associação entre o comportamento experimental das populações parasitárias e as formas clínicas que causam no paciente.

Por outro lado, vários estudos têm demonstrado o impacto das características genéticas do parasito em suas propriedades biológicas, como a virulência, patogenicidade, mortalidade, e a susceptibilidade a drogas (ANDRADE *et al.*, 1997; LAURENT *et al.*, 1997; REVOLLO *et al.*, 1998; MURTA *et al.*, 1998; TOLEDO *et al.*, 2003; TOLEDO *et al.*, 2004b). Tais trabalhos apresentam relevância, pois a avaliação biológica e molecular de amostras de parasitos isolados de indivíduos de determinada área endêmica propicia verificar uma possível correlação destes parâmetros com as características clínicas e epidemiológicas da doença naquela região.

1.2 Revisão da Literatura

1.2.1 O *Trypanosoma cruzi* e suas características biológicas fundamentais

O *T. cruzi* é um parasito constituído de populações heterogêneas circulando em ambos os ciclos domésticos e silvestres, entre humanos, vetores e animais reservatórios (SOUTO *et al.*, 1996; ZINGALES *et al.*, 1998; BUSCAGLIA & DI NOIA, 2003). Amostras deste parasito são um complexo de populações que diferem entre si em relação às suas propriedades morfológicas (BRENER & CHIARI, 1963; BRENER, 1977), biológicas (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953; ANDRADE & ANDRADE, 1966; ANDRADE, 1985), bioquímicas (MILES *et al.*, 1977; BOGLIOLO *et al.*, 1986), imunológicas (NUSSENZWEIG *et al.*, 1962; NUSSENZWEIG & GOBLE, 1966),

susceptibilidade à drogas (BRENER *et al.*, 1976; ANDRADE, 1985; FILARDI & BRENER, 1987; TOLEDO *et al.*, 2003; TOLEDO *et al.*, 2004b) e moleculares (MOREL *et al.* 1980; MACEDO *et al.*, 1992; FERNANDES *et al.*, 1998).

Inicialmente, o estudo das diferenças entre as populações do parasito foi baseado na caracterização de parâmetros isolados, como morfologia das formas sanguíneas do parasito, virulência, tropismo tecidual e patogenicidade (BRENER, 1965; BICE & ZELEDON, 1970; ANDRADE, 1974; BRENER, 1977; ANDRADE, 1985), além do comportamento do parasito no vetor invertebrado (GARCIA & DVORAK, 1982; LANA *et al.*, 1998) e nos meios de cultivo, sejam eles celulares ou acelulares (DVORAK *et al.*, 1980; SANCHEZ *et al.*, 1990; LAURENT *et al.*, 1997; REVOLLO *et al.*, 1998).

Nesse sentido, diferenças morfológicas das formas sanguíneas do *T. cruzi* têm sido observadas. CHAGAS (1909) foi o primeiro pesquisador a demonstrar a ocorrência de formas delgadas e largas do parasito no sangue periférico de animais infectados. Nesta época, tais formas foram atribuídas a um dimorfismo sexual. Entretanto, BRUMPT (1912) atribuiu ao dimorfismo um fenômeno de maturidade, sendo as formas delgadas consideradas jovens e as largas formas em degeneração. PIZZI (1953) propôs que as formas delgadas do parasito seriam jovens e apareceriam no início da infecção, quando ainda há uma resposta imune incipiente. Tentando esclarecer tais dúvidas, SILVA (1959), estudando três cepas de *T. cruzi*, concluiu que durante o período de infecção aguda, geralmente existe predominância de uma forma em relação à outra, ressaltando então, o encontro de formas largas, intermediárias e delgadas.

Dando prosseguimento a estes estudos, vários autores continuaram investigando aspectos relacionados à morfologia do *T. cruzi* (BRENER 1965; ANDRADE *et al.*, 1970; BRENER 1977). Padrões morfológicos de sete diferentes amostras do parasito foram descritos por BRENER & CHIARI (1963) na tentativa de estabelecer uma correlação entre a predominância de formas delgadas, largas e muito largas com a curva de parasitemia e o período pré-patente. Foi verificada uma correlação entre uma precoce e rápida multiplicação do parasito com a predominância de formas delgadas e macrofagotropismo; e, ao contrário, uma lenta e progressiva multiplicação em cepas que apresentam predominância de formas largas e miotropismo, corroborando os resultados de outros trabalhos (BRENER, 1965; ANDRADE, 1974).

O significado das diferenças morfológicas foi avaliado por BRENER (1969) em estudos no modelo murino, quando foi demonstrado que formas largas do parasito

persistiram no sangue por alguns dias sem penetrar nos tecidos, ao contrário das formas finas que desapareceram rapidamente para realizar o ciclo tecidual. Neste mesmo estudo, foi verificado ainda, que em camundongos na fase crônica da infecção, na qual há uma resposta imune estabelecida, as formas largas persistiram no sangue por um longo tempo, diferentemente das formas delgadas que desapareceram da circulação 1-2 horas após a inoculação intravenosa.

Baseado em aspectos morfológicos e no tropismo tecidual, BRENER (1977) sugeriu a denominação das cepas Y e CL como “polares”. Estas diferem entre si em relação a diversas características, tais como a morfologia dos tripomastigotas no sangue periférico, curva de parasitemia durante a fase aguda e fase crônica da infecção, mortalidade, tropismo tecidual, susceptibilidade à resposta imune e a fármacos. Desta forma, o autor sugeriu que estas cepas podem ser utilizadas como modelos de comparações na caracterização de amostras de *T. cruzi* isoladas de diversos hospedeiros, vetores e reservatórios.

VIANNIA (1911) verificou que o *T. cruzi* poderia ser encontrado em diferentes tecidos do hospedeiro vertebrado, embora os parasitos apresentassem certa preferência por grupos celulares específicos. Populações com predomínio de formas delgadas são mais eficientes para penetrar em células de cultura de tecidos do que populações com predomínio de formas largas (DEANE *et al.*, 1976; BERTELI & BRENER 1980; GUEDES *et al.*, 2007).

Vários autores (SILVA & NUSSENWEIG, 1953; ANDRADE & ANDRADE, 1966; BRENER, 1977; MELO & BRENER, 1978; LENZI *et al.*, 1998) comprovaram essa observação e estabeleceram a existência de cepas miotrópicas, reticulotrópicas e outras que apresentam preferência por diferentes tecidos. Desta maneira, diferentes cepas de *T. cruzi* podem determinar lesões tissulares peculiares como consequência do tropismo específico e predominante para diferentes tipos celulares do hospedeiro, como por exemplo, macrófagos, músculos esquelético e cardíaco e neurônios (ANDRADE & ANDRADE, 1966; ANDRADE *et al.*, 1970; MELO & BRENER, 1978).

O polimorfismo e a heterogeneidade das populações do *T. cruzi* têm sido considerados na doença de Chagas (MACEDO *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2004) propiciando o estabelecimento da base para o “Modelo Histotrópico Clonal” para a doença de Chagas (MACEDO & PENA, 1998). Este modelo parte do pressuposto que os diferentes clones que compõe uma cepa podem apresentar tropismo para diferentes tecidos e, desta forma, o repertório clonal seria fundamental na determinação da

evolução da doença (ANDRADE, 1999; VAGO *et al.*, 2000). Assim, considerando o tropismo de cada clone para um órgão específico, pode-se dizer que no momento de coleta de sangue, parasitos circulantes podem ser diferentes daqueles que estão causando lesão nos tecidos.

Neste contexto, sabe-se que o estudo em conjunto de diferentes aspectos biológicos, como por exemplo, curva de parasitemia, mortalidade, morfologia do parasito no sangue periférico, tropismo tecidual e a capacidade de produzir lesões tissulares em camundongos é relevante, já que podem auxiliar na compreensão de aspectos ainda não elucidados como, por exemplo, a patogenia e a diversidade das formas clínicas observada em diferentes áreas endêmicas da doença de Chagas (ANDRADE *et al.*, 1970; ANDRADE, 1999; WHO, 2007).

Desta maneira, ANDRADE (1974) e ANDRADE & MAGALHÃES (1997) estudando as diferenças nos parâmetros morfobiológicos e histopatológicos de cepas de *T. cruzi* em camundongos Swiss, propuseram o primeiro critério de classificação para essa espécie com o objetivo de agrupar populações do *T. cruzi* que apresentavam padrões de comportamento biológico semelhantes. De acordo com esses estudos, três Tipos ou Biodemas foram estabelecidos:

- **Tipo I ou Biodema I (cepa Y e Peruviana):** alta virulência, multiplicação rápida, picos de parasitemia altos e precoces e mortalidade (9 a 10 dias de infecção), predominância de formas finas e macrofagotropismo na fase inicial da infecção;
- **Tipo II ou Biodema II – (16 cepas isoladas no Recôncavo Baiano - Estado da Bahia):** multiplicação lenta, picos de parasitemia irregulares e tardios (12 a 20 dias de infecção), baixa taxa de mortalidade, predominância de formas largas ao longo da infecção, mas com formas finas em pequeno número na fase inicial, miotropismo, envolvendo principalmente o músculo cardíaco;
- **Tipo III ou Biodema III – (cepa Colombiana):** multiplicação lenta, altos picos de parasitemia entre o 20^o e 30^o dias de infecção, baixas taxas de mortalidade, predominância de formas largas ao longo do curso da infecção com envolvimento predominante do músculo esquelético.

Em relação à influência de cepas de *T. cruzi* na morbidade da doença de Chagas não há nenhuma investigação que tenha seguramente identificado forte correlação entre a forma clínica induzida por determinada população de *T. cruzi* em humanos e o curso da infecção no modelo experimental inoculado com a mesma cepa deles isoladas (BRENER, 1985). Entretanto, algumas inferências sobre o papel do parasito na evolução das lesões experimentais têm sido relatadas. Cepas de *T. cruzi* que provocam fases agudas de alta virulência (períodos pré-patentes curtos, alta parasitemia e mortalidade) em camundongos, induzem uma miocardiopatia significativamente mais grave que cepas de baixa virulência (SCHLEMPER Jr. *et al.*, 1982). Esse dado é interessante se comparado com resultados do trabalho de DIAS (1982) em que foi verificada uma maior prevalência de cardiopatia em pacientes com fase aguda grave (66,6%) em relação aos pacientes com sintomatologia discreta (7,6%), corroborando assim a afirmativa de KOOBERLE (1962) de que o destino da evolução clínica da infecção chagásica define-se na fase aguda.

É razoável supor que as manifestações clínicas da doença, susceptibilidade do parasito a drogas e diferenças regionais da morbidade (RASSI & FERREIRA, 1971; RASSI, 1982; ANDRADE *et al.*, 1985; CANÇADO, 1985) podem ser conseqüência da heterogeneidade do parasito, já que variações intraespecíficas nas diferentes cepas do *T. cruzi* têm sido demonstradas (ANDRADE, 1974; MILES *et al.*, 1977; BRENER, 1977; MOREL, 1980; ANDRADE, 1985; STEINDEL *et al.*, 1993; MACEDO & PENA, 1998; MACEDO *et al.*, 2001; DEVERA *et al.*, 2003).

Apesar da existência de vários métodos moleculares refinados disponíveis atualmente para investigar e caracterizar o *T. cruzi* (MACEDO & PENA, 1998; DEVERA *et al.*, 2003), estudos biológicos continuam sendo fundamentais para avaliar a possível influência das cepas do parasito nos mecanismos patogênicos.

Sendo assim, partindo do pressuposto que a cepa de *T. cruzi* é um importante fator que influencia na morbidade da doença, o seu isolamento e inoculação em hospedeiro adequado devem reproduzir a patologia detectada no homem ou pelo menos esclarecer aspectos da relação parasito-hospedeiro. Este raciocínio tem estimulado o isolamento e estudo de inúmeras cepas que circulam na natureza entre homens, vetores e reservatórios (ANDRADE *et al.*, 1992; MONTAMAT *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1999; MARTÍNEZ-DÍAS *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2003; SOUSA *et al.*, 2006).

Entretanto é importante salientar que ela seja realizada concomitantemente ao estudo molecular deste parasito. Tais avaliações, analisadas em conjunto, propiciarão

verificar se há associação de tais parâmetros com a epidemiologia, evolução clínica e a resposta ao tratamento etiológico em indivíduos soropositivos de diferentes regiões endêmicas da doença de Chagas. Este é um dos objetivos deste trabalho em relação às cepas de *T. cruzi* aqui estudadas.

1.2.2 Variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi*

Os estudos bioquímicos e moleculares do *T. cruzi* têm revelado grande variabilidade genética nesta espécie (MACEDO & PENA, 1998; MOMEN, 1999). Diversas técnicas estão disponíveis para a caracterização molecular de amostras de *T. cruzi* isoladas de diferentes hospedeiros (MACEDO & PENA, 1998; MACEDO *et al.*, 2002; DEVERA *et al.*, 2003). Tais estudos basearam-se inicialmente, na análise dos padrões eletroforéticos de enzimas celulares (isoenzimas) e na variação do DNA do cinetoplasto – kDNA (TOYÉ, 1974; MILES *et al.*, 1977; MOREL & SIMPSON, 1980; MOREL *et al.*, 1980; BLANCO & MONTAMAT, 1998), sendo as populações assim caracterizadas denominadas zimodemas e esquizodemas, respectivamente. Ambas as técnicas confirmaram a possibilidade de reinfecções e da existência de infecções mistas em um mesmo hospedeiro (MOREL *et al.*, 1980; DEANE *et al.*, 1984; CARNEIRO *et al.*, 1991; SOLARI *et al.*, 1992; LAURIA-PIRES *et al.*, 1996) também demonstradas por métodos biológicos convencionais (KAGAN & NORMAN, 1962; BRENER, 1967) e mais recentemente por novas metodologias moleculares (MACEDO *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Considerando a variabilidade isoenzimática do *T. cruzi*, MILES *et al.*, (1977, 1978, 1980) realizaram trabalhos com amostras deste parasito isoladas de diferentes hospedeiros de várias regiões do Brasil e propuseram a existência de três grupos, denominados zimodemas principais Z1, Z2 e Z3, sendo Z1 e Z3 preferencialmente associados com o ciclo silvestre e o Z2 com o ciclo doméstico de transmissão (MILES *et al.*, 1978, MILES *et al.*, 1980; FERNANDES *et al.*, 1998a; ZINGALES *et al.*, 1998; FERNANDES *et al.*, 1999). Entretanto, outros trabalhos têm demonstrado a presença de parasitos pertencentes ao Z1 no ciclo doméstico com conseqüente infecção humana (MONTAMAT *et al.*, 1996; BARNABÉ *et al.*, 2000; BARNABÉ *et al.*, 2001; AÑES *et al.*, 2004; BARNABÉ *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2006).

ROMANHA (1982) e CARNEIRO *et al.*, (1990) utilizaram posteriormente um conjunto de oito enzimas distintas para caracterizar amostras do *T. cruzi* obtidas de

vários hospedeiros da região de Bambuí, MG. Neste estudo foram definidos quatro zimodemas denominados ZA, ZB, ZC e ZD, sendo Z2 (MILES, 1978) e ZA similares. O ZB foi encontrado em cepas silvestres e o ZA no ciclo de transmissão doméstico.

Dando continuidade às análises da diversidade do parasito, TIBAYRENC *et al.* (1986) e TIBAYRENC & AYALA (1988) estudaram 15 locos enzimáticos de clones isolados de 121 amostras de *T. cruzi*, selecionadas aleatoriamente entre 540 amostras isoladas de diferentes hospedeiros do ciclo doméstico e silvestre de diversas regiões da América. Neste estudo foi revelada uma maior diversidade entre as populações do parasito, sendo demonstrada a existência de 43 grupos genéticos principais distintos ou zimodemas, que foram denominados de clones naturais ou “clonets”. Análises da genética de população, realizadas pelo mesmo grupo de pesquisadores, demonstraram que o *T. cruzi* apresenta uma estrutura e evolução típica de população clonal (TIBAYRENC & AYALA, 1988; TIBAYRENC *et al.*, 1993; TIBAYRENC, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1999; BARNABÉ *et al.*, 2005). Isto implica que a reprodução sexual ou recombinação genética é um fenômeno extremamente raro nesta espécie, tão raro que não é capaz de impedir a existência de clones naturais estáveis no tempo e no espaço. Desse modo, a variabilidade genética e biológica do parasito expressa o longo tempo da evolução separada de múltiplos clones, o que poderia explicar a grande variabilidade clínica da doença por ele causada em regiões geográficas distintas (TIBAYRENC *et al.*, 1986; TIBAYRENC & AYALA, 1988). TIBAYRENC & BRENIÈRE (1988) verificaram que quatro (genótipos 19, 20, 39 e 32) dos 43 clones naturais ou genótipos principais representavam 53,7% do total denominando-os de ubíquos. Por serem mais presentes, estes autores sugeriram que tais genótipos deveriam ser extensivamente estudados no sentido de explorar a hipótese subjacente ao modelo clonal de associação entre a divergência filogenética e as propriedades biológicas, epidemiológicas e clínicas fundamentais incluindo também sua susceptibilidade a drogas (TIBAYRENC, 2003).

Sabe-se que o DNA contido no cinetoplasto (kDNA) do *T. cruzi* é constituído por dois tipos de moléculas circulares concatenadas denominadas minicírculos e maxicírculos que compreendem 16-30% do DNA total do parasito (HENRIKSSON *et al.*, 1996). Os maxicírculos são grandes moléculas, com poucas cópias por célula, variando de 20 a 50. Os maxicírculos possuem genes que codificam proteínas mitocondriais (citocromo oxidases, citocromo b, ATPases, NADH desidrogenase) e dos rRNAs mitocondriais (SILVEIRA, 2000), e por isso são considerados uma estrutura

análoga ao DNA mitocondrial dos demais eucariotos (SILVEIRA, 2000; JUNQUEIRA *et al.*, 2005). Já os minicírculos são pequenas moléculas e estão presentes em elevado número no kDNA (10.000 a 20.000 cópias por célula). Estão envolvidas no processo de editoração (adição ou deleção de uridinas) dos mRNAs das enzimas mitocondriais (STUART, 1995; SILVEIRA, 2000; JUNQUEIRA *et al.*, 2005) e apresentam quatro regiões conservadas de 120 a 160 pb, intercaladas com quatro regiões variáveis de 280 a 320 pb (DEGRAVE *et al.*, 1988). Estas regiões variáveis podem diferir muito entre as diferentes linhagens do parasito, sendo então muito adequadas para o estudo da variabilidade genética nesta espécie (MOREL *et al.*, 1980; TEIXEIRA *et al.*, 1994; SHLOMAI, 1994). Devido ao elevado número de cópias, os minicírculos têm sido utilizados como alvos preferenciais para a detecção do parasito através da PCR no sangue de animais experimentalmente infectados (STURM *et al.*, 1989), no sangue de pacientes chagásicos (AVILA *et al.*, 1991; AVILA *et al.*, 1993), nas fezes de triatomíneos (BRITO *et al.*, 1995; BRENIÈRE *et al.*, 1995) e em tecidos cardíacos, esofágico e colón de pacientes chagásicos crônicos (VAGO *et al.*, 2000). Sendo assim, a variabilidade intraespecífica do *T. cruzi* tem sido também estudada por técnicas capazes de detectar a presença do parasito ou fragmentos de seu DNA diretamente no sangue ou nos tecidos infectados. A técnica de LSSP-PCR foi a primeira capaz de detectar a variabilidade do kDNA do *T. cruzi* diretamente em tecidos de pacientes crônicos (VAGO *et al.*, 1996b; VAGO *et al.*, 2000), e desta forma tem sido importante na tentativa de verificar a existência de correlação entre as propriedades biológicas e genéticas do parasito com as manifestações clínicas da doença.

Empregando ainda a metodologia da PCR, a identificação de marcadores de DNA nucleares do parasito com baixa taxa evolucionária, como por exemplo, o gene rDNA 24S α e a seqüência do gene mini-exon têm sido utilizadas por vários autores (SOUTO *et al.*, 1993; SOUTO *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 1999b; ZINGALES *et al.*, 1999; SOUSA *et al.*, 2006).

Análises de seqüências do gene rDNA 24S α de *T. cruzi* demonstraram que elas são altamente polimórficas e encontradas repetidas em *tandem*, separadas por regiões não transcritas no genoma de tripanosomatídeos (RAMIREZ & GUERVARA, 1987). A análise comparativa de seqüências gênicas dessa região demonstra um elevado grau de homologia, exceto para a região 3' do gene (região divergente D7). Iniciadores desenhados para esta região mostraram um dimorfismo de tamanho dos produtos de amplificação entre diversas cepas de *T. cruzi*. Desta forma, dois perfis foram

inicialmente encontrados, sendo classificadas como grupo 1 amostras que apresentam um fragmento de 125pb e amostras do grupo 2 aquelas que apresentam um fragmento de 110pb (SOUTO & ZINGALES, 1993). Com o aumento do número de amostras analisadas foi observada a existência de um terceiro grupo de cepas que apresentavam os dois fragmentos, sendo denominados grupo 1/2 (SOUTO *et al.*, 1996) correspondentes às de perfis híbridos.

Corroborando com estes resultados, análises da seqüência do gene mini-exon determinaram também a divisão de cepas e isolados do parasito em dois grupos. As cepas que apresentaram um produto de 300pb foram designadas como pertencentes ao grupo 1 (ou linhagem genética 1) e aquelas que apresentaram um produto de 350pb foram designadas como pertencentes ao grupo 2 (ou linhagem 2). Uma excelente correlação entre a classificação obtida com o rDNA e mini-exon foi observada (SOUTO *et al.*, 1996) o que permitiu a classificação das cepas em três grupos: Grupo I (125pb para rDNA e 300pb para mini-exon), Grupo 2 (110pb para rDNA e 350pb para mini-exon) e Grupo 1/2 (presença de ambos os produtos de amplificação do rDNA com o produto do mini-exon do grupo 1).

CLARK & PUNG (1994) estudando o polimorfismo do gene da subunidade 18S do rRNA, através da técnica de RFLP, classificaram as cepas de *T. cruzi* em grupos denominados ribodemas I, II e III. Observou-se assim correlação entre os marcadores genéticos para as subunidades 18S e 24S α do rDNA, sendo as cepas identificadas como ribodema I correspondentes ao Grupo 1 e as cepas identificadas como ribodema II e III correspondentes ao Grupo 2.

Diante de várias classificações, realizadas por diferentes pesquisadores, utilizando distintos marcadores biológicos, bioquímicos e moleculares, tornou-se necessário padronizar a nomenclatura deste parasito. Desta maneira, em 1999, ficou estabelecido no Encontro Satélite, durante o “Simpósio Internacional sobre os Avanços do Conhecimento da Doença de Chagas 90 anos após sua descoberta” (ANONYMOUS, 1999), o seguinte critério para nomenclatura do *T. cruzi*:

- *T. cruzi* I quando equivalentes ao Z1 (MILES *et al.*, 1977; BARRETT *et al.*, 1980), Tipo III (ANDRADE, 1974), Linhagem 2 (SOUTO *et al.*, 1996), Grupo 1 (TIBAYRENC, 1995), Ribodema II/III (CLARK & PUNG, 1994) e similares;

- *T. cruzi* II quando forem equivalentes ao Z2 (MILES *et al.*, 1977; MILES *et al.*, 1978; BARRETT *et al.*, 1980), Zimodema A (ROMANHA *et al.*, 1979), Tipo II (ANDRADE, 1974), Linhagem 1 (SOUTO *et al.*, 1996), Grupo 2 (TIBAYRENC, 1995), Ribodema I (CLARK & PUNG, 1994) e similares;
- *T. cruzi* quando não forem previamente caracterizadas ou cuja caracterização seja inconclusiva. Assim, a designação de cepas aparentemente híbridas como o Zimodema Chileno 2b (MILES *et al.*, 1984), Zimodema 3 (MILES *et al.*, 1978), Zimodema B (ROMANHA *et al.*, 1979), Tipo I (ANDRADE, 1974), Grupo 1/2 (SOUTO *et al.*, 1996), Grupo 39 (TIBAYRENC, 1995) deverá ser decidida após estudos adicionais.

Estudos posteriores empregando extensa análise isoenzimática com 22 sistemas enzimáticos e RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), utilizando 20 primers, propuseram que as cepas de *T. cruzi* poderiam ser subdivididas em seis linhagens filogenéticas denominadas DTUs (discrete typing units) DTU 1, DTU 2 (2a, 2b, 2c, 2d e 2e) (BARNABÉ *et al.*, 2000; BRISSE *et al.*, 2000; BRISSE *et al.*, 2001). Segundo estes autores as cepas do grupo *T. cruzi* I permaneceram como uma linhagem única denominada de DTU 1, enquanto as cepas do grupo *T. cruzi* e *T. cruzi* II foram divididas em cinco sublinhagens filogenéticas (DTUs 2a-e). A DTU2b corresponde ao *T. cruzi* II (Z2 de Miles, 1978), as DTU 2a e 2c ao Zimodema 3 e, as DTUs 2d e 2e são linhagens híbridas estabelecidas após subsequente propagação clonal.

Análises da estrutura populacional do parasito baseadas nos microssatélites (pequenas seqüências de DNA com motivos de repetição de até seis nucleotídeos) de *T. cruzi* foram realizadas (OLIVEIRA *et al.*, 1998; MACEDO *et al.*, 2001). Estes marcadores de DNA por serem extremamente polimórficos em relação ao número de repetições em um dado loco e por apresentarem dispersos por todo o genoma nuclear do parasito (OLIVEIRA *et al.*, 1998; VALADARES *et al.*, 2008) apresentam-se como um excelente marcador para a reconstrução filogenética deste parasito (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Além disso, análises de microssatélites são ainda importantes para avaliar se uma determinada cepa de *T. cruzi* é monoclonal ou multiclonal (OLIVEIRA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1999; MACEDO *et al.*, 2001; MACEDO *et al.*, 2004), tendo assim maior importância na caracterização de amostras de *T. cruzi* e principalmente se isoladas de indivíduos e vetores de área endêmica que muitas vezes estão infectados por

populações multiclonais (TIBAYRENC & AYALA, 1988; MACEDO & PENA, 1998; TIBAYRENC & BRENIÈRE, 1988). Além de sua simplicidade, análises de microssatélites também apresentam boa estabilidade sob condições de laboratório e elevada sensibilidade (detecta menos do que 100 fg do DNA do parasito), sendo desta forma adequada para detectar o *T. cruzi* em amostras biológicas com baixa quantidade do parasito, tais como tecidos de pacientes cronicamente infectados e células únicas do parasito (MACEDO *et al.*, 2001; VALADARES *et al.*, 2008), dispensando assim o cultivo e manipulação do parasito em laboratório que poderiam induzir diferenças nas populações em relação ao isolado original.

Mais recentemente, variações intraespecíficas no *T. cruzi* têm sido identificadas por análises filogenéticas de suas populações. Estas têm sido realizadas utilizando vários genes que codificam proteínas e rRNA mitocondriais, localizados nos maxicírculos do kDNA (WESTENBERGER *et al.*, 2006; FREITAS *et al.*, 2006). Utilizando estes marcadores mitocondriais, FREITAS *et al.* (2006) sugeriram a existência de um terceiro grupo denominado *T. cruzi* III. Este grupo por eventos de hibridização com *T. cruzi* II teria resultado nos isolados de caráter híbrido observados atualmente. De acordo com este trabalho, a população de *T. cruzi* seria subdividida em TcI, TcII, TcIII e híbridos que correspondem às DTU(s) 2d e 2e (BRISSE *et al.*, 2000).

1.2.3 Genética do *T. cruzi* e suas implicações biológicas, epidemiológicas e clínicas

A hipótese de trabalho subjacente ao modelo clonal proposta por TIBAYRENC *et al.* (1986) e TIBAYRENC & AYALA (1988) para *T. cruzi* pressupõe que os genótipos filogeneticamente próximos ou aparentados teriam propriedades biológicas ou médicas semelhantes e que os genótipos filogeneticamente distantes apresentariam propriedades distintas. Neste sentido trabalhos de diferentes autores avaliando diversos parâmetros dos quatro genótipos ubíquos em meio de cultura acelular e celular (LAURENT *et al.*, 1997; REVOLLO *et al.*, 1998), em vetor (LANA *et al.*, 1998), em camundongos (LAURENT *et al.*, 1997; TOLEDO *et al.*, 2002; TOLEDO *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2006) confirmaram esta hipótese de trabalho. Assim, parasitos pertencentes aos genótipos 19 e 20, filogeneticamente próximos e correspondentes ao grupo *T. cruzi* I (ANONYMOUS, 1999), apresentaram maior capacidade para multiplicar e diferenciar em meios de cultura acelular, celular e vetor, maior capacidade para infectar camundongos, maior virulência para camundongos, maior resistência a

drogas (benzimidazol e nifurtimox) “in vitro” e maior resistência a drogas (benzimidazol e itraconazol) em camundongos. Por outro lado, parasitos pertencentes aos genótipos 39 (DTU2d) e 32 (DTU2b) são mais geneticamente relacionados entre si e distantes dos genótipos 19 e 20 (DTUI), apresentaram características opostas em relação a todos estes parâmetros analisados. Entretanto, diversos trabalhos demonstraram que as características biológicas, assim como a susceptibilidade a drogas podem variar quando várias amostras de um mesmo grupo genético são avaliadas (LAURENT *et al.*, 1997; TOLEDO *et al.*, 2003; TOLEDO *et al.*, 2004b; MARTINS *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2008; REVOLLO *et al.*, 1998), o que sugere a necessidade de considerar subgrupos ou subunidades menores do parasito, ou de marcadores moleculares mais discriminantes para melhor avaliar a associação entre a genética do parasito e suas características biológicas, epidemiológicas e clínicas fundamentais.

Variações geográficas na prevalência de formas clínicas e morbidade da doença de Chagas também têm sido observadas (LUQUETTI *et al.*, 1986; WHO, 1991; ANDRADE *et al.*, 1992). Sabe-se que tais diferenças podem estar relacionadas, em parte, com os aspectos genéticos e resposta imune do hospedeiro, e diversos trabalhos têm demonstrado a importância do papel da genética do parasito na determinação das características clínicas da doença de Chagas (MILES *et al.*, 1981; MONTAMAT *et al.*, 1996; MACEDO *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2004).

Diversidades nas formas clínicas e na morbidade são observadas na doença de Chagas, principalmente quando diferentes áreas geográficas são estudadas. No Brasil, a forma assintomática ou indeterminada é a mais comum (60-70%), seguida pela forma cardíaca e digestiva (20-30 e 8-10%, respectivamente), a forma mista ou cardíaco-digestiva é menos freqüente. Entretanto no Brasil Central e Chile, a forma digestiva da doença predomina, enquanto é praticamente inexistente na Venezuela e América Central (LUQUETTI *et al.*, 1986; DIAS, 1992; WHO, 2002).

Pacientes na fase crônica da doença de Chagas podem viver por um longo período de latência clínica denominado forma indeterminada que pode durar 10-30 anos ou por toda a vida (PRATA, 2001). Esta forma da doença é caracterizada pela ausência de sintomas e de alterações eletrocardiográficas e/ou radiológicas. O diagnóstico é obtido por exames sorológicos positivos ou pela detecção do parasito por xenodiagnóstico ou cultura de sangue, ou por PCR em seu eluato. Após este período, estima-se que 27% dos infectados, desenvolverão manifestações cardíacas, 6%

evoluirão para forma digestiva e 3% apresentarão comprometimento nervoso periférico (MONCAYO, 1999).

A forma cardíaca da doença de Chagas é responsável pela elevada morbimortalidade ocorrida na infecção e é a forma mais comum da doença de Chagas na fase crônica, manifestando-se como cardiomiopatia dilatada, insuficiência cardíaca congestiva, tromboembolismo, arritmias, transtornos de condução intraventricular, síncope e possibilidade de ocorrência de morte súbita (PRATA, 2001; CAROD-ARTAL, 2006). A forma digestiva da doença de Chagas caracteriza-se também por alterações de motilidade do esôfago e do cólon, e pelo aumento do diâmetro, resultando em megaesôfago e megacólon. O megaesôfago é de evolução mais precoce ocorrendo entre 10 e 40 anos de idade, já o megacólon é de evolução mais tardia, sendo observado em adultos entre 30 e 60 anos de idade (REZENDE *et al.*, 1976; LANA & TAFURI, 2000). A forma mista da infecção, caracterizada por manifestações cardíacas e digestivas simultâneas acomete aproximadamente 8% dos indivíduos que apresentam a fase crônica da doença de Chagas.

Alguns autores sugeriram que diferentes subdivisões genéticas do *T. cruzi* podem ser correlacionadas com distintas características epidemiológicas (ZINGALES *et al.*, 1998). No Brasil, cepas do grupo *T. cruzi* II são preferencialmente associadas com o ciclo doméstico e conseqüente infecção humana, e que cepas do grupo *T. cruzi* I são preferencialmente encontradas no ciclo silvestre da doença de Chagas (FERNANDES *et al.*, 1998; ZINGALES *et al.*, 1998; FERNANDES *et al.*, 1999a). Entretanto, trabalhos realizados no Chile e no Brasil, têm detectado ambos os grupos de *T. cruzi* em vetores pertencentes ao ciclo domésticos e silvestres (SOLARI *et al.*, 1998a; ZINGALES *et al.*, 1998), demonstrando que parasitos pertencentes ao *T. cruzi* I e *T. cruzi* II podem coexistir em um mesmo ambiente (ZINGALES *et al.*, 1998; BRENIÈRE *et al.*, 1998; SOLARI *et al.*, 1998; FERNANDES *et al.*, 1999a).

Cepas pertencentes ao *T. cruzi* II têm sido associadas à doença humana em países do Cone Sul da América Latina onde a doença de Chagas é endêmica (ZINGALES *et al.*, 1998, ZINGALES *et al.*, 1999; BRENIÈRE *et al.*, 1998; DI NOIA *et al.*, 2002). FREITAS *et al.*, (2005) demonstraram a presença de parasitos do grupo *T. cruzi* II em tecidos humanos (esôfago, coração e cólon) em 25 pacientes com forma cardíaca ou gastrointestinal da doença residentes em várias cidades do estado de Minas Gerais. Constata-se que a maioria dos pacientes com severos sintomas da doença de Chagas é de regiões que apresentam ciclo doméstico de parasitos pertencentes ao grupo

T. cruzi II (ZINGALES *et al.*, 1998, ZINGALES *et al.*, 1999). Por outro lado, uma baixa prevalência de pacientes sintomáticos é observada em regiões onde o *T. cruzi* circula no ambiente silvestre e onde há predomínio de parasitos pertencentes ao grupo *T. cruzi* I (MONTAMAT *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 1998; ZINGALES *et al.*, 1998, ZINGALES *et al.*, 1999; COURA *et al.*, 2002).

Entretanto, devido aos danos ambientais e conseqüente adaptação de vetores silvestres ao ambiente peridomiciliar e domiciliar (ASSIS *et al.*, 2007; AGUILAR *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2008), parasitos do grupo *T. cruzi* I têm sido também frequentemente associados à infecção humana (MILES *et al.*, 1981; FERNANDES *et al.*, 1999a; BARNABÉ *et al.*, 2000; BARNABÉ *et al.*, 2001; MOTILLA *et al.*, 2002; BOSSENO *et al.*, 2002; BARNABÉ *et al.*, 2005; TÉLLEZ-MENEZES *et al.*, 2008; FALLA *et al.*, 2009; MARCILI *et al.*, 2009) e têm sido relacionados com a ocorrência de manifestações clínicas da doença de Chagas em vários países da América Latina (COURA *et al.*, 2002; MILES *et al.*, 2003, AÑES *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2006).

É importante salientar que características biológicas e epidemiológicas são muito mais aparentes quando subdivisões menores do *T. cruzi* ou clones naturais são considerados (TIBAYRENC *et al.*, 1986; BARNABÉ *et al.*, 2000; BRISSE *et al.*, 2000; TIBAYRENC, 2003). Nesse sentido, BARNABÉ *et al.* (2000) estudando 434 estoques de *T. cruzi* isolados de diversos países da América Latina demonstraram que parasitos pertencentes ao DTU 1 são mais frequentemente encontrados no ciclo silvestre, apesar de uma grande porcentagem destes parasitos estarem associados também com o ciclo doméstico da infecção, enquanto o DTU 2 foi muito mais presente no ciclo doméstico. Entretanto, quando subdivisões menores foram consideradas o DTU2a apresentou predominância no ambiente silvestre, o DTU2b demonstrou claro predominância no ambiente doméstico e os DTUs 2c, 2d e 2e exibiram níveis intermediários de tropismo doméstico. Outros estudos epidemiológicos têm sido realizados no intuito de estabelecer tais correlações (BRISSE *et al.*, 2000; BARNABÉ *et al.*, 2000; DIOSQUE *et al.*, 2003; HIGO *et al.*, 2004; BURGOS *et al.*, 2005; ROZAS *et al.*, 2007).

Hoje, 100 anos após a descoberta do primeiro caso humano da doença de Chagas descrito por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909), ainda existem lacunas sobre a patogênese da doença e o real papel do parasito na gênese de lesões. Assim, estudos envolvendo a genética do parasito são importantes no sentido de elucidar sua correlação com as características biológicas do parasito, patogênese, evolução clínica, morbidade, e origem geográfica dos pacientes infectados. Nesse sentido, o presente trabalho realizou

a caracterização biológica e molecular de amostras de *T. cruzi*, considerando os aspectos clínicos dos pacientes dos quais foram isoladas.

1.2.4 Doença de Chagas no município de Berilo e José Gonçalves de Minas

No inquérito sorológico nacional (1975-1980) o município de Berilo (atualmente dividido em dois municípios, Berilo e José Gonçalves de Minas que se emancipou politicamente de Berilo em 1997), localizado no Vale do Jequitinhonha, apresentou uma prevalência para a infecção chagásica de 35.5% (CAMARGO *et al.*, 1984).

Em 1982, uma alta prevalência foi confirmada em um novo inquérito sorológico no qual foi detectada sorologia positiva para a doença de Chagas em 35,1% em uma amostra de 3730 indivíduos (DIAS *et al.*, 1985). Estes dados confirmaram a existência de transmissão ativa da infecção chagásica na região.

Embora o combate aos triatomíneos vetores tenha iniciado na região em 1960 pelo então DNERu, e subsequentemente pela direção da Coordenação do Desenvolvimento do Vale do Jequitinhonha (CODEVALE) e do Centro Regional de Saúde de Diamantina de forma não sistemática, entre os anos de 1985 e 1986, na primeira avaliação, realizada em 1987, foram constatadas as conseqüências benéficas destes "ataques" tendo em vista a significativa diminuição do número de triatomíneos capturados no intradomicílio.

Em 1988, AGUILLAR avaliando a população de Berilo quanto à prevalência da infecção pelo *T. cruzi*, em uma amostra de 1.150 indivíduos, constatou que 12,69% apresentavam sorologia reativa. Neste trabalho foi observado um decréscimo relevante da infecção quando comparado ao inquérito realizado em 1982.

Entre 1990 e 1991, o Programa de controle da doença de Chagas (PCDCh) não atuou neste município. Somente em 1997 a Fundação Nacional da Saúde (FNS) passou a realizar as atividades de pesquisa e borrifação continuamente, e neste mesmo ano foi iniciada a implantação da vigilância epidemiológica. Foram implantados 19 Postos de Informação de Triatomíneos (PITs), dois na zona urbana (um em Berilo e o outro no Município de José Gonçalves de Minas) e 17 na zona rural. A supervisão da vigilância ficou sob a responsabilidade da Diretoria Regional de Saúde de Diamantina.

Um novo inquérito sorológico foi realizado nestas localidades por MONTOYA (1998). Neste estudo, numa amostra de 2.261 indivíduos a prevalência de doença de Chagas detectada na população geral foi de 18,7%, ressaltando que em indivíduos acima

de 30 anos a prevalência era de 50%, enquanto que em menores de 10 anos, este percentual era de apenas 0.17%. Estes resultados demonstraram a eficácia do PCDCCh nestes municípios, que por se encontrarem em fase de vigilância epidemiológica deveriam ser acompanhados e avaliados com regularidade através da realização de inquéritos sorológicos para doença de Chagas (DCh), como proposto pela Fundação Nacional de Saúde.

Recentemente, BORGES *et al.* (2006) realizaram nestes municípios um inquérito sorológico em escolares de 7-15 anos. Neste estudo foi constatada uma prevalência de 0,4% para a infecção chagásica em um total de 1412 crianças avaliadas. A prevalência por município foi de 0,35% (3 crianças) em Berilo, e 0,53% (3 crianças) em José Gonçalves de Minas. Este achado está em concordância com os últimos inquéritos realizados nestes municípios e demonstra a importância de se manter uma vigilância epidemiológica atuante e eficaz na região.

Neste mesmo ano, nossa equipe realizou uma pesquisa triatomínica integral no município de Berilo, vistoriando todos os domicílios rurais e urbanos. A pesquisa resultou na captura de 391 insetos, pertencentes às espécies *P. megistus* (72,0%) e *T. pseudomaculata* (28,0%). Nenhum deles apresentava infecção pelo *T. cruzi*. O peridomicílio (galinheiro) foi o principal local das capturas.

Ainda neste estudo, a infecção pelo *T. cruzi* foi detectada em 31 indivíduos (25,0%) que residiam em locais onde foram encontrados vetores intradomiciliares. Destes, 97,0% era maior de 30 anos indicando que estes tenham sido infectados antes da instalação da vigilância epidemiológica, período no qual a transmissão vetorial era presente (ASSIS *et al.*, 2007).

Desta forma, estudos realizados nesta região demonstram a eficácia da vigilância epidemiológica e uma conseqüente diminuição da prevalência da doença de Chagas entre crianças, conforme demonstrado por inquéritos sorológicos (MONTROYA *et al.*, 2003; BORGES *et al.*, 2006).

Assim, no intuito de complementar os estudos da doença de Chagas que vêm sendo desenvolvidos nos dois municípios, torna-se fundamental a investigação das características biológicas e genéticas dos parasitos circulantes nestas áreas, sendo estes os objetivos do presente trabalho. Desta forma, será possível visualizar a doença de uma maneira global, já que aspectos envolvendo a epidemiologia, clínica, evolução da doença, biologia e genética dos parasitos circulantes nestas regiões serão elucidados.

1.3 Justificativa

Considerando a influência de características genéticas das populações de *T. cruzi* em suas propriedades biológicas, epidemiológicas, clínicas e na resposta terapêutica, o presente trabalho se justifica no sentido de caracterizar a morfologia, biologia e a genética de amostras de *T. cruzi* isoladas de escolares e de suas mães residentes em Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, (BORGES *et al.*, 2006). Um melhor conhecimento da genética e biologia dos parasitos circulantes na região em estudo, contribuirá para elucidar o real papel das sublinhagens de *T. cruzi* na morbidade dos pacientes chagásicos e será importante no sentido de orientar a equipe que trabalha na região em relação ao manejo clínico e conduta terapêutica a ser adotada em uma das mais importantes zonas endêmicas da doença no nosso país.

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a morfologia, biologia e a genética de amostras de *T. cruzi* isoladas de crianças soropositivas detectadas no inquérito sorológico para doença de Chagas realizado em Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG (BORGES *et al.*, 2006).

3.2 Objetivos específicos

3.2.1) Avaliar os aspectos clínicos das crianças e mães das quais os parasitos foram isolados;

3.2.2) Avaliar a biologia e a morfologia das amostras de *T. cruzi* isoladas das crianças em infecções em camundongos Swiss e ao longo das passagens sucessivas nestes animais;

3.2.3) Caracterizar as amostras de *T. cruzi* isoladas das crianças e de suas mães, analisando o perfil de isoenzimas, do rDNA 24 S α , do gene mitocondrial da Citocromo Oxidase II (COII) e de microssatélites.

3.2.4) Correlacionar os aspectos clínicos dos pacientes com a morfobiologia e a genética dos parasitos;

4.0 Casuística, Material e Métodos

4.1 Amostras de *Trypanosoma cruzi* e casuística

As amostras de *T. cruzi* aqui estudadas foram isoladas de crianças, entre sete e 15 anos de idade, nascidas e residentes nos municípios de Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG e também de quatro de suas mães.

As crianças apresentaram diagnóstico positivo para a doença de Chagas em um inquérito sorológico realizado por nossa equipe em escolares nessa região (BORGES *et al.*, 2006). Posteriormente, as mães das seis crianças soropositivas foram também apresentaram diagnóstico positivo para a doença de Chagas em uma pesquisa sorológica realizada em seus familiares.

A inclusão desses pacientes no estudo se deu mediante leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) da FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Processo N° 007/2002.

Uma vez confirmado o diagnóstico e o Termo de Consentimento assinado, amostras de sangue dessas crianças e de suas respectivas mães foram coletadas e, quando possível, os parasitos foram isolados por hemocultura em meio LIT - Liver Infusion Tryptose, segundo a metodologia de CHIARI *et al.*, 1989. Após a positivação da hemocultura, os parasitos foram mantidos em crescimento exponencial à 28°C. Essas amostras foram criopreservadas em nitrogênio líquido (-196° C) e o sedimento do parasito foi também obtido para a caracterização molecular do *T.cruzi*.

Desta maneira, foi possível isolar amostras de *T. cruzi* de seis crianças (855, 806, 829, 795, 817 e 1661) e de quatro de suas mães (2337, 2339, 103, 1663). Não foi possível isolar parasitos das mães das crianças 806 e 1661. Conseqüentemente foi possível parrear quatro filhos com suas mães: amostras 855/2337; 829/2339, 795/103 e 817/1663 (**Tabela I**).

Tabela I - Amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de escolares chagásicos e de suas respectivas mães residentes em Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil, e dados demográficos dos pacientes.

Paciente (amostra de <i>T. cruzi</i>)	Pacientes	Idade (anos)	Sexo	Município	Hemocultura
MJS (855)	Criança	13	Masc.	JGM	Pos
MASS (2337)	Mãe		Fem.	JGM	Pos
NGR (817)	Criança	9	Masc.	Berilo	Pos
LGR (1663)	Mãe		Fem.	Berilo	Pos
EAF(795)	Criança	13	Fem.	Berilo	Pos
MMAF (103)	Mãe		Fem.	Berilo	Pos
EAP (829)	Criança	12	Masc.	Berilo	Pos
NAP (2339)	Mãe		Fem.	Berilo	Pos
MPS (1661)	Criança	15	Fem.	JGM	Pos
MDPS (2336)	Mãe		Fem.	JGM	NR
RBR (806)	Criança	11	Masc.	JGM	Pos
JRB (1662)	Mãe		Fem.	JGM	NR

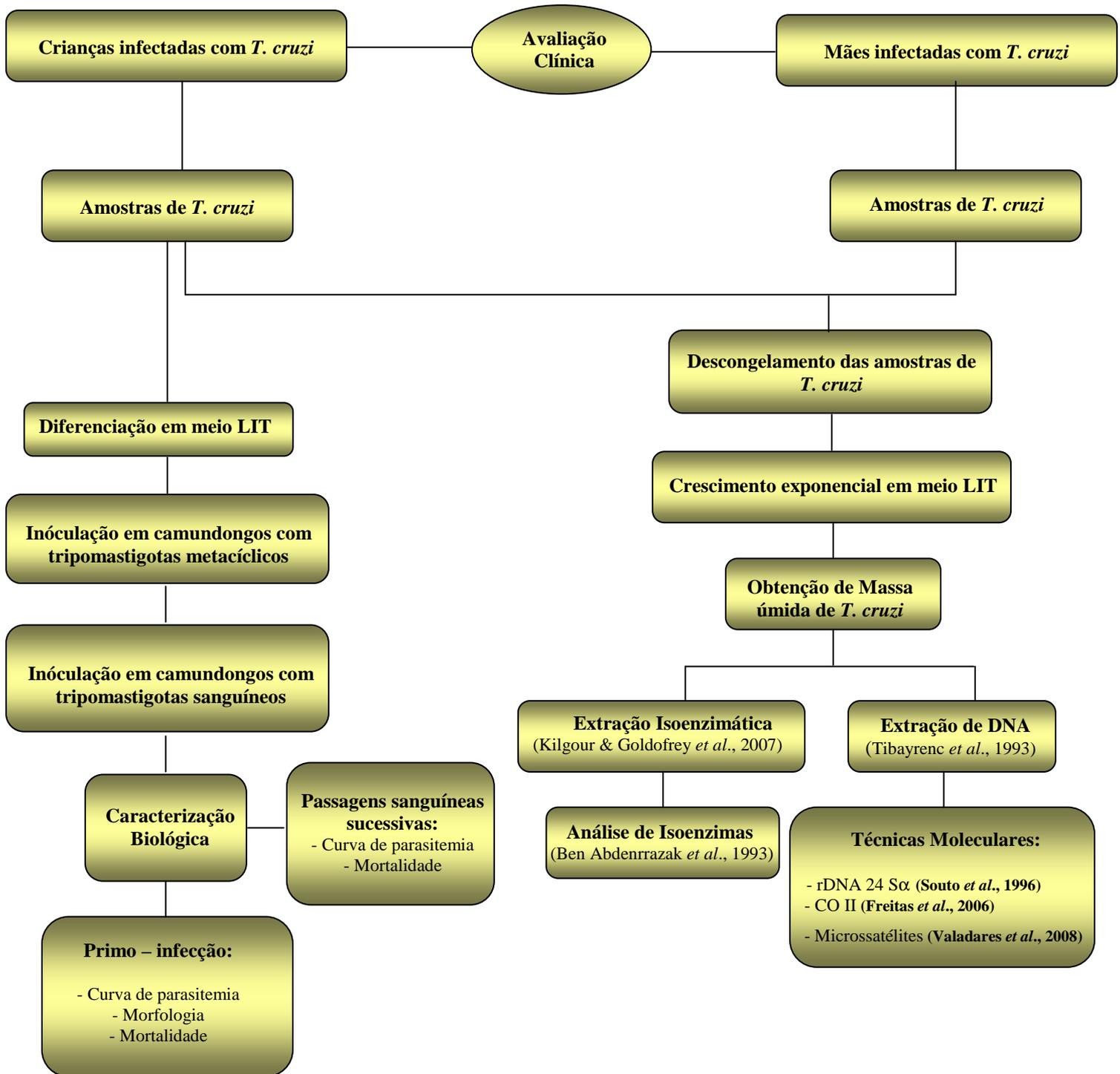
Nota: JGM = José Gonçalves de Minas

Pos: Positivo

NR = Não realizado

Para as infecções experimentais em camundongos, as amostras de *T. cruzi* inicialmente criopreservadas foram descongeladas, cultivadas em meio LIT e os tripomastigotas metacíclicos obtidos destas culturas, inoculados em camundongos Swiss, de 15-18 dias de idade. Tripomastigotas sanguíneos isolados destes animais durante a fase aguda da infecção foram utilizados para nova inoculação e caracterização biológica das amostras de *T. cruzi* neste modelo animal como apresentado no **Delineamento Experimental** apresentado a seguir.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



4.2 Avaliação clínica dos pacientes

As crianças e quatro de suas mães foram clinicamente avaliadas mediante anamnese, exame físico, eletrocardiograma (ECG) convencional, raio X de tórax e esôfago contrastado. As avaliações clínicas foram realizadas pela equipe médica do Projeto de Doença de Chagas desenvolvido por nossa equipe na região.

O eletrocardiograma foi realizado em repouso com o registro das doze derivações clássicas e interpretado de acordo com os critérios da New York Heart Association (NYHA, 1973).

Na classificação clínica dos pacientes foram adotados os critérios do Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2005) para a detecção de acometimento cardíaco e classificação do paciente chagásico de acordo com a gravidade da doença.

4.3 Infecções Experimentais

Nas infecções experimentais com as amostras de *T. cruzi* isoladas das crianças foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, de 28-30 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Para cada amostra, grupos de oito animais foram inoculados por via intraperitoneal com 10.000 tripomastigotas sanguíneos/animal quantificados segundo BRENER (1962).

4.3.1 Caracterização biológica das amostras de *T. cruzi* isoladas das crianças na primeira passagem sanguínea em camundongos Swiss

4.3.1.1 Parâmetros Avaliados

4.3.1.1.1 Infectividade (INF)

A infectividade foi avaliada pela positividade do exame a fresco do sangue periférico dos camundongos e realização de hemocultura quando necessária. A pesquisa de tripomastigotas sanguíneos foi realizada entre o 4º e 30º dia após a inoculação (d.a.i.) pelo exame microscópico de sangue a fresco, coletado da veia caudal do animal.

Camundongos que não apresentaram o exame de sangue a fresco positivo até o 30º dia após a inoculação (d.a.i.) foram submetidos à hemocultura, realizada segundo FILARDI & BRENER (1987). 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 15mL contendo 3mL de LIT (CAMARGO, 1964). Os tubos foram incubados à 28°C, homogeneizados a cada 48h e uma gota do sedimento analisada ao microscópio óptico em objetiva de 40x, a cada 30 dias até o 120º dia após cultivo.

Considerando estes dois parâmetros, a infectividade foi expressa em percentagem cumulativa de animais que apresentaram parasitos no sangue periférico.

4. 3.1.1.2 Parasitemia (PAR)

A contagem da parasitemia pelo exame a fresco do sangue periférico permitiu avaliar a curva de parasitemia dos animais ao longo da fase aguda da infecção e foi realizada de acordo com a metodologia de BRENER (1962).

A contagem dos parasitos teve início no 4º dia após a inoculação e foi avaliada em dias alternados, até que não fosse observado mais parasitos no exame de sangue a fresco por cinco dias consecutivos, ou até a morte dos camundongos.

Infecções de camundongos por cepa de baixa virulência foram acompanhadas pelo menos até o 30º d.a.i. quando então foi realizada a hemocultura. As curvas de parasitemia representam as médias diárias dos parasitos observados no sangue periférico dos camundongos de cada grupo experimental e sua avaliação permitiu determinar os seguintes parâmetros:

4. 3.1.1.3 Período Pré-patente (PPP)

O PPP correspondente ao período compreendido entre a inoculação e o dia anterior ao primeiro dia em que foi detectado parasito no sangue periférico do animal através do exame a fresco. O resultado foi expresso em dias.

4. 3.1.1.4 Período Patente (PP)

O PP correspondente ao período compreendido entre o primeiro e o último dia de exame a fresco positivo e foi expresso em dias.

4.3.1.1.5 Pico Máximo de Parasitemia (PMP)

O PMP corresponde ao máximo de parasitemia e foi expresso em número de tripomastigotas sanguíneos/0.1mL de sangue, detectado pelo exame de sangue a fresco segundo a metodologia de BRENER (1962).

4.3.1.1.6 Dia do Pico Máximo (DPMP)

O DPMP corresponde ao dia de ocorrência do máximo de parasitemia e foi expresso em dias.

4.3.1.1.7 Mortalidade (MOR)

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

4.3.1.1.8 Passagens sucessivas dos parasitos em camundongos Swiss

As cepas de *T.cruzi* isoladas das crianças foram também submetidas à passagens sucessivas em camundongos Swiss, fêmeas, nas mesmas condições anteriores, com o objetivo de verificar o seu comportamento biológico ao longo do tempo de manutenção nestes animais. Os repiques foram realizados nos dias em que a parasitemia era máxima para cada cepa avaliada. Desta forma, os parasitos foram inoculados, entre uma passagem e outra, no mesmo intervalo de tempo. Nova curva de parasitemia de cada cepa foi realizada após cinco passagens sucessivas com a finalidade de comparar com as obtidas na primeira passagem sanguínea.

4.3.1.1.9 Caracterização morfológica dos parasitos no sangue periférico

O estudo da morfologia das formas tripomastigotas sanguíneas foi realizado por meio do exame microscópico do sangue a fresco de um camundongo/experimento nos dias em que a parasitemia apresentava-se mais elevada. Para tal, foi realizada a coleta de 3µl de sangue da veia caudal do animal. Uma preparação delgada entre lâmina e lamínula deste material foi examinada em microscopia óptica (400X), sendo contadas aleatoriamente 100 formas tripomastigotas. Os parasitos foram classificados como forma fina, intermediária e larga (BRENER & CHIARI, 1963), conforme verificado na **Figura 1**.

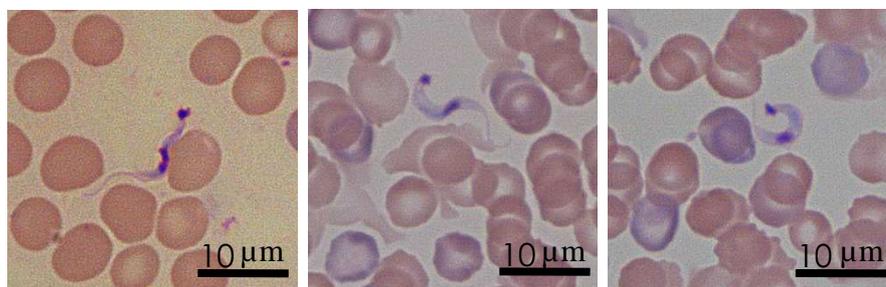


Figura 1 - Polimorfismo dos tripomastigotas sanguíneos. A: forma fina; B: forma intermediária; C: forma larga.

4.4 Caracterização bioquímica e molecular das amostras de *T.cruzi*

Para a caracterização bioquímica e molecular do *T.cruzi*, foi utilizada a massa úmida de parasitos obtida conforme descrito no item 4.1, quarto parágrafo.

4.4.1 Caracterização Isoenzimática

4.4.1.1 Obtenção do extrato celular e caracterização isoenzimática

A massa úmida de parasitos foi submetida à extração enzimática segundo GODFREY & KILGOUR (1976). Para obtenção do extrato enzimático, a massa úmida de parasitos foi descongelada em banho de gelo e submetida à lise osmótica em estabilizador enzimático (Ditiotreitol - 2,0mM, ácido ϵ -amino capróico - 2,0mM, EDTA, 2,0mM, pH 7,0) na proporção de 1:1 (p/v=mg/µL) da solução. O lisado permaneceu por 20 minutos no gelo e em seguida foi centrifugado a 4000rpm, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante contendo o extrato enzimático foi alíquotado e

armazenado a -70°C até o momento da realização da eletroforese de isoenzimas. O sedimento foi também conservado a -70°C para posterior obtenção de DNA total utilizado posteriormente na caracterização molecular.

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 embebidas por 20 minutos em tampão de eletroforese específico para cada sistema enzimático estudado. As enzimas foram depositadas sobre a superfície da membrana de celulose com auxílio de um aplicador (Helena, Texas, EUA), concentradas ou diluídas, dependendo do sistema enzimático considerado. As membranas foram colocadas entre os eletrodos, e fitas de papel de filtro foram utilizadas para fazer a ponte entre a membrana e o tampão de migração contido nos compartimentos da cuba eletroforética. As condições da eletroforese e os reagentes usados na reação encontram-se descritos na **Tabela II**.

Todas as enzimas analisadas apresentam migração anódica. Após a eletroforese, as bandas protéicas foram visualizadas após as reações bioquímicas específicas, utilizando a mistura reacional contendo 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 e analisadas no programa Photocapt. Foram estudados, cinco sistemas enzimáticos: 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]; glutamato desidrogenase NAD^+ (GDH1) [E.C. 1.4.1.2 – GDH- NAD^+] e glutamato desidrogenase NADP^+ (GDH2) [E.C. 1.4.1.4 – GDH- NADP^+] (**Tabela II**).

Tabela II - 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
Extrato: concentrado Tampão de embebeção: ShawIII* (1:4) ¹ Tampão de migração: Shaw III Voltagem: 200V Tempo: 25 minutos *Mistura reacional: 5,0mg de frutose 6-fosfato 4,6U de G-6-P DH MgCl ₂ 15Mm 5,0mg de NADP 3,0mg de MTT 2,5mg de PMS Temperatura ambiente Tris-HCl 0,2M, pH 7		Extrato: concentrado Tampão de embebeção: 30mL ShawIII Tampão de migração: Shaw III Voltagem: 200V Tempo: 20 minutos *Mistura reacional: 10mg de ácido isocítico DL MgCl ₂ 15Mm 5,0mg de NADP 3,0mg de MTT 2,5mg de PMS Temperatura ambiente Tris-HCl 0,1M, pH 8	
Glicose-6-fosfato-1-desidrogenase EC.1.1.1.49	G6PD	Glutamato desidrogenase EC.1.4.1.3	GDH
Extrato: concentrado Tampão de embebeção: HR Tampão de migração: HR Voltagem: 200V Tempo: 20 minutos *Mistura reacional: 10mg de D-glicose-6-P MgCl ₂ 15Mm 5,0mg de NADP 3,0mg de MTT 2,5mg de PMS Temperatura ambiente Tampão Tris-HCl pH 7 0,2M		Extrato: concentrado Tampão de embebeção: ShawIII* (1:1) Tampão de migração: ShawIII Voltagem: 160V Tempo: 30 minutos *Mistura reacional: 170mg de ácido glutâmico L 5,0mg de NADP 3,0mg de MTT 2,5mg de PMS Temperatura ambiente Tampão Tris-HCl pH 8 0,1M	

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-{4,5-Dimetiltiazol-2-1}-2,5Difeniltetrazolium. PMS: sulfato de fenazina. ¹: tampão diluído em água (v/v).

4.4.2 Caracterização molecular

4.4.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA TIBAYRENC *et al.* (1993) foi realizada a partir do sedimento obtido após a extração isoenzimática, conforme descrito no item 4.3.1.1. O DNA foi extraído em três etapas:

a) lise e digestão celular: o sedimento foi diluído em 200µl de tampão de lise TE (pH 8,0 Tris-HCl 10mM, EDTA 10mM), com adição de 10µl SDS 10% e 5µl de Proteinase K (20mg/mL) na proporção de 100µg/mL e incubado por 12 horas, a 55°C, em banho-maria;

b) desproteinização: foram realizadas duas extrações fenólicas. O fenol foi adicionado (v/v) e homogeneizado por 5 minutos, sendo em seguida centrifugado a 10.000rpm, por 7 minutos, a 4°C, com recuperação da fase aquosa. A seguir, no sedimento da primeira extração, foram realizadas duas extrações com clorofórmio e álcool isoamílico. O sedimento foi homogeneizado por 5 minutos e centrifugado a 10.000rpm, por 7 minutos, a 4°C, sendo a fase aquosa recuperada.

c) para a precipitação do DNA, foi adicionada à fase aquosa, uma solução de acetato de sódio 3M, na proporção 1/10, e 2,5X de etanol absoluto gelado. A seguir, os tubos foram mantidos por duas horas a -70°C, centrifugados a 10.000rpm, por 15 minutos, a 4°C. O DNA extraído foi lavado duas vezes com 500µl de etanol 70 gelado e centrifugado a 10.000rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente o DNA foi re-suspendido em 100µl de água milli-Q estéril e estocado a -20°C.

A concentração de DNA nas amostras foi quantificada em espectrofotômetro a 260nm e o grau de pureza das amostras determinado pela relação das absorbâncias a 260/280nm.

4.4.2.1.1 Caracterização pela amplificação da região 3' do gene rDNA 24 Sα

Para a tipagem do rDNA 24Sα, o DNA das amostras de *T. cruzi* foi submetido a uma PCR numa mistura de 10mM Tris-HCl pH 9,0, 50mM KCl, 0,1% Triton X-100 (Buffer B, Promega), 3,5mM MgCl₂ (Promega), 0,625U *Taq* DNA Polimerase (Phoneutria), 200µM de cada dNTP, 0,25µM de cada iniciador, D71 (5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG - 3') e D72 (5'- TTTTCAGAATGGCCGAACAGT

– 3'), 3µl de DNA a 1ng/µl e quantidade de H₂O Milli-Q estéril suficiente para 12,5µL. Os ciclos de amplificação consistiram de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos contendo um passo de desnaturação por 30 segundos, um passo de anelamento a 60°C por 30 segundos e um passo de extensão a 72°C por 30 segundos (SOUTO *et al.*, 1996). Após esta etapa uma alíquota de 5µL dos produtos da PCR foi analisada em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata para a visualização dos produtos amplificados. Como controles das amplificações foram utilizados DNA de clones que representam as linhagens de *T. cruzi* I (Col1.7G2, rDNA tipo 2 – 110pb), *T. cruzi* II (JG, rDNA tipo 1- 125pb) e cepas híbridas (SO3 cl5, rDNA tipo ½- 110/125pb).

4.4.2.1.2 Caracterização pela PCR do gene Mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade II (CO II)

Para a amplificação da região gênica que compreende a subunidade II da enzima mitoncondrial citocromo oxidase (COII), o DNA das amostras de *T. cruzi* foi submetido a uma PCR composta de 10mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl, 0,1% Triton X-100, 1,5mM MgCl₂ (Buffer IB, Phoneutria, MG, Brasil), 1U *Taq* DNA Polimerase (Platinum, Invitrogen), 250µM de cada dNTP, 0,3µM dos iniciadores TcMit10 (5'-CCATATATTGTTGCATTATT-3') e TcMit21 (5'-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3'), 3 µL de DNA a 1ng/µL e quantidade de H₂O Milli-Q estéril suficiente para 15µL.

Os ciclos de amplificação da PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos contendo um passo de desnaturação a 94°C por 45 segundos, um anelamento a 45°C por 45 segundos e uma extensão dos iniciadores a 72°C por 1 minuto. Os produtos amplificados foram revelados em gel de agarose 2%. Posteriormente, 10µL da PCR foram submetidos à digestão empregando-se a enzima de restrição *AluI* (Promega), durante 16 horas. Os fragmentos gerados foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata.

Como padrão de comparação dos RFLP (restriction fragment length polymorphism) foi utilizado DNA de cepas e clones característicos das linhagens de *T. cruzi* I (Col.17G2-Haplótipo A), *T. cruzi* II (JG-Haplótipo C). Como padrão para o haplótipo B característico de *T. cruzi* III e das cepas híbridas, foi utilizado o clone híbrido CL Brener (FREITAS *et al.*, 2006).

4.4.2.1.3 Caracterização pela PCR de Microssatélites

O DNA das cepas de *T. cruzi* foi submetido a ensaios de PCR com *loci* de microssatélites compostos por repetições de tri (TAC15, TAT, AAT, ATT14) e tetranucleotídeos (AAAT) (Tabela III).

Tabela III - Sequências dos iniciadores de microssatélites utilizadas na caracterização molecular de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de crianças e de suas mães habitantes dos municípios de Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG.

Iniciador	Seqüência
TcAAT8-direto	5'-FluoresceínaACCTCATCGGTGTGCATGTC-3'
TcAAT8-reverso	5'-TATTGTCGCCGTGCAATTC-3'
TcATT14-direto	5'-FluoresceínaTTATGGATGGGGTGGGTTTG-3'
TcATT14-reverso	5'-AGCAATAATCGTATTACGGC-3'
TcTAC15-direto	5'-FluoresceínaGAATTTCCCATTTCCAAGC-3'
TcTAC15-reverso	5'-CGATGAGCAACAATCGCTTC-3'
TcTAT20-direto	5'-FluoresceínaGATCCTTGAGCAGCCACCAA-3'
TcTAT20-reverso	5'-CAAATTCCTAACGCAGCAGC-3'
TcAAAT6-direto	5'-FluoresceínaGCCGTGTCCTAAAGAGCAAG-3'
TcAAAT6-reverso	5'-GGTTTTAGGGCCTTTAGGTG-3'

Cada reação de PCR foi realizada em um volume total de 15µL contendo 10mM Tris-HCl/pH 9,0, 50mM KCl, 0,1 % Triton X-100 (Tampão B, Promega, Madison, WI, EUA), 2,5mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI, EUA), 0,5U Taq DNA Polimerase (Promega, Madison, WI, EUA), 250µM de cada dNTP (Sigma, Sto. Louis, MO, EUA), 0,3µM de cada iniciador, o direto (marcado com fluoresceína na sua extremidade 5') e o reverso (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e 3µL da solução de DNA a 1ng/µL recobertos com óleo mineral para evitar evaporação. As amplificações foram realizadas em termociclador, MJ Research, modelo PT100 (MJ Research, Inc., Ramsey, MA, EUA), utilizando o programa "stepdown" (Hercker & Roux, 1996) modificado para a amplificação de DNA do *T. cruzi*: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e desnaturação a 94°C por 30 segundos. A cada cinco ciclos a temperatura de anelamento foi diminuída progressivamente para 55, 53, 51 e 48°C. A esta última temperatura o número de ciclos foi aumentado para 15, seguidos por uma extensão final dos iniciadores a 72°C por 10

minutos. Os produtos amplificados foram visualizados após a eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo.

4.4.2.1.3.1 Determinação do Tamanho dos Alelos de Microsatélites

Para a determinação do tamanho dos alelos dos microsatélites, uma alíquota de 1 a 3 μ L do produto da PCR foi desnaturada a 90°C por 3 minutos e depois, submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante (8M uréia) no seqüenciador automático de DNA A.L.F (*Automatic Laser Fluorescent*) (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA). A corrida foi feita por 10 horas, a 45°C. Como padrão externo das corridas eletroforéticas, foram utilizadas escadas alélicas contendo uma mistura de fragmentos fluorescentes de pesos moleculares variando de 50 em 50pb (GE Healthcare), na concentração de 5fmol/fragmento. Para cada canaleta aplicada, incluindo aquelas contendo os padrões externos, foram acrescentados fragmentos fluorescentes de tamanhos conhecidos (75, 155, 210 e 320pb), os quais foram utilizados como padrões internos nas corridas.

Os resultados obtidos em forma de cromatogramas foram analisados com o auxílio do programa Allelelocator versão 1.03 (GE Healthcare). Os fragmentos de tamanhos conhecidos, presentes nos padrões externo e interno da corrida, foram corretamente alinhados e os tamanhos dos alelos para os loci de microsatélites foram calculados para cada amostra.

4.5 Análise de dados

Os dados foram analisados empregando o programa Prisma 4 for Windows, versão 4.0. Uma vez que os parâmetros PPP, PP, PM, DPMP e área sob a curva de parasitemia das amostras de *T. cruzi* não apresentaram distribuição normal e que a variância, na maioria das vezes, não foi homogênea, para a análise estatística foi adotado o teste não-paramétrico Mann-Whitney (MN), segundo CONARES (1980). Para a análise da área sob a curva de parasitemia das amostras que apresentaram distribuição normal foi realizado o teste ANOVA. A análise do parâmetro mortalidade foi realizada pelo teste Chi-quadrado.

As diferenças foram consideradas significativas quando o nível P de significância foi menor ou igual a 0,05, adotando o intervalo de confiança de 95%.

5.0 Resultados

5.1 Aspectos Clínicos das Crianças e mães

Todas as crianças apresentaram exames físicos e radiológicos normais, além de não apresentarem sintomas relacionados com a doença de Chagas. O traçado eletrocardiográfico revelou-se normal em cinco indivíduos e alterado em apenas um (806). Neste paciente foi observado um prolongamento do intervalo Pr (0,22s) e bloqueio AV de primeiro grau, apresentando, portanto a forma cardíaca leve ou discreta da doença, diferentemente das demais crianças que apresentaram a forma indeterminada da doença (**Tabela IV**).

As quatro mães, até então avaliadas, apresentam a forma cardíaca da doença de Chagas com diferentes níveis de alteração.

Tabela IV - Dados clínicos e forma clínica dos escolares residentes em Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil.

Paciente (amostra de <i>T. cruzi</i>)	Sintomas	ECG	Raio-X	Exame físico	Forma clínica
MJS (855)	Ausentes	Normal	Normal	Normal	Indeterminada
NGR (817)	Ausentes	Normal	Normal	Normal	Indeterminada
EAF (795)	Ausentes	Normal	Normal	Normal	Indeterminada
EAP (829)	Ausentes	Normal	Normal	Normal	Indeterminada
MPS (1661)	Ausentes	Normal	Normal	Normal	Indeterminada
RBR (806)	Ausentes	Prolongamento iPr e bloqueio AV	Normal	Normal	Cardíaca leve

iPr- intervalo Pr

Bloqueio AV - bloqueio átrio-ventricular

5.2 Caracterização biológica das amostras de *T. cruzi* isoladas das crianças

5.2.1 Parâmetros avaliados na primeira passagem sanguínea

5.2.1.1 Infectividade (INF)

A taxa de infectividade (INF) observada nos camundongos Swiss infectados com as amostras de *T. cruzi* isoladas das seis crianças (829, 795, 855, 817, 806 e 1661) foi de 100%. Todos os animais apresentaram exame de sangue a fresco positivo, exceto um camundongo inoculado com a amostra 829 no qual foi necessária a realização da hemocultura para a confirmação da infecção. Não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras de *T. cruzi* na análise deste parâmetro.

5.2.1.2 Parasitemia (PAR)

Foram observadas diferenças significativas em 60% (9/15) das comparações das áreas sob a curva de parasitemia das diferentes amostras de *T. cruzi*. As curvas de parasitemia obtidas em camundongos Swiss inoculados com as seis amostras de *T. cruzi* isoladas das crianças estão representadas na **Figura 2**.

As amostras 806 e 1661 apresentaram maior número de parasitos no sangue periférico durante o período patente, não sendo encontrada diferença significativa entre elas. Também não foram detectadas diferenças significativas quando os seguintes pares de amostras foram comparados: 795 x 855; 795 x 817; 855 x 817, 829 x 855 e 829 x 817.

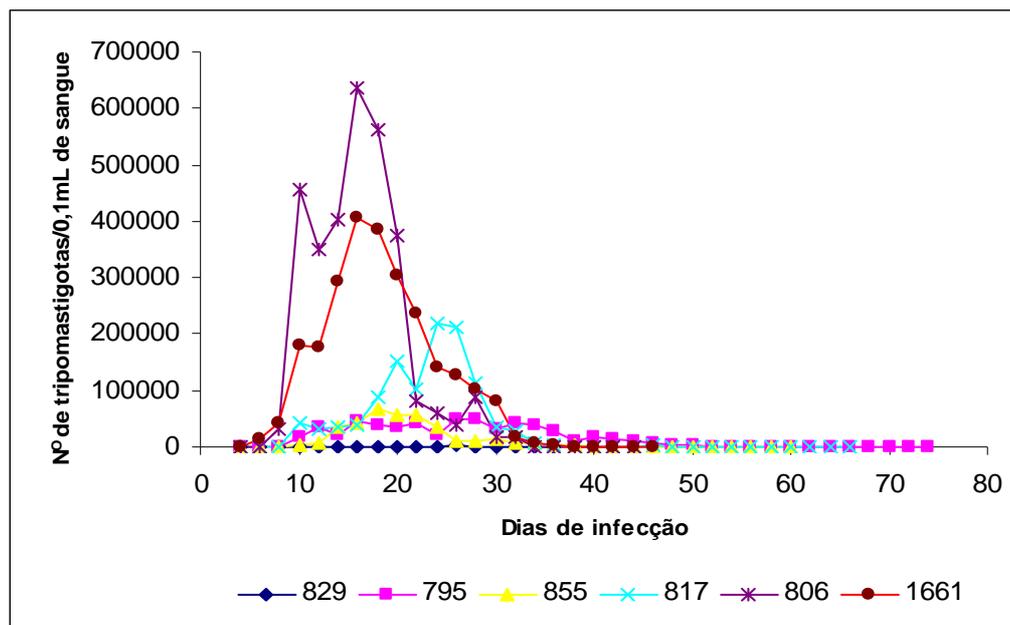


Figura 2 - Curvas de parasitemia observadas em camundongos Swiss inoculados com 10.000 tripomastigotas sanguíneas das amostras de *Trypanosoma cruzi* (829, 795, 855, 817, 806 e 1661) isoladas de crianças dos municípios de Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil.

5.2.1.3 Período pré-patente (PPP)

O PPP médio foi o parâmetro que apresentou maior número (12/15 = 80%) de diferenças significativas ($P \leq 0,05$), sendo estas observadas em 80% das comparações. O PPP das amostras de *T. cruzi* variou de $4,2 \pm 0,70$ a $13,7 \pm 8,71$ dias após a infecção. A amostra 1661 apresentou PPP médio de $4,2 \pm 0,70$ dias; para a 806 este foi de 6,0 dias, para a 829 foi de $13,7 \pm 8,71$ dias, para a 795 foi de $9 \pm 1,85$, para 855 foi $9,7 \pm 1,66$ e para a amostra 817 foi de 8,0 dias.

A **Tabela V** representa as médias dos valores obtidos na avaliação do PPP de todas as amostras avaliadas. A amostra 829 apresentou maior média ($13,7 \pm 8,71$ dias) e a amostra 1.661 a menor média de PPP ($4,2 \pm 0,70$ dias). Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) quando os pares de amostras 795 x 817; 795 x 855 e 1661 x 829 foram analisados.

Tabela V – Parâmetros biológicos avaliados em camundongos Swiss inoculados com amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de crianças dos municípios de Berilo e José Gonçalves de Minas, MG, Brasil.

Amostra	PPP	PP	PMP x 10 ³	DPMP
817	8 ± 0	26,25 ± 8,90	238,2 ± 239,33	23,5 ± 2,32
829	13,7 ± 8,71	3,3 ± 3,06	5,5 ± 4,10	18 ± 11,46
795	9 ± 1,85	34,5 ± 9,95	68,6 ± 48,58	21,5 ± 6,90
855	9,7 ± 1,66	21,5 ± 10,62	98,1 ± 89,74	18,2 ± 2,25
806	6 ± 0	20,2 ± 5,06	840,9 ± 1030,78	15,75 ± 6,08
1661	4,2 ± 0,70	27,2 ± 3,37	471,7 ± 273,67	17,7 ± 2,25

PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPMP = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão.

5.2.1.4 Período patente (PP)

Foram observadas diferenças significativas em 60% (9/15) das comparações dos períodos patentes das diferentes amostras de *T. cruzi*. O PP das amostras variou de 3,3 ± 3,06 a 34,5 ± 9,95. O PP foi de 34,5 ± 9,95; 26,25 ± 8,90; 21,5 ± 10,62; 27,2 ± 3,37; 20,2 ± 5,06 e 3,3 ± 3,06 dias nos animais infectados com as amostras 795, 817, 855, 1661, 806 e 829, respectivamente. A amostra 829 apresentou menor média de PP (3,3 ± 3,06) e a amostra 795 a maior média de PP (34,5 ± 9,95 dias), conforme verificado na **Tabela V**. Não foram observadas diferenças significativas (P>0,05) quando os pares das amostras 806 x 817; 806x 855; 817 x 855; 1661 x 795; 1661 x 817 e 1661 x 855 foram analisados.

5.2.1.5 Pico Máximo de Parasitemia (PMP) e Dia do Pico Máximo (DPMP)

Nos camundongos infectados com a amostra 829 foi observado PMP de 5,5 ± 4,10 x 10³ tripomastigotas/0,1mL de sangue no 18^o ± 11,46 dia de infecção. Os animais infectados com a amostra 795 apresentaram PMP de 68,6 ± 48,58 x 10³ tripomastigotas/0,1mL no 21,5^o ± 6,90 dia de infecção. Já os camundongos infectados com a amostra 855, o PMP foi de 98,1 ± 89,74 x 10³ tripomastigotas/0,1mL de sangue no 18,2^o ± 2,25 dia de infecção. Para a amostra 817 o PMP foi de 238,2 ± 239,33 x 10³ tripomastigotas/0,1mL de sangue no 23,5^o ± 2,32 dia de infecção; para a amostra 1661 o PMP foi de 471,7 ± 273,67 x 10³ tripomastigotas/0,1mL de sangue no 17,7^o ± 2,25 dia

de infecção, e para a amostra 806 o PMP foi de $840,9 \pm 1030,78 \times 10^3$ tripomastigotas/0,1mL de sangue no $15,75^\circ \pm 6,08$ dia de infecção. As médias do PMP e DPMP estão demonstradas na **Tabela V**.

Na análise do parâmetro PMP foram encontradas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) em 66,6% (10/15) das comparações. Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) quando as amostras 795 x 817; 795 x 855; 817 x 855; 1661 x 817 e 806 x 1661 foram comparadas.

Na análise do parâmetro DPMP foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) em 46,6% (7/15) das comparações, sendo estas detectadas quando os seguintes pares de amostras foram analisados: 806 x 817; 806 x 829; 817x 829; 817x 855; 829 x 855; 1661 x 817 e 795 x 829.

5.2.1.6 Mortalidade (MOR)

Para a maioria dos grupos de camundongos inoculados com as diferentes amostras do *T. cruzi* não foi detectada mortalidade, exceto para a amostra 806 que apresentou uma taxa de mortalidade de 62,5%, significativamente diferente das demais amostras.

5.2.1.7 Caracterização morfológica dos parasitos no sangue periférico

Para todas as amostras de *T. cruzi* avaliadas foi demonstrada uma predominância de formas intermediárias e largas durante todo o PP, exceto para a amostra 806 na qual foi verificada predominância de formas delgadas no início da infecção, posteriormente substituídas por formas intermediárias e largas ao longo do período de observação. Nas **Figuras 3 e 4** estão demonstradas a avaliação do polimorfismo dos parasitos no sangue periférico de camundongos infectados com as amostras 806 e 817, respectivamente, representadas em percentual de formas finas, intermediárias e largas observadas durante os dias em que a parasitemia encontrava-se mais elevada durante a fase aguda da infecção.

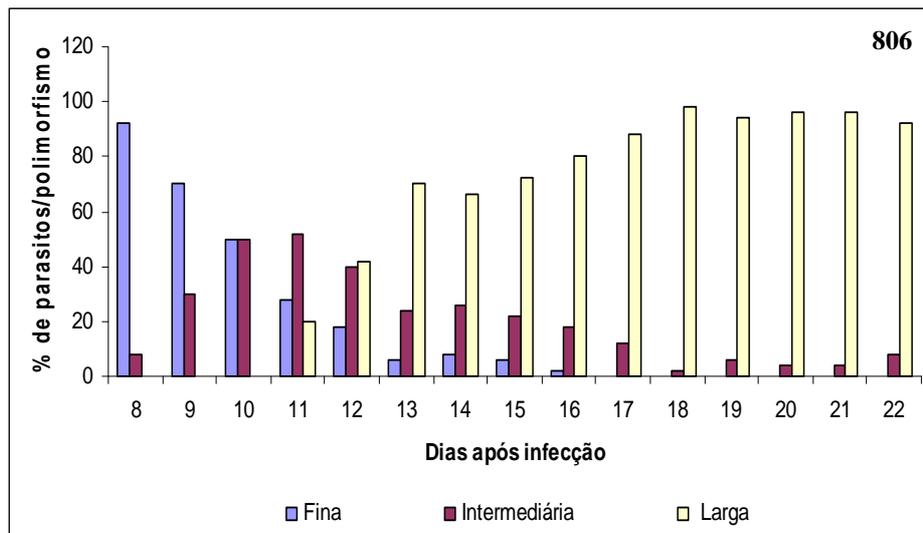


Figura 3 - Polimorfismo das formas tripomastigotas sanguíneas observadas durante o período patente da infecção aguda em camundongo Swiss infectado com a 10000 tripomastigotas sanguíneos da amostra 806 de *Trypanosoma cruzi*.

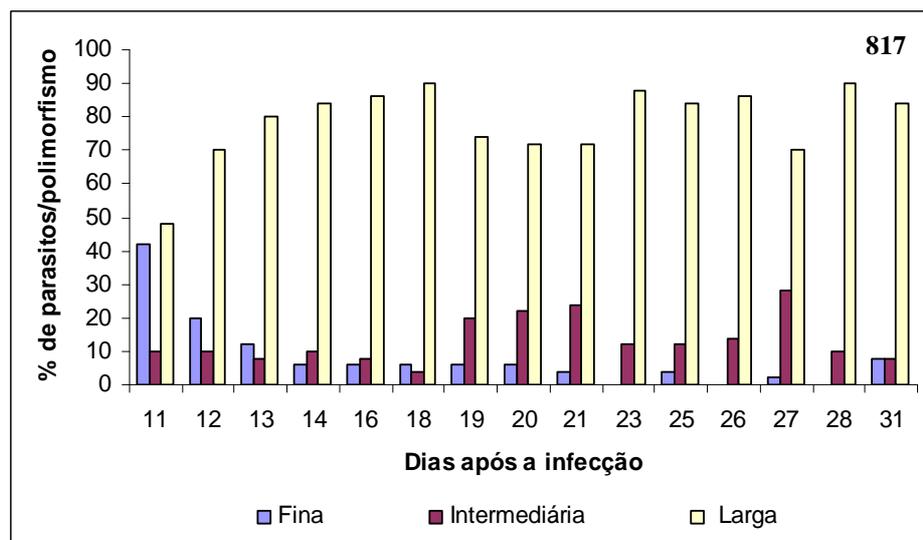


Figura 4 - Polimorfismo das formas tripomastigotas sanguíneas observadas durante o período patente da infecção aguda em camundongo Swiss infectado com a 10.000 tripomastigotas sanguíneos da amostra 817 de *Trypanosoma cruzi*.

5.2.1.8 Caracterização biológica após passagens sucessivas em camundongos

5.2.1.8.1 Parasitemia (PAR)

As curvas de parasitemia de quatro das seis amostras de *T. cruzi* foram obtidas após cinco passagens sucessivas dos parasitos em camundongos Swiss (**Figura 5**). Não foi observada diferença significativa entre estas curvas de parasitemia e as curvas obtidas pelas mesmas amostras na primeira passagem sanguínea apresentadas na **Figura 2**. As passagens sucessivas das amostras 795 e 1661 estão em andamento.

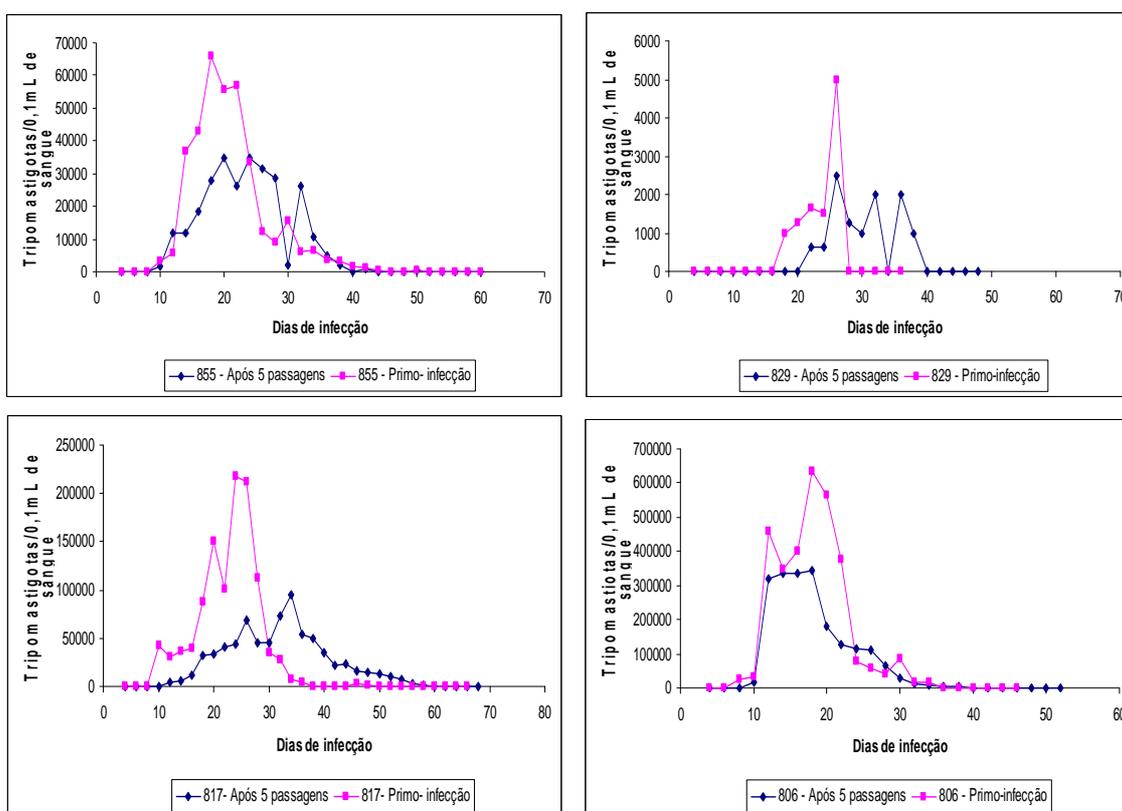


Figura 5 - Curvas de parasitemia observadas em camundongos Swiss inoculados com 10.000 tripomastigotas sanguíneos da amostras 855, 829, 817 e 806 de *Trypanosma cruzi* na primeira passagem e após cinco passagens sucessivas em camundongos.

5.2.1.8.2 Mortalidade

Não foi observada mortalidade em camundongos infectados com nenhuma das amostras de *T. cruzi* analisadas após cinco passagens sanguíneas sucessivas nestes animais, nem mesmo na amostra 806 que foi letal para estes animais na primeira passagem sanguínea.

5.3 Caracterização Bioquímica e Molecular

5.3.1 Análise do perfil eletroforético de isoenzimas (Zimodema)

A análise dos perfis eletroforéticos das amostras de *T. cruzi* isoladas das crianças e de suas mães, obtidos com os sistemas enzimáticos GPI, G6PD, IDH, GDH1 e GDH2, permitiram demonstrar que todas apresentaram perfis idênticos, correspondentes ao zimodema 2 (Z2), subgrupo 2b, referente ao grupo *T. cruzi* II (MILES, 1975; ANONYMOUS, 1999; BRISSE *et al.*, 2000a). Na **Figura 6 (A e B)** estão representados os perfis eletroforéticos das enzimas GPI e G6PD, respectivamente, obtidos das amostras de *T. cruzi* das seis crianças e de quatro de suas mães. Na **tabela VI** estão representados os perfis eletroforéticos obtidos das amostras de *T. cruzi* das crianças e de suas mães.

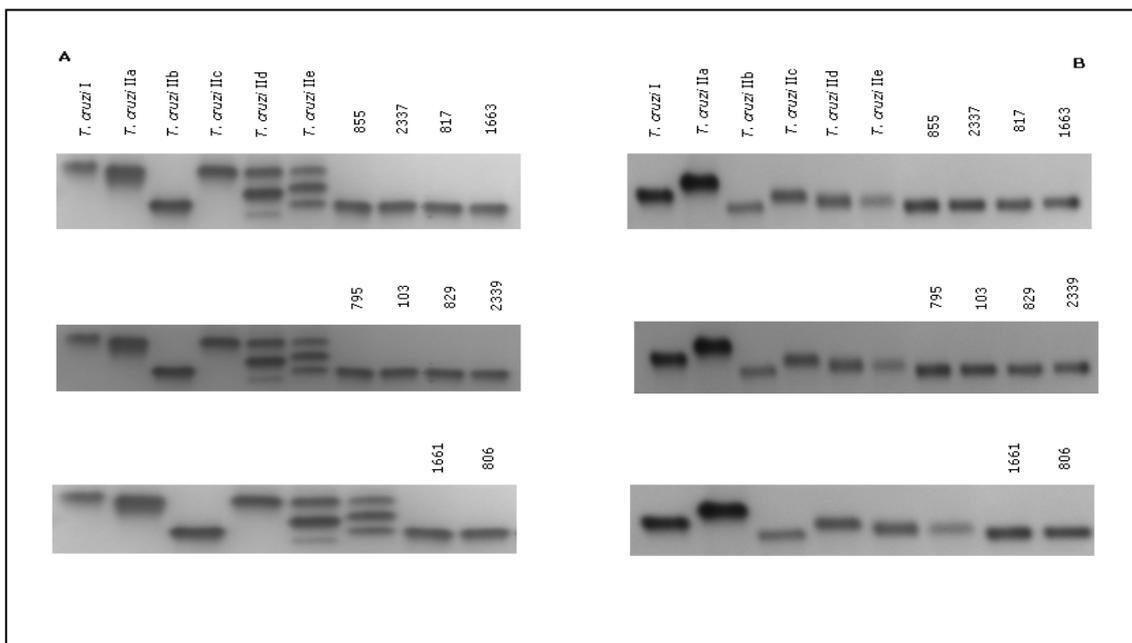


Figura 6 – Perfis eletroforéticos das enzimas GPI (A) e G6PD (B) de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas das crianças e de quatro de suas mães residentes nos municípios de Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. Pareamento filho/mãe: 855/2337; 817/1663; 795/103; 829/2339. Amostras de crianças: 1661 e 806.

Nota: Clone P209 c11: Padrão de referência para *T. cruzi* I. Padrões de referência para *T. cruzi* II: Clone CAN III c11: subgrupo IIa; Clone MAS c11: subgrupo IIb; Clone CM17: subgrupo IIc; Clone Bug2148 c11: subgrupo IId ; Clone TULAc12: subgrupo IIe.

Tabela VI - Perfis eletroforéticos detectados na caracterização enzimática de amostras de *Trypanosma cruzi* isoladas de crianças e de suas mães residentes nos municípios de Berilo e José Gonçalves de Minas, MG, Brasil. Pareamento filho/mãe: 855/2337; 817/1663; 795/103; 829/2339. Amostras isoladas de crianças: 1661 e 806.

Amostras de <i>T. cruzi</i>	Grupos e subgrupos de <i>T. cruzi</i>	Sistemas enzimáticos				
		GPI	IDH	G6PD	GDH1	GDH2
P209 c11	<i>T. cruzi</i> I	4/4	1/1	3/3	4/4	1/1
CANIII c11	<i>T. cruzi</i> IIa	3/3	2/2	4/4	3/3	3/3
MAS c11	<i>T. cruzi</i> IIb	2/2	2/3	1/1	3/3	3/3
CM17	<i>T. cruzi</i> IIc	3/3	2/2	3/3	1/1	1/1
Bug2148 c11	<i>T. cruzi</i> IIId	1/3	2/2	2/2	2/2	1/1
Tula c12	<i>T. cruzi</i> IIe	2/3	2/2	2/2	1/1	2/2
855		2/2	2/3	1/1	3/3	3/3
2337		2/2	2/3	1/1	3/3	3/3
817		2/2	2/3	1/1	3/3	3/3
1663		2/2	2/3	1/1	3/3	3/3
795		2/2	2/3	1/1	3/3	3/3
103		2/2	2/3	1/1	3/3	3/3
829		2/2	2/3	1/1	3/3	3/3
2339		2/2	2/3	1/1	3/3	3/3
1661		2/2	2/3	1/1	3/3	3/3
806		2/2	2/3	1/1	3/3	3/3

Nota: Clone P209 c11: Padrão de referência para *T. cruzi* I. Padrões de referência para *T. cruzi* II: Clone CAN III c11: subgrupo IIa; Clone MAS c11: subgrupo IIb; Clone CM17: subgrupo IIc; Clone Bug2148 c11: subgrupo IIId ; Clone TULAc12: subgrupo IIe.

5.3.2 Amplificação da região 3' do gene rDNA 24 S α

A análise dos produtos amplificados da região 3' do gene rDNA 24 S α das amostras de DNA de *T. cruzi* isoladas dos filhos e de suas mães detectou apenas um fragmento de 125pb (rDNA tipo 1), característico de *T. cruzi* II, conforme verificado na **Figura 7**. Esses resultados foram concordantes com os perfis genéticos observados pela análise do perfil eletroforético de isoenzimas.

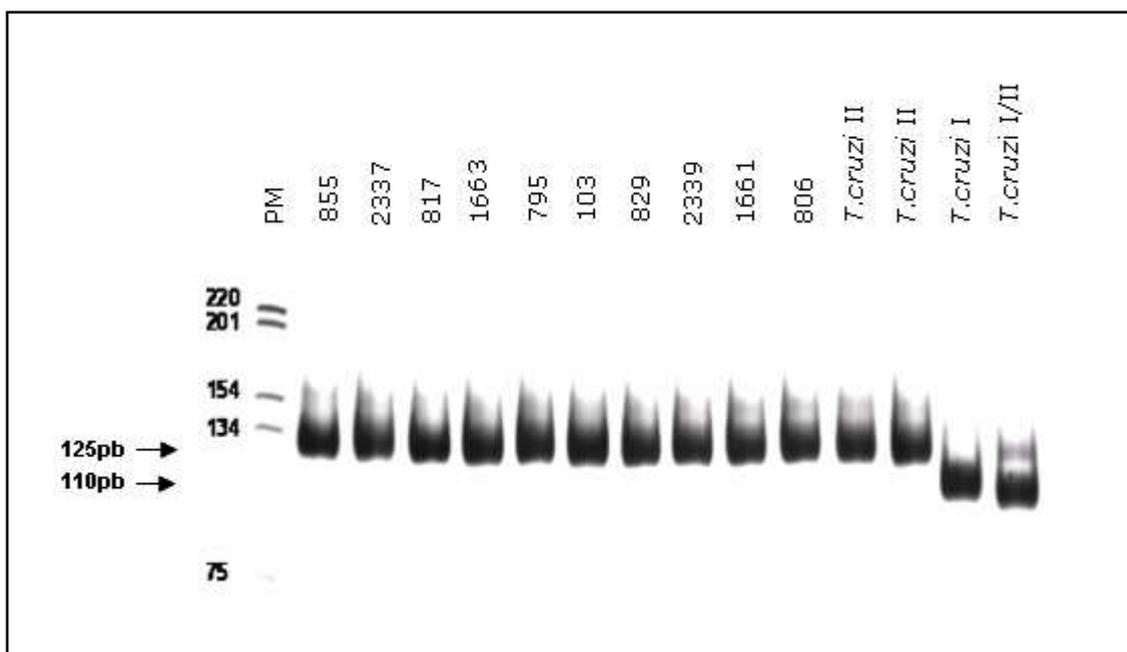


Figura 7 – Perfis da região divergente D7 para o gene rDNA 24 S α obtidos de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas das crianças e de quatro de suas mães. PM: Marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen, USA). Pareamento filho/mãe: 855/2337; 817/1663; 795/103; 829/2339. Amostras isoladas de crianças: 806 e 1661.

Nota: Amostras de referência- DNA do clone CL Brener e da cepa JG (amplicon de 125pb, rDNA 1, característico de *T. cruzi* II), clone Col1.7G2 (amplicon de ~110 pb, rDNA 2, característico de *T. cruzi* I) e clone SO3 cl5 (dois amplicons de ~125 e 110pb, rDNA I/II).

5.3.3 PCR do gene Mitocondrial Citocromo Oxidase, subunidade II (CO II)

A **Figura 8** mostra os produtos de amplificação do gene mitocondrial da Citocromo Oxidase, subunidade II (CO II), após a digestão enzimática (*AluI*) do DNA do *T. cruzi* obtido das amostras de parasitos isolados das crianças e de quatro de suas mães.

Os perfis de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) obtidos dos fragmentos amplificados do gene da COII permitiram verificar apenas um tipo de perfil. Todas as amostras apresentaram as bandas de 81 e 212pb, relacionadas ao grupo mitocondrial C, equivalentes à linhagem de *T. cruzi* II, subgrupo 2b (ANONYMOUS, 1999; BRISSE *et al.*, 2000). Esses resultados foram concordantes com os perfis genéticos observados pela análise do perfil eletroforético de isoenzimas e amplificação da região 3' do gene rDNA 24 S α .

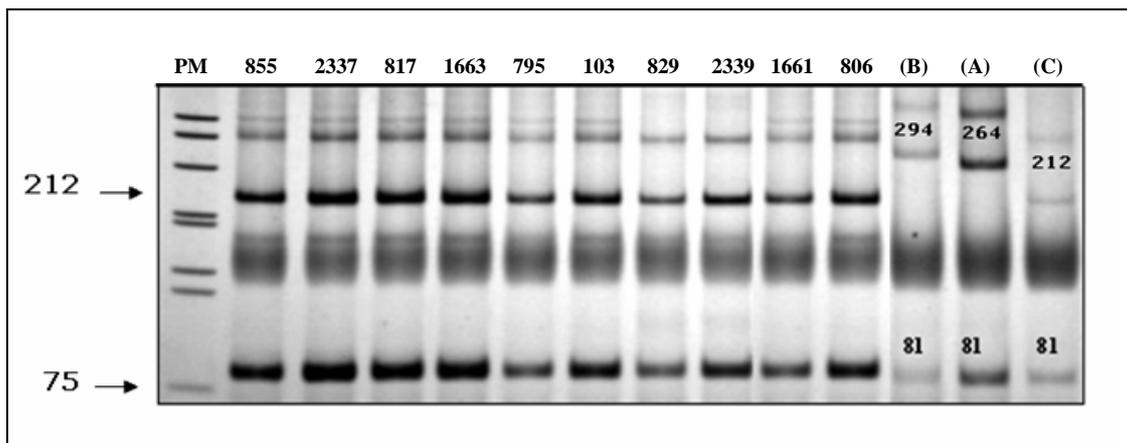


Figura 8 – Padrões de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) gerados a partir de produtos amplificados por PCR do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II das amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas das crianças e de quatro de suas mães após digestão enzimática empregando AluI. PM: Marcador de peso molecular de 25 pares de base (pb). Pareamento filho/ mãe: 855/2337; 817/1663; 795/103; 829/2339. Amostras isoladas de crianças: 806 e 1661.

Nota: (A) amostras que apresentam fragmentos de restrição de 264 e 81 pares de base (pb) são classificadas como *T. cruzi* I (haplótipo mitocondrial A); (B) amostras que apresentam fragmentos de restrição de 294 e 81 pares de base (pb) são classificadas como *T. cruzi* III ou híbridas (haplótipo mitocondrial B); (C) amostras que apresentam fragmentos de restrição de 212 e 81 pares de base (pb) são classificadas como *T. cruzi* II (haplótipo mitocondrial C).

5.3.4 PCR de Microssatélites

A análise dos eletrofluorogramas de cinco locos de microssatélites de todas as amostras de *T. cruzi* revelou um ou dois picos por loco para todas as amostras analisadas, indicando homozigose ou heterozigose, respectivamente. Além disso, foi verificado que os locos TAC15 e ATT14 foram os com maior predominância de homozigotos, enquanto o loco TAT foi o mais heterozigoto.

Entre as amostras analisadas foram constatados dois alelos de tamanhos diferentes para os locos TAC15 e ATT14 e seis pares de alelos com tamanho distintos para o loco TAT. Na **Tabela VII** estão apresentados os alelos encontrados para os cinco locos analisados (TAC15, TAT, AAT, ATT14 e AAAT).

Comparando os resultados obtidos da amplificação de microssatélites dos filhos e de suas mães (855/2337; 829/2339, 795/103, 817/1663), observa-se que os perfis de ambos são idênticos para cada um dos cinco locos analisados. Por outro lado, quando comparados os diferentes pares das amostras de filho/ mãe, foi observada diferenças no perfil genético das amostras detectadas por todos os locos analisados.

O pareamento das amostras de parasitos de duas crianças não foi realizado pelo fato de não ter sido possível isolar parasitos de suas mães.

As **Figuras 9 (A e B)** representam os eletrofluorogramas das amostras obtidos para os locos TAC15 e AAT, respectivamente.

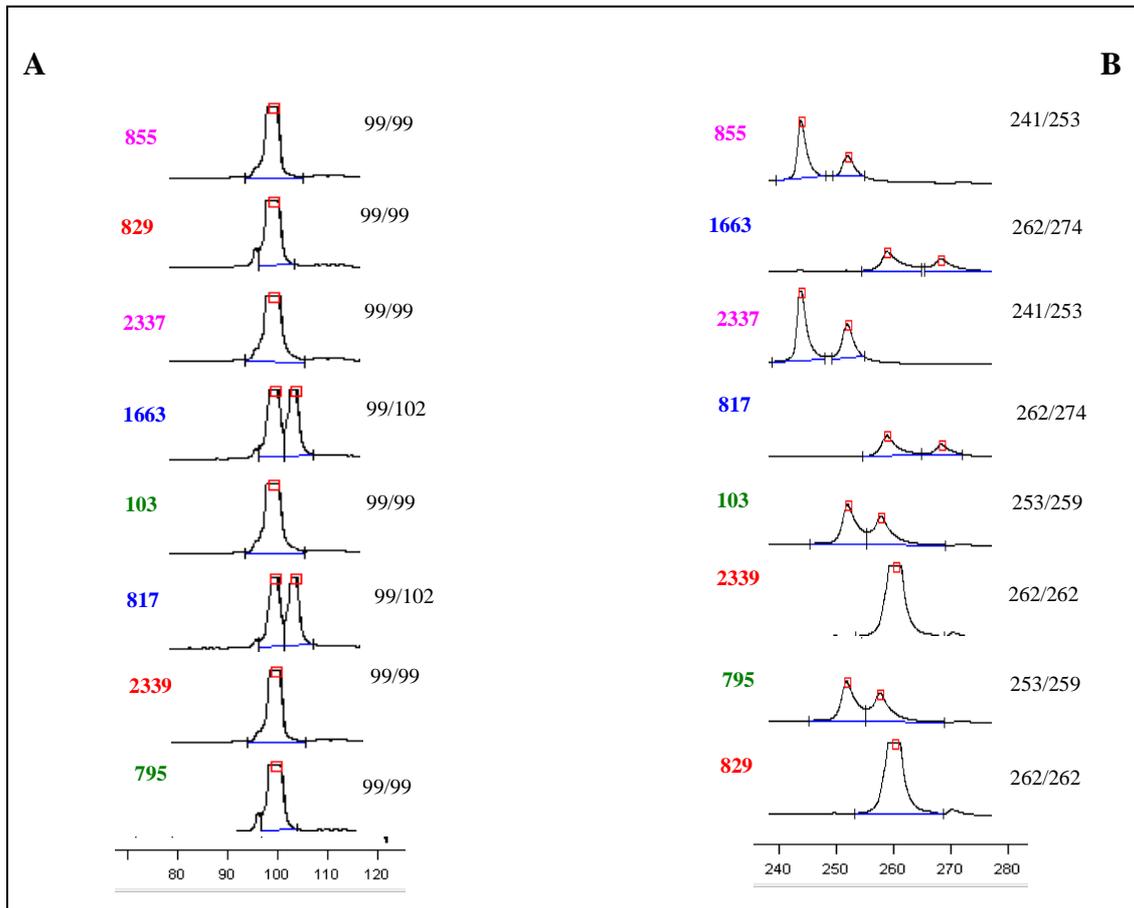


Figura 9 – Tamanho dos alelos em pares de bases de dois locos de microssatélites observados nas amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas das crianças e de quatro de suas mães, residentes em Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. Amostras 855/2337; 829/2339, 795/103 e 817/1663 representam pareamento filho-mãe. A - representa tamanho dos alelos em pares de bases do loco TAC15; B - representa tamanho dos alelos em pares de bases do loco AAT.

Tabela VII - Tamanho dos alelos em pares de bases de cinco locos de microssatélites observados em amostras de *Trypanosma cruzi* isoladas das crianças e de quatro de suas mães residentes em Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. Amostras 855/2337; 829/2339, 795/103 e 817/1663 representam pareamento de amostras isoladas de pares filho/mãe. Amostras 1661 e 806 representam amostras de *T. cruzi* isoladas de crianças.

Par de amostras e amostra	Amostras de <i>T. cruzi</i>	Locos de Microssatélites				
		TcTAC15	TcTAT20	TcAAT8	TcATT14	TcAAAT6
1	855 (Filho)	99/99	211/214	241/253	256/265	259/275
	2337 (Mãe)	99/99	211/214	241/253	256/265	259/275
2	817 (Filho)	99/102	214/214	262/274	265/265	271/275
	1663 (Mãe)	99/102	214/214	262/274	265/265	271/275
3	795 (Filha)	99/99	205/205	253/259	265/265	259/271
	103 (Mãe)	99/99	205/205	253/259	265/265	259/271
4	829 (Filho)	99/99	205/214	262/262	265/265	271/275
	2339 (Mãe)	99/99	205/214	262/262	265/265	271/275
5	1661 (Filha)	99/99	190/214	265/280	265/265	275/275
6	806 (Filho)	99/99	214/217	262/274	265/265	271/275

6.0 Discussão

Variações nas formas clínicas e na resposta ao tratamento específico da doença de Chagas têm sido observadas, principalmente quando pacientes de diferentes regiões endêmicas são avaliados (LUQUETTI *et al.*, 1986; ANDRADE *et al.*, 1992; COURA & CASTRO, 2002; WHO, 2007). Estas observações têm estimulado diversos pesquisadores da área a isolar e estudar diferentes amostras de *T. cruzi* originárias dos mais variados hospedeiros e vetores sejam eles pertencentes ao ambiente doméstico, peridoméstico ou silvestre. Estes estudos são fundamentais no sentido de compreender a influência da genética do parasito na sua biologia, epidemiologia, morbidade e evolução clínica da doença de Chagas.

Após ter sido estabelecido que o *T. cruzi* apresenta estrutura e evolução clonal (TIBAYRENC *et al.*, 1986; TIBAYRENC & AYALA, 1988), o que pressupõe sua estabilidade genética no tempo e no espaço, mesmo com a ocorrência de raros fenômenos de troca genética, uma correlação entre genética e as diferentes propriedades biológicas do parasito (REVOLLO *et al.*, 1998; BUSCAGLIA & DI NOIA, 2003; MACEDO *et al.*, 2004) é esperada. Esta associação tem sido confirmada por diversos trabalhos em infecções experimentais em camundongos (LANA *et al.*, 2000; TOLEDO *et al.*, 2002;) vetores (LANA *et al.*, 1998) e “*in vitro*” (LAURENT *et al.*, 1997; REVOLLO *et al.*, 1998).

Embora estudos genéticos sejam importantes para se demonstrar a heterogeneidade intraespecífica do *T. cruzi* (MILES *et al.*, 1981), o estudo do comportamento biológico e da relação parasito-hospedeiro têm sido essenciais para evidenciar a importância das diferentes cepas do parasito na determinação das manifestações clínico-patológicas da doença de Chagas (ANDRADE, 1974). Tais investigações demonstraram que populações de *T. cruzi* de diferentes procedências podem ser agrupadas em três Tipos ou Biodemas (I, II, III), apresentando características distintas em relação aos parâmetros morfobiológicos e histopatológicos em camundongos Swiss (ANDRADE, 1974; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997). Esta diversidade biológica do *T. cruzi* levou BRENER (1973, 1977) à criação do termo “cepas polares” de *T. cruzi* exemplificadas pelas cepas Y e CL que apresentam características muito distintas em relação àqueles mesmos parâmetros estudados por ANDRADE (1974) e ANDRADE & MAGALHÃES (1997) em camundongos, incluindo ainda seu crescimento e diferenciação no triatomíneo vetor e em meios de cultura celular e acelular.

Um dos objetivos deste estudo foi caracterizar morfológicamente seis amostras de *T. cruzi* isoladas de escolares, com idade entre 7 e 15 anos, de dois municípios vizinhos do Vale do Jequitinhonha, MG, no intuito de compreender melhor a evolução clínica, morbidade e epidemiologia da doença de Chagas em uma das mais importantes áreas endêmicas do país.

Desta forma, tal caracterização consistiu na avaliação da evolução da infecção em camundongos Swiss, incluindo diversos parâmetros relacionados à curva de parasitemia, tais como período pré-patente (PPP), período patente (PP), pico máximo de parasitemia (PMP), dia do pico máximo de parasitemia (DPMP), morfologia do parasito no sangue periférico e a taxa de mortalidade observada nestes animais.

Avaliando tais parâmetros, este estudo demonstrou semelhanças entre os parâmetros analisados em todas as cepas de *T. cruzi* isoladas das crianças. Para todos os experimentos foram observados 100% de infectividade nos camundongos Swiss, utilizando o exame a fresco ao longo da fase aguda da infecção. Entretanto para um dos camundongos inoculados com a cepa 829 foi necessária a realização da hemocultura (FILARDI e BRENER, 1987), técnica parasitológica mais sensível na detecção da infecção.

Todas as curvas de parasitemia obtidas em camundongos Swiss inoculados com as seis cepas de *T. cruzi* apresentaram evolução lenta, com dias de pico máximo de parasitemia (DPMP) tardio, observados entre 16 e 26 dias após a infecção dependendo da cepa avaliada. As cepas 806 e 1661, as mais virulentas, foram significativamente distintas das demais em relação ao período pré-patente e dia do pico máximo de parasitemia, ambos mais precoces, além de possuírem os maiores picos de parasitemia quando comparadas com as demais. Por outro lado, a cepa 829 apresentou maior PPP ($13,7 \pm 8,71$ dias) e DPMP tardio ($18 \pm 11,46$ dias), além de ter demonstrado período patente (PP) e pico máximo de parasitemia (PMP) menores em relação às demais. Assim, a demora na confirmação da infecção dos camundongos infectados por esta cepa e o menor e tardio pico de parasitemia observado nestes animais são aspectos indicativos de sua menor virulência em relação às demais cepas estudadas.

O estudo da morfologia dos tripomastigotas sanguíneos no sangue periférico foi possível de ser realizado em cinco das seis cepas estudadas, tendo sido verificado um predomínio de formas largas do parasito na fase aguda. O percentual destas formas foi crescente ao longo da infecção, aspecto este esperado para cepas de baixa virulência como demonstrado por ANDRADE (1974). Este dado corrobora outros trabalhos

(CARNEIRO *et al.*, 1991; DEVERA *et al.*, 2002) nos quais foi observada correlação entre a parasitemia e morfologia dos parasitos.

A cepa 806, que apresentou maior parasitemia, apresentou também maior percentual de formas finas no início da infecção em relação às demais cepas avaliadas. Além disso, a ascensão da curva de parasitemia para esta cepa coincidiu com a predominância destas formas que são presentes em cepas com intensa multiplicação parasitária (PIZZI, 1953; ANDRADE *et al.*, 1970; ANDRADE, 1974). Entretanto, as formas finas foram finalmente sendo substituídas por formas intermediárias e largas no decorrer da infecção, o que foi verificado também para as demais cepas. Estes resultados corroboram outros estudos de caracterização morfológica de *T. cruzi* que envolvem este tipo biológico de parasito (SILVA, 1959; BRENER, 1965; ANDRADE *et al.*, 1970; BRENER, 1977; DEVERA *et al.*, 2002) pertencentes ao Tipo II (ANDRADE, 1974) ou Biodema II (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

A relação parasito-hospedeiro na doença de Chagas é um assunto amplamente investigado e revela grande complexidade quando se tenta correlacionar o polimorfismo do *T. cruzi* com o seu comportamento biológico, tanto no homem como em animais de experimentação (ANDRADE *et al.*, 1970). ANDRADE *et al.*, (1970) demonstraram ainda a existência de correlação entre a morfologia dos parasitos no sangue periférico e as lesões histopatológicas observadas no animal, pois cepas que apresentaram intensa e precoce multiplicação parasitária foram as mais patogênicas, apresentaram formas delgadas predominantes no início da infecção e intenso macrofagotropismo, enquanto aquelas que se multiplicaram lentamente, determinando picos tardios de parasitemia, foram predominantemente miotrópicas e apresentaram formas largas em maior número no curso da infecção, fato também demonstrado por BRENER, (1969). Também no modelo cão, CALDAS (2008) demonstraram que, na maioria das vezes, a intensidade do processo inflamatório no miocárdio foi mais intensa quando os animais foram inoculados com cepas que apresentavam predominância de formas largas.

O dia do pico máximo de parasitemia (DPMP) foi tardio para todas as amostras avaliadas, achado comum em cepas de baixa virulência (ANDRADE, 1974; MILES *et al.*, 1977). Esta observação pode estar associada com a predominância de formas largas durante a fase aguda da infecção dos camundongos, o que foi verificado também por outros autores em amostras isoladas de pacientes humanos (ANDRADE, 1974; SCHLEMPER Jr., 1982; CARNEIRO *et al.*, 1991) procedentes do Recôncavo Baiano e Minas Gerais. A presença de formas largas está associada à lenta multiplicação dos

parasitos e DPMP tardios observados para todas as cepas aqui avaliadas, já que estas são menos infectantes, demoram mais tempo para invadir as células e conseqüentemente realizar divisão celular, contrariamente às cepas com predominância de formas finas do *T. cruzi* que são mais aptas para penetrar nas células e iniciar a sua divisão, permanecendo desta forma por menos tempo na circulação após a inoculação (BRENER, 1965; BRENER, 1969).

A partir das análises dos resultados morfológicos das cepas aqui estudadas pode-se considerar que todas elas, inclusive a 806 e 1661, apresentaram baixa virulência, pois as curvas de parasitemia apresentaram-se muito baixas ou relativamente baixas, e a mortalidade dos camundongos foi nula ou ocorreu em apenas uma delas (cepa 806) sendo observada em 62,5% dos animais. Entretanto, em animais infectados com esta mesma cepa não foi verificado nenhum caso de morte durante as cinco passagens sucessivas como a obtida na primeira passagem sanguínea, confirmando seu caráter de baixa virulência compatível com cepas do Tipo II (ANDRADE, 1974) ou Biodema II (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

Estes resultados corroboram os estudos prévios que demonstraram que a maioria das cepas isoladas de humanos é de baixa e média virulência, geralmente com níveis parasitêmicos baixos ou sub-microscópicos (ANDRADE, 1974; SCHLEMPER Jr., 1982; CARNEIRO *et al.*, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 1997; SOLARI *et al.*, 2001; DEVERA *et al.*, 2002).

O conhecimento da distribuição dos tipos ou biodemas das cepas do *T. cruzi* circulantes em uma determinada área endêmica tem sido fundamental na tentativa de verificar sua influência nas manifestações clínicas da doença de Chagas. Entretanto, vários trabalhos demonstraram a dificuldade da transferência de dados experimentais para o observado na doença humana (ANDRADE *et al.*, 1974; CARNEIRO *et al.*, 1991; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

No trabalho de DEVERA *et al.*, (2002), em que foi estudado o comportamento biológico de nove cepas isoladas de pacientes residentes em três áreas endêmicas de Minas Gerais, Pains, Iguatama e uma delas envolvendo o município de Berilo, de onde estamos analisando amostras do *T. cruzi*, não houve correlação entre as características biológicas e histopatológicas observadas na fase aguda e crônica da infecção em camundongos com a forma clínica da doença observada nos pacientes. Os autores detectaram o predomínio de cepas pertencentes ao Biodema II e Biodema III em Berilo, e verificaram que cepas dos pacientes com a forma cardíaca foram as que determinaram

parasitemias médias ou elevadas nos camundongos, e que cepas que apresentaram níveis de parasitemia baixos no modelo murino, procederam de pacientes na forma indeterminada da doença de Chagas crônica.

Entretanto, tem que ser considerado que o tempo de infecção estudado e o tempo da sobrevivência do modelo murino são fatores limitantes para se fazer extrapolação dos resultados obtidos para a infecção humana. Considerando estas observações, os dados histopatológicos experimentais da fase crônica da infecção dos animais aqui estudados serão posteriormente comparados com dados clínicos dos pacientes dos quais as cepas foram isoladas em avaliações posteriores.

As cepas de *T. cruzi* avaliadas neste estudo foram recentemente isoladas e não sofreram manipulação prolongada por longo tempo em cultura antes de sua caracterização, garantindo desta forma a estabilidade de suas características naturais. Consideramos este cuidado importante, pois vários trabalhos demonstraram que o longo tempo de manutenção do *T. cruzi* em animais e cultura leva à alterações em suas características biológicas, tais como a infectividade que tende a diminuir em função das condições de manutenção e cultivo em laboratório (VELOSO *et al.*, 2005). Outros autores demonstraram um declínio da virulência (BRENER *et al.*, 1974; ARAÚJO, 2000) e outros intensificação desta característica biológica (SCHLEMPER Jr., 1982; CARNEIRO *et al.*, 1991; CAMANDARROBA *et al.*, 2001).

Também VELOSO *et al.* (2005) relataram um declínio na virulência da cepa Be-78 do *T. cruzi* após longo tempo de infecção prolongada no modelo cão. Estes resultados corroboraram os obtidos por LANA & CHIARI (1986) que descreveram resultados semelhantes em camundongos ao comparar a cepa Berenice original, isolada em 1962 da paciente Berenice, primeiro caso clínico da infecção humana descrito por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909) com outra amostra do parasito isolada da mesma paciente 16 anos depois (cepa Berenice-78).

Desse modo, apesar da cepa 829 ter apresentado virulência relativamente mais baixa que as demais estudadas, consideramos que o baixo nível de parasitemia observado é uma característica intrínseca desta cepa e não uma influência do manuseio em cultura. Além disso, a caracterização morfológica das seis cepas de *T. cruzi* isoladas das crianças foi realizada na primeira passagem sanguínea, com a finalidade de evitar a seleção de parasitos no modelo experimental adotado ao longo de passagens sanguíneas sucessivas. Adicionalmente, as passagens sucessivas do *T. cruzi* em camundongos foram realizadas posteriormente, no intuito de verificar a influência da

manutenção dos parasitos em seu comportamento neste modelo. Sendo assim, não foram observadas diferenças significativas quando as curvas de parasitemia obtidas na primeira passagem sanguínea foram comparadas com as obtidas após cinco passagens sucessivas, confirmando o caráter de baixa virulência das cepas de *T. cruzi* aqui estudadas em camundongos.

Este estudo consistiu também na caracterização bioquímica e molecular das cepas de *T. cruzi* isoladas das crianças e das mães no intuito de correlacionar tais aspectos com as características morfológicas dos parasitos avaliadas. Para tais caracterizações foram realizadas as técnicas MLEE (isoenzimas), rDNA 24S α , COII mitocondrial e microssatélites. Neste contexto, análises dos resultados obtidos por estas técnicas demonstraram que todas as cepas das crianças e das mães apresentaram zimodema 2 (Z2), grupo *T. cruzi* II subgrupo 2b.

Apesar de termos analisados um pequeno grupo de cepas, nossos dados confirmam resultados anteriores do nosso próprio grupo (TOLEDO *et al.*, 2002) que demonstrou que clones do subgrupo 2b (genótipo 32 de TIBAYRENC & AYALA, 1988) foram as menos virulentas em camundongos, corroborando a correlação entre a genética do parasito e suas propriedades biológicas.

Embora possam existir outros zimodemas de *T. cruzi* circulantes nas áreas estudadas, podemos considerar que este é predominante, pois foi detectado também em outros trabalhos realizados por nossa equipe na região (COUTO, 2008; MARTINS *et al.*, 2009, em preparação). O trabalho de COUTO (2008) revelou ainda a presença do subgrupo 2e, de característica híbrida. Entretanto, estudos de outros autores demonstraram predominância de apenas um Tipo ou Biodema de *T. cruzi* em uma mesma área geográfica (ANDRADE, 1974; ANDRADE *et al.*, 1983; ANDRADE & MAGALHAES, 1997).

Quando se trata de amostras de parasitos isolados de humanos tem sido verificado que em geral, estes pertencem a uma única linhagem do parasito (*T. cruzi* I e *T. cruzi* II) sem evidências de infecções mistas ou policlonais (BARNABÉ *et al.*, 2001; BOSSENO *et al.*, 2002; MONTILLA *et al.*, 2002; AÑEZ *et al.*, 2004; VIRREIRA *et al.*, 2006; VIRREIRA *et al.*, 2007; CORRALES *et al.*, 2009). Por outro lado a presença de infecções mistas em pacientes por parasitos pertencentes às linhagens de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II foram demonstradas por outros autores em regiões de alta circulação do parasito entre os diferentes ecótopos (SOLARI *et al.*, 2001; BRENIÈRE *et al.*, 2002; TORRES *et al.*, 2003).

Nossos resultados estão de acordo com achados prévios, sugerindo que nos países do Cone Sul da América Latina, a infecção humana é causada principalmente por amostras de *T. cruzi* pertencentes à DTU II (TIBAYERENC, 1998), achado este confirmado por diferentes autores em diversos países desta região (ZINGALES *et al.*, 1998; BARNABÉ *et al.*, 2000; BARNABÉ *et al.*, 2001; DI NOIA *et al.*, 2002; BUSCAGLIA & DI NOIA, 2003; CORRALES *et al.*, 2009). A associação da sublinhagem 2b com infecção humana já foi também demonstrada por diferentes pesquisadores e nossos dados corroboram a observação que essa linhagem é a mais frequentemente associada à infecção humana no Brasil (ZINGALES *et al.*, 1998; FERNANDES *et al.*, 1998; BARNABÉ *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2005; ZALLOW *et al.*, 2005; LAGES-SILVA *et al.*, 2006).

Há claras evidências que suportam o papel seletivo do hospedeiro vertebrado sobre as populações de *T. cruzi*. Alteração nos perfis isoenzimáticos e nos de RFLP do DNA do cinetoplasto de parasitos isolados de animais têm sido descritas (DEANE *et al.*, 1984; LAURIA-PIRES *et al.*, 1996). CARNEIRO *et al.*, 1990 demonstraram que a manutenção de cepas isoladas de pacientes chagásicos crônicos em camundongos por 18 meses alterou os padrões de isoenzimas e de kDNA de algumas delas. Alteração do perfil enzimático foi também observado por ROMANHA (1982) que demonstrou que a manutenção de cepas Y e CL em crescimento exponencial em cultura induziu alteração no padrão isoenzimático em direção ao zimodema C. Ao contrário de LANA & CHIARI (1986) que demonstraram estabilidade no padrão de isoenzimas para a cepa Berenice-78 durante 30 passagens sanguíneas sucessivas em camundongos Swiss isogênicos. Além disto, a identificação de linhagens de *T. cruzi* em cultura pode não estimar a diversidade do parasito presente originalmente no hospedeiro, já que seleção de sub-populações de parasitos pode ocorrer neste meio (BRENIÈRE *et al.*, 2002; DEVERA *et al.*, 2003; TORRES *et al.*, 2003). Outros trabalhos mostraram ainda que o estudo de populações clonadas no laboratório podem não representar a realidade de muitas cepas isoladas de diferentes áreas geográficas (MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI, 1988). Estas podem ser algumas das razões da dificuldade do encontro de correlação entre a genética do parasito e suas propriedades biológicas, epidemiológicas e clínicas fundamentais.

Diversos autores têm demonstrando correlação entre o padrão de isoenzimas das cepas do *T. cruzi* e o comportamento biológico (DVORAK, 1980; ANDRADE *et al.*, 1983; SANCHEZ *et al.*, 1990; CARNEIRO *et al.*, 1991; ANDRADE *et al.*, 1992;

ANDRADE & MAGALHAES, 1997). Entretanto, tal associação é dificultada por todas estas razões já que a heterogeneidade biológica pode ocorrer dentro do mesmo zimodema, ao mesmo tempo em que características biológicas comuns podem ser encontradas em populações com diferentes zimodemas e esquizodemas (SCHLEMPER Jr *et al.*, 1982; CARNEIRO, 1991; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997; MURTA *et al.*, 1998; SOLARI *et al.*, 2001; SÁNCHEZ-GUILLÉN *et al.*, 2006). Outra possibilidade que explicaria a dificuldade do encontro desta correlação pode ser decorrente da grande variação do valor das variáveis biológicas de amostras de *T. cruzi* de um mesmo zimodema clonadas ou não (MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI 1988; CARNEIRO *et al.*, 1991; TOLEDO *et al.* 2002). Tais discrepâncias chamam a atenção para a necessidade de marcadores moleculares mais discriminantes que possam demonstrar uma associação maior entre a genética do parasito e suas características, o que corrobora a hipótese subjacente ao modelo clonal de estrutura e reprodução existente em *T. cruzi* e suas implicações (TIBAYRENC & AYALA, 1988).

No presente estudo foi verificada uma grande homogeneidade, tanto do ponto de vista genético como biológico nas cepas analisadas uma vez que todas as cepas apresentaram perfil semelhante ao Tipo II de ANDRADE (1974) ou Biodema II (ANDRADE & MAGALHÃES (1997) e classificadas como *T. cruzi* II (ANONYMOUS, 1999; MOMEN, 1999), subgrupo 2b (BRISSE *et al.*, 2000). Esta associação entre as características biológicas e o perfil de isoenzimas foi também demonstrada por outros trabalhos que utilizaram populações do parasito procedentes de outras regiões endêmicas (ANDRADE *et al.*, 1992; ANDRADE *et al.*, 1983; SANCHEZ *et al.*, 1990). ANDRADE & MAGALHAES (1997) confirmaram a correspondência entre biodemas e zimodemas (Tipo I com Z2b; Tipo II com Z2; Tipo III com Z1), além de demonstrar também correlação entre os biodemas com diferentes tipos de lesões histopatológicas na fase aguda e crônica da infecção observada em camundongos Swiss. Entretanto, tal correlação não foi observada por SÁNCHEZ-GUILLÉN (2006) ao estudar três cepas de *T. cruzi* do México, isoladas de paciente, vetor e reservatório, considerando o conjunto dos parâmetros biológicas (parasitemia, morfologia, tropismo tecidual, patogenicidade e mortalidade) aspectos semelhantes aos Biodemas II e III de ANDRADE & MAGALHÃES (1997) no zimodema Z1, grupo *T. cruzi* I. Por esta razão analisaremos posteriormente as alterações histopatológicas da fase aguda e crônica dos animais inoculados com as amostras de parasitos aqui

estudadas para discutirmos com os demais dados experimentais e a evolução clínica da doença dos pacientes dos quais os parasitos foram isolados.

No intuito de compreender melhor a diversidade genética dos parasitos isolados dos pacientes, foi realizada também a técnica de microssatélites, pois estes alvos muito polimórficos, são capazes de discriminar as subpopulações, além de permitir verificar se uma cepa de *T. cruzi* é monoclonal ou policlonal (OLIVEIRA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1999; MACEDO *et al.*, 2001; MACEDO *et al.*, 2004). Desta forma, o emprego desta técnica tem sido de grande importância na caracterização das cepas de *T. cruzi* isoladas dos pacientes de áreas endêmicas que podem ser infectados por inúmeros contatos com diferentes triatomíneos, que por sua vez podem ter se alimentado em diferentes indivíduos ou animais reservatórios infectados albergando assim, populações multiclonais do parasito (TYBAYRENC & AYALA, 1988; TIBAYRENC & BRENIÈRE, 1988; MACEDO & PENA, 1998; CAMANDAROBÁ *et al.*, 2001). Outra vantagem desta metodologia é a necessidade de um volume mínimo de cultura do parasito isolado em meio LIT, o que minimiza o manuseio e a possibilidade deste em induzir mudanças das características genéticas do parasito (CASTELLANI *et al.*, 1967; CHIARI *et al.*, 1974; ROMANHA *et al.*, 1982). Além disso, a técnica de microssatélites tem sido importante na detecção de subpopulações de *T. cruzi* presentes em baixa concentração em uma amostra biológica, que não seriam detectadas por outros marcadores moleculares de menor sensibilidade.

As análises de microssatélites e RAPD têm demonstrado que cepas isoladas de vetores ou mamíferos silvestres podem ser geneticamente mais complexa que as obtidas de pacientes na fase aguda da doença. Estas, por outro lado, são mais complexas que as obtidas de pacientes crônicos (OLIVEIRA *et al.*, 1998, OLIVEIRA *et al.*, 1999). Este fato sugere, então, que hospedeiros humanos selecionam variedades específicas de clones de *T. cruzi* de uma população mista (MACEDO & PENA, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1999; MACEDO *et al.*, 2001, MACEDO *et al.*, 2002) devido possivelmente à resposta imune ao longo de uma infecção prolongada, resultando assim, em uma redução na complexidade genética das linhagens de *T. cruzi* isolados de pacientes crônicos (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Entretanto, ao estudar um número maior de parasitos isolados de humanos com doença crônica, OLIVEIRA *et al.*, (1999) observaram casos com mais de dois picos, embora ainda em menores proporções.

O presente trabalho demonstrou, utilizando os alvos nucleares de microssatélites, que todas as cepas isoladas das crianças e das mães apresentaram um (homozigose) ou dois picos (heterozigose) para cada um dos cinco locos analisados, verificando assim, que são provavelmente monoclonais. Além disso, esta metodologia foi fundamental na detecção do polimorfismo para os cinco locos de microssatélites utilizados, verificando desta forma, perfis distintos entre as cepas de parasitos pertencentes ao grupo *T. cruzi* II, subgrupo 2b.

As análises de microssatélites permitiram ainda demonstrar que as cepas de *T. cruzi* apresentaram perfis idênticos para cada um dos cinco locos analisados quando as cepas isoladas de mães e filhos foram comparadas. Estes resultados, associados aos resultados obtidos pela caracterização pelos perfis de isoenzimas, rDNA 24Sα e COII mitocondrial, idênticos para todas as cepas aqui estudadas, nos permite sugerir a possibilidade de transmissão congênita. Nossos resultados corroboram os de VIRREIRA *et al.* (2007) e BURGOS *et al.* (2007) que demonstraram que as sublinhagens de *T. cruzi* isoladas de casos de infecção congênita com populações mistas ou policlonais foram idênticas entre mães e filhos. Apesar do indicativo de ter havido transmissão congênita, não podemos descartar a possibilidade da transmissão vetorial, já que as seis crianças nasceram antes da implantação da vigilância epidemiológica (1997), período no qual a transmissão vetorial estava mais presente na região em estudo. Além disso, a literatura não registra a ocorrência de casos de transmissão congênita nos municípios aqui estudados.

A correlação entre genética e a clínica dos pacientes tem sido também investigada, mas os resultados obtidos têm sido controversos (MILES *et al.*, 1981; MACEDO & PENA, 1998; ZINGALES *et al.*, 1999; VAGO *et al.*, 2000; LAGES-SILVA *et al.*, 2006). No entanto, MONTAMAT *et al.* (1996) sugeriram a importância da caracterização isoenzimática na determinação do prognóstico da doença. Os autores detectaram uma prevalência do Z1 e Z12 em pacientes crônicos de áreas endêmicas na Argentina, e demonstraram que pacientes infectados com parasitos pertencentes ao Z1 apresentaram maior proporção de assintomáticos, sendo desta forma mais benigno em relação aos parasitos pertencentes ao Z12. Entretanto, AÑES *et al.* (2004) demonstraram, em um trabalho realizado na Venezuela, diferentes manifestações clínicas na doença de Chagas aguda em pacientes infectados com parasitos pertencentes ao grupo *T. cruzi* I ou *T. cruzi* II, não conseguindo assim, demonstrar associação da genética do parasito com as formas clínicas da doença.

Neste estudo, foi demonstrado que todas as crianças apresentam a forma indeterminada da doença, exceto o paciente 806 que apresenta a forma cardíaca leve da doença. No entanto, estes pacientes ainda são muito jovens (7 a 15 anos) e as lesões e manifestações clínicas da doença de Chagas podem evoluir com o tempo, pois vários trabalhos têm demonstrado severidade dos sintomas na doença humana causada por parasitos pertencentes ao grupo *T. cruzi II* (ZINGALES *et al.*, 1998; DI NOIA *et al.*, 2002; BUSCAGLIA & DI NOIA, 2003; MILES *et al.*, 2003; AÑES *et al.*, 2004). Outros estudos clínicos realizados por nossa equipe nos municípios de Berilo e José Gonçalves de Minas, Vale do Jequitinhonha (SANTOS *et al.*, 2008) também têm revelado uma morbidade muito severa em pacientes desta região, tendo sido detectadas neste estudo as diversas formas clínicas da doença, inclusive a forma mista com manifestações cardio-digestivas e resultados preliminares de nossa equipe já demonstram que muitas dessas cepas são também do grupo 2b (MARTINS *et al.*, 2009, em preparação). Estes mesmos achados foram observados inclusive em algumas mães das crianças aqui consideradas cuja avaliação clínica já foi realizada.

Entretanto, considerando que as crianças aqui avaliadas foram tratadas com quimioterapia específica para a doença de Chagas, espera-se que a doença não evolua em todas elas, pois mesmo na ausência de cura parasitológica, alguns trabalhos têm demonstrado o efeito benéfico do tratamento no prognóstico e evolução clínica do paciente, principalmente quando este é realizado em pessoas mais jovens e assintomáticas (ANDRADE *et al.*, 1996; SOSA-ESTANI *et al.*, 1998; RUSSOMANDO *et al.*, 1998; SOSA-ESTANI *et al.*, 2006) confirmando evidências experimentais (ANDRADE *et al.*, 1991; BRENER *et al.*, 1993).

Finalmente, os resultados obtidos neste trabalho indicam que os estudos da morfologia, comportamento biológico e caracterização molecular de populações de *T. cruzi* isolados de pacientes podem se constituir em importantes elementos para o estabelecimento de correlações entre tais características com as manifestações clínico-patológicas da doença de Chagas em diferentes áreas geográficas.

Entendemos assim, que este trabalho possa contribuir para um melhor conhecimento da realidade da doença de Chagas, além de ser importante na orientação do manejo clínico dos pacientes a ser adotado nesta região, considerada uma das mais importantes zonas endêmicas da doença no país (DIAS *et al.*, 1985).

7.0 Conclusões

- ❖ As curvas de parasitemia obtidas em camundongos Swiss inoculados com as cepas de *T. cruzi* apresentaram evolução lenta, parasitemia baixa ou muito baixa, pico de parasitemia tardios, predominância de formas intermediárias ou largas ao longo da fase aguda e baixa mortalidade, compatíveis com um perfil de cepas de baixa virulência, *T. cruzi* Tipo II ou Biodema II;
- ❖ A taxa de mortalidade na primeira passagem sanguínea foi nula para a maioria dos camundongos infectados, exceto para a cepa 806, relativamente mais virulenta e que matou 62,5% dos animais. Entretanto esta mortalidade não foi observada ao longo das cinco passagens sucessivas em camundongos;
- ❖ Após cinco passagens sucessivas de quatro das seis cepas em camundongos, não foi verificado nenhum caso de mortalidade confirmando seu caráter de baixa virulência. Além disto, não foram observadas diferenças significativas quando as curvas de parasitemia obtidas na primeira passagem sanguínea foram comparadas com as obtidas após as passagens sucessivas o que reforça essa observação;
- ❖ A análise dos resultados obtidos pela técnica de isoenzimas revelou perfis de zimodema Z2 para todas as amostras isoladas das crianças e de suas mães, equivalentes aos observados nas análises dos perfis de rDNA 24S α e do gene Mitocondrial da Citocromo Oxidase, subunidade II (CO II), o que demonstra que todas as cepas pertencem ao grupo *T. cruzi* II, subgrupo 2b, , equivalente ao tipo II ou *T. cruzi* Tipo II ou Biodema II;
- ❖ A análise dos perfis dos cinco locos de microssatélites utilizada na caracterização das amostras de *T. cruzi* revelou a presença de um ou dois picos no eletrofluorograma indicando que todas são monoclonais, que há diferenças de perfis entre algumas delas; porém os resultados foram os mesmos entre as cepas de *T. cruzi* isoladas de cada par filho/mãe, o que sugere a possibilidade de ter havido transmissão congênita;
- ❖ Apesar do pequeno número de amostras estudadas, os dados sugerem que pelo menos na região em estudo, o grupo 2b foi predominante na região e parece claramente associado a cepas de baixa virulência equivalentes ao Biodema II corroborando dados de outros autores;
- ❖ Embora as todas as amostras de *T. cruzi* tenham apresentado o mesmo perfil genético foi observado que as crianças apresentaram predominantemente a forma indeterminada da doença, enquanto as mães eram cardíacas com diferentes graus de envolvimento. Estas observações sugerem que além da genética do parasito fatores do hospedeiro e/ou o tempo de infecção podem ser determinantes na evolução clínica da doença de Chagas;
- ❖ Estudos da morfologia, comportamento biológico e caracterização molecular de populações de *T. cruzi* isoladas de pacientes de uma dada zona endêmica são importantes no conhecimento do curso da infecção e das manifestações clínico-patológicas da doença de Chagas na região em estudo.

8.0 Perspectivas

- ❖ Tratamento com Benzonidazol dos camundongos Swiss, infectados com cepas isoladas das crianças e de suas mães, na fase aguda e crônica da infecção;
- ❖ Avaliações histopatológicas dos tecidos de camundongos Swiss tratados e não tratados na fase aguda e crônica da infecção;
- ❖ Acompanhar as alterações laboratoriais e clínicas das crianças após tratamento específico da doença de Chagas;
- ❖ Comparar a resposta quimioterápica experimental obtida em animais com a observada nas crianças;
- ❖ Verificar o impacto do tratamento na evolução clínica da doença;
- ❖ Comparar a evolução clínica das crianças com as mães que se encontram numa fase mais avançada da doença;

9.0 Referências Bibliográficas

- AGUILAR H.M., ABAD-FRANCH F., DIAS J.C., JUNQUEIRA A.C. & COURA J.R. (2007). Chagas disease in the Amazon region. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **102 Suppl 1**, 47-56.
- AGUILAR, H.M. (1988). Epidemiologia da doença de Chagas: Aspectos históricos, sociais e morbidade em duas áreas endêmicas de Minas Gerais, Brasil, Dissertação de mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- ANDRADE A.L., ZICKER F., DE OLIVEIRA R.M., ALMEIDA S.S., LUQUETTI A., TRAVASSOS L.R., ALMEIDA I.C., DE ANDRADE S.S., DE ANDRADE J.G. & MARTELLI C.M. (1996). Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* **348**, 1407-1413.
- ANDRADE S.G. (1985). Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* 39-46.
- ANDRADE S.G, CARVALHO M. L & FIGUEIRA R. M. (1970). Caracterização morfobiológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz.Méd.Bahia* 32-42.
- ANDRADE S.G. & ANDRADE Z. A. (1966). Estudo histopatológico comparativo das lesões produzidas por duas cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Hospital* 1268-1278.
- ANDRADE S.G. & 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. (1974). Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev.Pat.Trop.* 65-121.
- ANDRADE S.G. (1999). *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 185-187.
- ANDRADE S.G., FREITAS L.A., PEYROL S., PIMENTEL A.R. & SADIGURSKY M. (1991). Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. *Bull.World Health Organ* **69**, 191-197.
- ANDRADE S.G., MAGALHAES J.B. & PONTES A.L. (1985). Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull.World Health Organ*, **63**, 721-726.
- ANDRADE S.G., RASSI A., MAGALHAES J.B., FERRIOLLI F.F. & LUQUETTI A.O. (1992). Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **86**, 624-626.
- ANDRADE V., BRODSKYN C. & ANDRADE S.G. (1983). Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **77**, 796-799.

- ANDRADE Z.A., ANDRADE S.G., SADIGURSKY M., WENTHOLD R.J., Jr., HILBERT S.L. & FERRANS V.J. (1997a). The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **57**, 328-336.
- ANDRADE, A. L. S. S; ZICKER, F; OLIVEIRA, R. M; SILVA, A. S; LUQUETTI, A. O; TRAVASSOS, L.R; ALMEIDA, I.C; ANDRADE, S.S; ANDRADE, J.G; MARTELLI, C.M (1996). Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *The Lancet*, **348**: 1407-1413.
- AÑEZ N., CRISANTE G., DA SILVA F.M., ROJAS A., CARRASCO H., UMEZAWA E.S., STOLF A.M., RAMIREZ J.L. & 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 M.S., MARTINS-FILHO O.A., PEREIRA M.E. & BRENER Z. (2000). A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *J.Antimicrob.Chemother* **45**, 819-824.
- ASSIS G.F., AZEREDO B.V., CARBAJAL DE LA FUENTE AL, DIOTAIUTI L. & DE L.M. (2007). Domiciliation of *Triatoma pseudomaculata* in the Jequitinhonha Valley, State of Minas Gerais. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **40**, 391-396.
- ÁVILA H.A., PEREIRA J.B., THIEMANN O., DE P.E., DEGRAVE W., MOREL C.M. & SIMPSON L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J.Clin.Microbiol.* **31**, 2421-2426.
- 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**, p.211-222.
- BARNABÉ C., BRISSE S. & TIBAYRENC M. (2000). Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology* **120** (Pt 5), 513-526.
- BARNABÉ C., NEUBAUER K., SOLARI A. & TIBAYRENC M. (2001). *Trypanosoma cruzi*: presence of the two major phylogenetic lineages and of several lesser discrete typing units (DTUs) in Chile and Paraguay. *Acta Trop.* **78**, 127-137.

- BARRETT T.V., HOFF R.H., MILES M.A., GODFREY D.G., TEIXEIRA R., ALMEIDA DE SOUZA J.A. & SHERLOCK I.A. (1980). Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.* **74**, 84-90.
- BEN-ABDERRAZAK S., GUERRINI F., MATHIEU-DAUDE F., TRUC P., NEUBAUER K., LEWICKA K., BARNABE C. & TIBAYRENC M. (1993). Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. *Methods Mol.Biol.* **21**, 361-382.
- BERTELLI M.S. & BRENER Z. (1980). Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J.Parasitol.* **66**, 992-997.
- BICE D.E. & ZELEDON R. (1970). Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J.Parasitol.* **56**, 663-670.
- BOGLIOLO A.R., CHIARI E., SILVA-PEREIRA R.O. & SILVA-PEREIRA A.A. (1986). A comparative study of *Trypanosoma cruzi* enzyme polymorphism in South America. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **19**, 673-683.
- BORGES J.D., ASSIS G.F., GOMES L.V., DIAS J.C., PINTO I.D., MARTINS-FILHO O.A., TORRES R.M., VINAS P.A., BAHIA M.T., MACHADO-COELHO G.L. & LANA M. (2006). Seroprevalence of Chagas disease in schoolchildren from two municipalities of Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil; six years following the onset of epidemiological surveillance. *Rev.Inst.Med.trop.São Paulo* **48**, 81-86.
- BOSENSO M.F., BARNABE C., MAGALLON G.E., LOZANO K.F., RAMSEY J., ESPINOZA B. & BRENIERE S.F. (2002). Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *J.Clin.Microbiol.* **40**, 627-632.
- BRENER Z. & CHIARI E. (1963). Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Inst.Med.trop.São Paulo* **19**, 220-224.
- 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. (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**, 215-220.
- BRENER Z. (1977). Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *Scientific Publication* 11-21.
- BRENER Z. (1985). Host-parasite relations in Chagas disease: mechanisms of infection and disease. *Ann.Soc.Belg.Med.Trop.* **65** Suppl 1, 9-13.

- BRENER Z., CANCADO J.R., GALVAO L.M., DA LUZ Z.M., FILARDI L.S., PEREIRA M.E., SANTOS L.M. & CANCADO C.B. (1993). An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **88**, 149-153.
- BRENER Z., COSTA C.A. & CHIARI C. (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosom cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev.Inst.Med.trop.São Paulo* **18**, 450-455.
- BRENER Z.; CHIARI, E. & ALVARENGA, N.J. (1974). Observations on *Trypanosoma cruzi* strains maintained over an 8-year period in experimental inculcated mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **16** (1): 39-46.
- BRENIERE 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**, 289-295.
- BRENIERE S.F., BOSSENO M.F., TELLERIA J., BASTRENTA B., YACSIK N., NOIREAU F., ALCAZAR J.L., BARNABE C., WINCKER P. & TIBAYRENC M. (1998). Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. *Exp.Parasitol.* **89**, 285-295.
- BRENIÈRE SF, BOSSENO MF, 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.
- BRISSE S., BARNABE C. & TIBAYRENC M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int.J.Parasitol.* **30**, 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.* **31**, 1218-1226.
- BRITO C.M., LIMA M.M., SARQUIS O., PIRES M.Q., COUTINHO C.F., DUARTE R. & PACHECO R.S. (2008). Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* I isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer-polymerase chain reaction. *Parasitol.Res.* **103**, 1111-1117.
- BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; VANNI, C. M.; HASSLOCHER-MORENO, A.; XAVIER, S. S.; OELEMANN, W.; SANTORO, A.; PIRMEZ, C.; MOREL, C. M.; WINCKER, P. (1995). Polymerase chain reaction for detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitol.*, **110**, p.241-247.
- BRUMPT E. (1912). Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhisus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex boueti* e *Ornithodoros moubata*. *Bull.Soc.Path.Exót.* 360-367.

- BURGOS J.M., ALTCHER J., BISIO M., DUFFY T., VALADARES H.M., SEIDENSTEIN M.E., PICCINALI R., FREITAS J.M., LEVIN M.J., MACCHI L., MACEDO A.M., FREILIJ H. & SCHIJMAN A.G. (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int.J.Parasitol.* **37**, 1319-1327.
- BURGOS J.M., BEGHER S.B., FREITAS J.M., BISIO M., DUFFY T., ALTCHER J., TEIJEIRO R., LOPEZ A.H., DECCARLINI F., FREILIJ H., LEVIN M.J., LEVALLE J., MACEDO A.M. & SCHIJMAN A.G. (2005). Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **73**, 1016-1018.
- BUSCAGLIA C.A. & DI NOIA J.M. (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes.Infect.* **5**, 419-427.
- CALDAS I.S. (2008). Avaliação da eficácia do tratamento específico com Benznidazol na progressão da doença de Chagas Experimental e a correlação entre a eficácia do tratamento nos modelos canino e murino. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais.
- CAMANDAROBA E.L., CAMPOS R.F., MAGALHAES J.B. & ANDRADE S.G. (2001). Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **34**, 151-157.
- 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.
- CAMARGO, M.E.; DA SILVA, G.R; DE CASTILHO, E.A; SILVEIRA, A. C (1984). Inquérito sorológico da prevalência da infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *Revista do Instituto de Medicina. Tropical de São Paulo*, **26**: 192-204.
- CANÇADO J.R. (1985). Tratamento específico. In: Cardiopatia Chagásica, Cançado, J.R. e CHUSTER, M. *Fundação Carlos Chagas* 227-355.
- CARNEIRO M., CHIARI E., GONCALVES A.M., DA SILVA PEREIRA A.A., MOREL C.M. & 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. & CHIARI E. (1991). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **86**, 387-393.
- CAROD-ARTAL F.J. (2006). Chagas' disease and ischemic stroke. *Neurologia* **21**, 135-149.
- CASTELANNI, O.; RIBEIRO, L.V. & FERNANDES, J.F. (1967). Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J.Protozool.* **14(3)**:447-451.

- CHAGAS C. (1909). Nova tripanozomiase 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.
- CHIARI E. (1974). Infectivity of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes from cultures kept in laboratory for different periods of time. *Rev.Inst.Med.trop. São Paulo* **16**, 61-67.
- CHIARI E., DIAS J.C., LANA M. & CHIARI C.A. (1989). Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **22**, 19-23.
- CLARK C.G. & PUNG O.J. (1994). Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol.Biochem.Parasitol.* **66**, 175-179.
- CONARES, W. J. (1980). Pratical non parametric statistics. Jonh Wilwu & Sons. New York, 2ª ed., Chapter 6.
- CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS (2005). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **38**: 5-26.
- CORRALES R.M., MORA M.C., NEGRETTE O.S., DIOSQUE P., LACUNZA D., VIRREIRA M., BRENIERE S.F. & BASOMBRIO M.A. (2009). Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Infect.Genet.Evol.* **9**, 278-282.
- COURA J.R. & CASTRO S.L. (2002). A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 3-24.
- 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. & MILES M.A. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* **18**, 171-176.
- COUTO A.C. (2008). Caracterização molecular de populações de *Trypanosoma cruzi* isoladas de indivíduos do Vale do Jequitinhonha, MG. Trabalho de monografia, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais.
- DEANE M.P., KLOTZEL, J. & MILDNER, R. (1976). Polymorphism f *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst.Med.Trop.* 145-146.
- DEANE M.P., SOUSA M.A., PEREIRA N.M., GONCALVES A.M., MOMEN H. & MOREL C.M. (1984). *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. *J.Protozool.* **31**, 276-280.

- DEGRAVE W, FRAGOSO SP, BRITTO C, VAN HH, KIDANE GZ, CARDOSO MA, MUELLER RU, SIMPSON L, MOREL CM (1988). Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **27**, 63-70.
- DEVERA R., FERNANDES O. & COURA J.R. (2003). Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **98**, 1-12.
- DEVERA R., ILLARRAMENDI X., MONTOYA-ARAUJO R., PIRMEZ C., FERNANDES O. & 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.
- DI NOIA J.M., BUSCAGLIA C.A., DE MARCHI C.R., ALMEIDA I.C. & 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.
- DIAS J. & SCHOFIELD C. (1999). The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 103-121.
- DIAS J.C. (2006). Chagas disease: successes and challenges. *Cad.Saude Publica* **22**, 2020-2021.
- DIAS J.C. (2007). Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **102 Suppl 1**, 11-18.
- DIAS J.C., LOYOLA C.C. & BRENER S. (1985). Chagas' disease in Minas Gerais: current status and perspectives. *Rev.Bras.Malariol.Doencas.Trop.* **37**, 7-28.
- DIAS J.C., PRATA A. & 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., SILVEIRA A.C. & SCHOFIELD C.J. (2002b). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **97**, 603-612.
- DIAS J.C.P (1992). Epidemiology of Chagas disease (American trpanosomiasis): Its impact on Transfusion and Clinical Medicine. *ISBT*, São Paulo 49-80.
- DIAS J.C.P. (1982). Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Minas Gerais 401pp.
- DIAS J.C.P. (2000a). Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad. Saúde Publica* **16 Suppl 2**, 43-59.

- DIAS, J.C.P (2002). O controle da doença de Chagas no Brasil. In: Antônio Carlos da Silveira (ed). O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América. Ed. Faculdade de Medicina de Triângulo Mineiro, pp: 145-239.
- DIOSQUE P., BARNABE C., PADILLA A.M., MARCO J.D., CARDOZO R.M., CIMINO R.O., NASSER J.R., TIBAYRENC M. & BASOMBRIO M.A. (2003). Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. *Int.J.Parasitol.* **33**, 997-1003.
- DVORAK J.A. & HARTMAM D.L. (1980). *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *J.Protozool.* 472-474.
- FALLA A., HERRERA C., FAJARDO A., MONTILLA M., VALLEJO G.A. & GUHL F. (2009). Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop.* **110**, 15-21.
- FERNANDES O., MANGIA R.H., LISBOA C.V., PINHO A.P., MOREL C.M., ZINGALES B., CAMPBELL D.A. & JANSEN A.M. (1999a) The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* **118** (Pt 2), 161-166.
- FERNANDES O., SANTOS S., JUNQUEIRA A., JANSEN A., CUPOLILLO E., CAMPBELL D., ZINGALES B. & COURA J.R. (1999b). Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 195-197.
- FERNANDES O., SOUTO R.P., CASTRO J.A., PEREIRA J.B., FERNANDES N.C., JUNQUEIRA A.C., NAIFF R.D., BARRETT T.V., DEGRAVE W., ZINGALES B., CAMPBELL D.A. & COURA J.R. (1998). Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **58**, 807-811.
- FILARDI L.S. & 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.
- FREITAS J.M., AUGUSTO-PINTO L., PIMENTA J.R., BASTOS-RODRIGUES L., GONÇALVES O., MACEDO A.M., MACHADO C.R. & PENA S.D. (2006). Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 226-235.
- FREITAS J.M., LAGES-SILVA E., CREMA E., PENA S.D. & MACEDO A.M. (2005). Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int.J.Parasitol.* **35**, 411-417.

- GARCIA E.S. & DVORAK J.A. (1982). Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **31**, 259-262.
- GODFREY DG, KILGOUR V (1976). Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of Gambian trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **70**, 219-224.
- GUEDES P.M., VELOSO V.M., CALIARI M.V., CARNEIRO M., SOUZA S.M., LANA M., CHIARI E. & BAHIA M.T.G.L.M. (2007). *Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 149-147.
- HENRIKSSON J, ASLUND L, PETTERSSON U (1996). Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today* **12**, 108-114.
- HIGO H, MIURA S, HORIO M, MIMORI T, HAMANO S, AGATSUMA T, YANAGI T, CRUZ-REYES A, UYEMA N, ROJAS DE AA, MATTA V, AKAHANE H, HIRAYAMA K, TAKEUCHI T, TADA I, HIMENO K (2004). Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitol. Int.* **53**, 337-344.
- HOTEZ P.J., MOLYNEUX D.H., STILLWAGGON E., BENTWICH Z. & KUMARESAN J. (2006). Neglected tropical diseases and HIV/AIDS. *Lancet* **368**, 1865-1866.
- JUNQUEIRA A.C., DEGRAVE W. & BRANDAO A. (2005). Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends Parasitol.* **21**, 270-272.
- KOOPERLE F. (1962). Pathologic anatomy of enteromegaly in Chagas disease. *Bockus Alimni Internat. Soc. Gastroenterology (Proceedings)*, **2**: 92-110.
- LAGES-SILVA E., RAMIREZ L.E., PEDROSA A.L., CREMA E., DA CUNHA GALVAO L.M., JUNHO PENA S.D., MACEDO A.M. & CHIARI E. (2006). Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J.Clin.Microbiol.* **44**, 2167-2171.
- LANA M. & CHIARI C.A. (1986). Comparative biological characterization of Berenice and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from the same patient at different times. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **81**, 247-253.
- LANA M. & TAFURI W.L. (2000). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: Melo, AL; Genaro, O., Liardi, P.M. (eds). Editora Atheneu 73-96.
- LANA M., DA SILVEIRA P.A., BARNABE C., QUESNEY V., NOEL S. & TIBAYRENC M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp.Parasitol.* **90**, 20-25.

- LANA M., DA SILVEIRA P.A., BASTRENTA B., BARNABE C., NOEL S. & TIBAYRENC M. (2000). *Trypanosoma cruzi*: infectivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice. *Exp.Parasitol.* **96**, 61-66.
- LAURENT J.P., BARNABE C., QUESNEY V., NOEL S. & TIBAYRENC M. (1997). Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* **114** (Pt 3), 213-218.
- LAURIA-PIRES L., BOGLIOLO A.R. & TEIXEIRA A.R. (1996). Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients. II. Isozyme and RFLP characterizations. *Exp.Parasitol.* **82**, 182-190.
- LENZI H.L., CASTELO-BRANCO M.T., PELAJO-MACHADO M., OLIVEIRA D.N. & GATTASS C.R. (1998). *Trypanosoma cruzi*: compromise of reproductive system in acute murine infection. *Acta Trop.* **71**, 117-129.
- LUQUETTI A.O., MILES M.A., RASSI A., DE REZENDE J.M., DE SOUZA A.A., POVOA M.M. & RODRIGUES I. (1986). *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **80**, 462-470.
- MACEDO A.M. & PENA S.D. (1998). Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol.Today* **14**, 119-124.
- MACEDO A.M., MACHADO C.R., OLIVEIRA R.P. & PENA S.D. (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **99**, 1-12.
- MACEDO A.M., MARTINS M.S., CHIARI E. & PENA S.D. (1992). DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol.Biochem.Parasitol.* **55**, 147-153.
- MACEDO A.M., OLIVEIRA R.P. & PENA S.D. (2002). Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert.Rev.Mol.Med.* **4**, 1-16.
- MACEDO A.M., PIMENTA J.R., AGUIAR R.S., MELO A.I., CHIARI E., ZINGALES B., PENA S.D. & OLIVEIRA R.P. (2001). Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **96**, 407-413.
- MARCILI A., VALENTE V.C., VALENTE S.A., JUNQUEIRA A.C., DA SILVA F.M., PINTO A.Y., NAIFF R.D., CAMPANER M., COURA J.R., CAMARGO E.P., MILES M.A. & TEIXEIRA M.M. (2009). *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.
- MARQUES DE ARAÚJO S., 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.

- MARTINEZ-DIAZ R.A., ESCARIO J.A., NOGAL-RUIZ J.J. & GOMEZ-BARRIO A. (2001). Relationship between biological behavior and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **96**, 251-256.
- 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. & 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.
- 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. & LANA M. (2006). *Trypanosoma cruzi*: Impact of dual-clone infections on parasite biological properties in BALB/c mice. *Exp.Parasitol.* **112**, 237-246.
- MARTINS L.P., CASTANHO R.E., DA ROSA J.A., DA SILVA L.C., DE GODOY C.A. & ROSA R.M. (2003). Biological and histopathological characterization together with nucleic acids analysis of a *Trypanosoma cruzi* strain from Marília, São Paulo State. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **36**, 35-39.
- MELO R.C. & BRENER Z. (1978). Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J.Parasitol.* **64**, 475-482.
- MILES M.A., APT B.W., WIDMER G., POVOA M.M. & SCHOFIELD C.J. (1984). Isozyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **78**, 526-535.
- MILES M.A., DE SOUZA A.A. & POVOA M. (1981). Chagas' disease in the Amazon basin III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belem, Para State, Brazil. *J.Med.Entomol.* **18**, 266-278.
- MILES M.A., FELICIANGELI M.D. & DE ARIAS A.R. (2003). American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* **326**, 1444-1448.
- MILES M.A., LANHAM S.M., DE SOUZA A.A. & POVOA M. (1980). Furtherenzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**, 221-237.
- 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**, 819-821.
- MILES M.A., TOYE P.J., OSWALD S.C. & GODFREY D.G. (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **71**, 217-225.

- MOMEN H. (1999). Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 181-184.
- MONCAYO A. (1999). Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 401-404.
- MONCAYO A. (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98**, 577-591.
- MONTAMAT E.E., DE LUCA D'ORO G.M., GALLERANO R.H., SOSA R. & BLANCO A. (1996). Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: correlation with clinical picture. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **55**, 625-628.
- MONTILLA MM, GUHL F, JARAMILLO C, NICHOLLS S, BARNABÉ C, BOSSENO MF, BRENIÈRE SF (2002). Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**, 394-400.
- MONTOYA R., DIAS J.C. & COURA J.R. (2003). Chagas disease in a community in southeast Brazil. I. A serologic follow-up study on a vector controlled area. *Rev.Inst.Med.trop. São Paulo* **45**, 269-274.
- MONTOYA, R.A. (1998). Morbidade da doença de Chagas no município de Berilo, Minas Gerais, Brasil. Estudos seccional e longitudinal da cardiopatia chagásica crônica (1987-1997). Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 153pp.
- MOREL C. & SIMPSON L. (1980). 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. & SIMPSON L. (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **77**, 6810-6814.
- MURTA S.M., GAZZINELLI R.T., BRENER Z. & ROMANHA A.J. (1998). Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benzimidazole and nifurtimox. *Mol.Biochem.Parasitol.* **93**, 203-214.
- NEW YORK HEART ASSOCIATION – NYHA (1973), Nomenclature and criteria for diagnosis of disease of the heart and great vessels. 7th. Ed. Little and Brown Company, Boston.
- NUSSEINZWEIG V.e.G.F. (1966). Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. *Exp.Parasitol.* 224-230.

- NUSSENZWEIG V., DEANE L.M. & KLOETZEL J. (1962). Difference in the antigenic composition of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from man and opossums. (Preliminary note). *Rev.Inst.Med.trop. São Paulo* **4**, 409-410.
- OLIVEIRA EC, STEFANI MMA, CAMPOS DE, ANDRADE ALSS, SILVA SA, RASI A, LUQUETTI AO. (1997). *Trypanosoma cruzi* stocks isolated from acute Chagas disease patient lead to lethal murine infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **91**:25-27.
- OLIVEIRA R.P., BROUDE N.E., MACEDO A.M., CANTOR C.R., SMITH C.L. & PENA S.D. (1998). Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 3776-3780.
- OLIVEIRA R.P., MELO A.I., MACEDO A.M., CHIARI E. & PENA S.D. (1999). The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 65-70.
- PIZZI T. (1953). The problem of the slender forms of *Trypanosoma cruzi*. *Bol.Inf.Parasit.Chil.* **8**, 26-30.
- PRATA A. (1999). Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 81-88.
- PRATA A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect.Dis.* **1**, 92-100.
- RAMIREZ J.L. & GUEVARA P. (1987). The ribosomal gene spacer as a tool for the taxonomy of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **22**, 177-183.
- RASSI A. (1982). Etiological treatment of Chagas' disease. *Arq Bras.Cardiol.* **38**, 277-281.
- REVOLLO S., OURY B., LAURENT J.P., BARNABE C., QUESNEY V., CARRIERE V., NOEL S. & TIBAYRENC M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp.Parasitol.* **89**, 30-39.
- REZENDE J.M. & MOREIRA H. (1976). Megacolon chagásico. In: Porto, JAF, ed. *Clínica das doenças intestinais*. Atheneu 481-474.
- ROMANHA A.J., DA SILVA PEREIRA A.A., CHIARI E. & KILGOUR V. (1979). Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp Biochem.Physiol B* **62**, 139-142.
- ROMANHA, A. J. (1982). Heterogeneidade enzimática em *Trypanosoma cruzi*. Tese de doutorado , Belo Horizonte, UFMG, p. 110.

- 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **77**, 647-653.
- RUSSOMANDO, G; TOMASSONE, M. M. C de; GUILLEN, de. I; ACOSTA, N; VERA, N; ALMIRON, M; CANDIA, N; CALCENA, M, F; and FIGUEREDO, A. (1998). Treatment of congenital Chagas disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **59**: 487-491.
- SANCHEZ G., WALLACE A., OLIVARES M., DIAZ N., AGUILERA X., APT W. & SOLARI A. (1990). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodemes: in vitro differentiation of epimastigotes and infectivity of culture metacyclic trypomastigotes to mice. *Exp.Parasitol.* **71**, 125-133.
- SANCHEZ-GUILLEN M.C., BERNABE C., TIBAYRENC M., ZAVALA-CASTRO J., TOTOLHUA J.L., MENDEZ-LOPEZ J., GONZALEZ-MEJIA M.E., TORRES-RASGADO E., LOPEZ-COLOMBO A. & PEREZ-FUENTES R. (2006). *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **101**, 585-590.
- SANTOS L.S. (2008). Avaliação do perfil de IgG e subclasses de IgG de pacientes portadores de infecção chagásica do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais.
- SCHLEMPER Jr. BR (1982). Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- SCHMUNIS G.A., ZICKER F. & MONCAYO A. (1996). Interruption of Chagas disease transmission through vector elimination. *The Lancet* 1171.
- SCHOFIELD C.J. & DIAS J.C. (1991). A cost-benefit analysis of Chagas disease control. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **86**, 285-295.
- SCHOFIELD C.J. & DIAS J.C. (1999). The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv.Parasitol.* **42**, 1-27.
- SCHOFIELD C.J., JANNIN J. & SALVATELLA R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* **22**, 583-588.
- SHLOMAI J. (1994). The assembly of kinetoplast DNA. *Parasitol.Today* 10, 341-346.
- SILVA L.H.P (1959). Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Inst.Méd.Trop. São Paulo* 99-118.

- SILVA L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia Clin.Biol.* 191-203.
- SILVEIRA C.A., CASTILLO E. & CASTRO C. (2000). Evaluation of an specific treatment for *Trypanosoma cruzi* in children, in the evolution of the indeterminate phase. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **33**, 191-196.
- SILVEIRA J.F. (2000). Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z., Andrade Z.A. (2000). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan 127-152.
- SOLARI A., CAMPILLAY R., ORTIZ S. & WALLACE A. (2001). Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp.Parasitol.* **97**, 226-233.
- SOLARI A., MUNOZ S., VENEGAS J., WALLACE A., AGUILERA X., APT W., BRENIERE S.F. & TIBAYRENC M. (1992). Characterization of Chilean, Bolivian, and Argentinian *Trypanosoma cruzi* populations by restriction endonuclease and isoenzyme analysis. *Exp.Parasitol.* **75**, 187-195.
- SOLARI A., WALLACE A., ORTIZ S., VENEGAS J. & SANCHEZ G. (1998a). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean insect vectors. *Exp.Parasitol.* **89**, 312-322.
- SOSA E.S., S; SEGURA, E.L. (2006). Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. *Current Opinion in Infectious Disease*, **19**: 583-587.
- SOSA E.S., SEGURA E.L., RUIZ A.M., VELAZQUEZ E., PORCEL B.M. & YAMPOTIS C. (1998) Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **59**, 526-529.
- SOUSA O.E., SAMUDIO F., DE J.C. & CALZADA J.E. (2006). Molecular characterization of human *Trypanosoma cruzi* isolates from endemic areas in Panama. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **101**, 455-457.
- SOUTO R.P. & ZINGALES B. (1993). Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62**, 45-52.
- SOUTO R.P., FERNANDES O., MACEDO A.M., CAMPBELL D.A. & ZINGALES B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **83**, 141-152.
- STEINDEL M., DIAS N.E., DE MENEZES C.L., ROMANHA A.J. & SIMPSON A.J. (1993). Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol.Biochem.Parasitol.* **60**, 71-79.

- STURM N.R., DEGRAVE W., MOREL C. & SIMPSON L. (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**, 205-214.
- TEIXEIRA, M.G.M; BORGES-PEREIRA, J; COURA, J.R; PERALTA, J.M (1994). Avaliação de testes sorológicos aplicados na detecção de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, **30**: 133-139.
- TELLEZ-MENESES J., MEJIA-JARAMILLO A.M. & TRIANA-CHAVEZ O. (2008). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from domestic and sylvatic vectors in Sierra Nevada of Santa Marta, Colombia. *Acta Trop.* **108**, 26-34.
- TIBAYRENC M. & AYALA F.J. (1988). Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution* 277-292.
- TIBAYRENC M. & BRENIERE S.F. (1988). *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **83 Suppl 1**, 249-255.
- TIBAYRENC M. (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.* **36**, 47-115.
- TIBAYRENC M. (1998). Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **93**, 577-580.
- TIBAYRENC M. (2003). Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid.Biol.Dis.* **2**, 12.
- TIBAYRENC M., NEUBAUER K., BARNABE C., GUERRINI F., SKARECKY D. & AYALA F.J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 1335-1339.
- TIBAYRENC M., WARD P., MOYA A. & AYALA F.J. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 115-119.
- TOLEDO M.J., BAHIA M.T., CARNEIRO C.M., MARTINS-FILHO O.A., TIBAYRENC M., BARNABE C., TAFURI W.L. & DE L.M. (2003). Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**, 223-230.

- TOLEDO M.J., BAHIA M.T., VELOSO V.M., CARNEIRO C.M., MACHADO-COELHO G.L., ALVES C.F., MARTINS H.R., CRUZ R.E., TAFURI W.L. & LANA M. (2004a). Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *J.Antimicrob.Chemother.* **53**, 1045-1053.
- TOLEDO M.J., DE L.M., CARNEIRO C.M., BAHIA M.T., MACHADO-COELHO G.L., VELOSO V.M., BARNABE C., TIBAYRENC M. & TAFURI W.L. (2002). Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp.Parasitol.* **100**, 161-172.
- TOLEDO M.J.O., TAFURI W.L., BAHIA M.T., TIBAYREC M. & E LANA M. (2004b). Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Antimicrob.Agents e Chemother* 11-22.
- 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 Sourthern analyses. *Parasitol.* 161-168.
- TOYÉ, P. J. (1974). Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **68**, 147.
- VAGO A.R., ANDRADE L.O., LEITE A.A., D'AVILA R.D., MACEDO A.M., ADAD S.J., TOSTES S JR, MOREIRA M.C., FILHO G.B. & PENA S.D. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am.J.Pathol.* **156**, 1805-1809.
- VAGO A.R., MACEDO A.M., OLIVEIRA R.P., ANDRADE L.O., CHIARI E., GALVAO L.M., REIS D., PEREIRA M.E., SIMPSON A.J., TOSTES S. & PENA S.D. (1996). Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am.J.Pathol.* **149**, 2153-2159.
- VALADARES H.M., PIMENTA J.R., DE FREITAS J.M., DUFFY T., BARTHOLOMEU D.C., OLIVEIRA R.P., CHIARI E., MOREIRA M.C., FILHO G.B., SCHIJMAN A.G., FRANCO G.R., MACHADO C.R., PENA S.D. & MACEDO A.M. (2008). Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int.J.Parasitol.* **38**, 839-850.
- VELOSO V.M., ROMANHA A.J., LANA M., MURTA S.M., CARNEIRO C.M., ALVES C.F., BORGES E.C., TAFURI W.L., MACHADO-COELHO G.L., CHIARI E. & BAHIA M.T. (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.
- VIANNIA G. (1911). Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Moléstia de Carlos Chagas". *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 276-294.
- VINHAES, M. e DIAS, J.C.P. (2000). Chagas disease in Brazil. Caderno de Saúde Pública. **16**: 7-12.

- VIRREIRA M., ALONSO-VEGA C., SOLANO M., JIJENA J., BRUTUS L., BUSTAMANTE Z., TRUYENS C., SCHNEIDER D., TORRICO F., CARLIER Y. & SVOBODA M. (2006). Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **75**, 871-879.
- VIRREIRA M., TRUYENS C., ALONSO-VEGA C., BRUTUS L., JIJENA J., TORRICO F., CARLIER Y. & SVOBODA M. (2007). Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **77**, 102-106.
- WESTENBERGER S.J., STURM N.R. & CAMPBELL D.A. (2006). *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. *Int.J.Parasitol.* **36**, 337-346.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1991). Control of Chagas disease. Report of a Expert Committee. *WHO Technical Report Series* **811**, p. 95.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2002). Report of the Expert Committee on the Control of Chagas disease. *Technical Report Series* **905**, p.85.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 2007. Report of scientific group in Chagas disease. Buenos Aires, Argentina, April 17-20, 2005.Update July 2007.
- ZALLOUM L., GOMES M.L., KINOSHITA A.T., TOLEDO M.J., PRIOLI A.J. & DE ARAUJO S.M. (2005). *Trypanosoma cruzi*: two genetic groups in Parana state, Southern Brazil. *Exp.Parasitol.* **111**, 55-58.
- ZINGALES B., STOLF BS, SOUTO RP, FERNANDES O, BRIONES MR (1999). Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 159-164.
- ZINGALES B., SOUTO R.P., MANGIA R.H., LISBOA C.V., CAMPBELL D.A., COURA J.R., JANSEN A. & 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.

10.0 Anexos

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu,ou meu responsável..... tenho conhecimento de minha participação como voluntário no projeto de pesquisa "Inquérito sorológico sobre doença de Chagas no municípios de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, antes e após a implantação da vigilância epidemiológica" desenvolvido sob a responsabilidade da Pesquisadora: Dra. Marta de Lana da Universidade Federal de Ouro Preto e do médico, endereço....., telefone.....que tem como objetivo realizar um inquérito sorológico sobre a doença de Chagas em escolares, diagnóstico e tratamento dos casos positivos. A doença de Chagas é uma doença crônica degenerativa, de evolução lenta que atinge especialmente o coração (aumento da área cardíaca, insuficiência cardíaca, risco de morte súbita) e o trato gastro-intestinal (megaesôfago e megacólon). O tratamento será feito com o Rochagan (benznidazol), em esquema prolongado, 5 a 10 mg/kg/dia, via oral, durante 60 dias consecutivos, sob supervisão médica e controle da leucometria.

A minha participação é voluntária e será restrita a doação de sangue para diagnóstico, isolamento do parasita, recebimento de tratamento com benznidazole (Rochagan) e controle de cura da infecção. O sangue será coletado por picada na polpa digital (inquérito sorológico em escolares), por via endovenosa (confirmação do diagnóstico da doença de Chagas, controle de cura pela sorologia e PCR), ou para realização da hemocultura (diagnóstico parasitológico e isolamento do parasita antes do tratamento) utilizando seringa e agulha estéreis e descartáveis, ou seja, de uso individual e seguro. O volume de sangue a ser coletado poderá variar de 3ml e no caso da hemocultura, de 30 ml em função do peso do paciente.

Fui informado que caso se confirme o meu diagnóstico para doença de Chagas me será oferecido tratamento em função de meu quadro clínico, o qual poderá acarretar ou não a cura da doença. Estou também informado que o tratamento causa efeitos colaterais que devem ser comunicados ao meu médico para o devido controle ou mesmo interrupção do tratamento, se necessário.

Tenho consciência que a minha participação como voluntário não me trará nenhum benefício financeiro. Os exames de procedimentos aplicados serão gratuitos e receberei atenção médica adequada para o controle dos efeitos adversos que possam ocorrer em consequência do tratamento e também para verificar se houve cura da infecção.

Poderei a qualquer momento me retirar do projeto de pesquisa por qualquer motivo, o que pode acarretar prejuízo no efeito do tratamento. Isto não implica na interrupção de meu atendimento pelo meu médico no tocante à doença de Chagas. Tal procedimento também não acarretará em prejuízos a outros pacientes ou membros de minha família. Um eventual corte de recursos do projeto não acarretará interrupção de meu tratamento e nem de meu atendimento por meu médico.....tel:.....no tocante à doença de Chagas.

Local e data:

Assinatura do voluntário ou seu responsável:

Assinatura do pesquisador responsável:

Assinatura do médico responsável:

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)