




UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS (MIP/PPGMPA)

TATIANA DA SILVA FONSECA



**CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *Trypanosoma cruzi*
ISOLADAS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS EM
ACOMPANHAMENTO NO INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA
EVANDRO CHAGAS (IPEC-FIOCRUZ)**

NITERÓI

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

TATIANA DA SILVA FONSECA

**CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *Trypanosoma cruzi*
ISOLADAS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS EM
ACOMPANHAMENTO NO INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA
EVANDRO CHAGAS (IPEC-FIOCRUZ)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação *Stricto sensu* em Microbiologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal
Fluminense, como requisito parcial para obtenção
do Grau de Mestre.

Orientadores: Prof^a Dra Maria Auxiliadora de Sousa
Doutora em Biologia Parasitária
Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ

Prof. Dr. Otílio Machado Pereira Bastos
Doutor em Biologia Parasitaria
Universidade Federal Fluminense/UFF

NITERÓI

2010

Fonseca, Tatiana da Silva.

Caracterização de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos em acompanhamento no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC-FIOCRUZ) / Tatiana da Silva Fonseca. – Niterói: Abril, 2010.

105 f. (21x29,7 cm).; 20 fig; 10 tab.; 4 gráficos, 2 anexos (artigos).

Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal Fluminense, 2010.

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Hemoculturas. 4. Caracterização Morfobiológica. 5. Caracterização Bioquímica. 6. Caracterização Molecular. 7. Variabilidade intraespecífica.

TATIANA DA SILVA FONSECA

CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *Trypanosoma cruzi*
ISOLADAS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS EM
ACOMPANHAMENTO NO INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA
EVANDRO CHAGAS (IPEC-FIOCRUZ)

Monografia apresentada ao Programa de Pós
Graduação *Stricto sensu* em Microbiologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal
Fluminense, como requisito final para obtenção do
Grau de Mestre.

Aprovada em Abril de 2010:

BANCA EXAMINADORA:

PROF. DR. OTÍLIO MACHADO PEREIRA BASTOS – ORIENTADOR
UFF

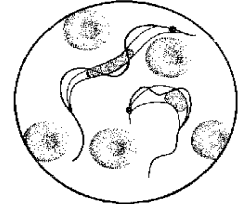
DRA. MARIA AUXILIADORA DE SOUSA – ORIENTADORA
FIOCRUZ / IOC

DRA. ÂNGELA HAMPSHIRE C. LOPES
UFRJ

NITERÓI
2010



FIOCRUZ - IOC



CT-IOC

Este trabalho foi realizado na Coleção de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, sob a orientação da Dra. Maria Auxiliadora de Sousa e do Dr. Otílio Machado Pereira Bastos.

O presente projeto foi aprovado pelo Colegiado Técnico Científico do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas e pelo Comitê de ética da FIOCRUZ sob o número 0050.0.009.000-05.

Dedico este trabalho aos meus **pais**,
irmã e meu **marido**,
por todo amor e incentivo.

Aos meus orientadores **Dora** e **Otílio**, pelas orientações e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Fluminense pela realização do trabalho e auxílio financeiro.

À Prof^a. Dra. Maria Auxiliadora de Sousa (Dora) pela orientação tão valiosa, pelo aprendizado científico e oportunidade de realização deste trabalho. Pelas cobranças que me fizeram crescer enquanto profissional. Por ter sido amiga, pela credibilidade, pela atenção, pelo estímulo, apoio e carinho.

Ao Prof. Dr. Otílio Machado Pereira Bastos pelos ensinamentos transmitidos, pela oportunidade, incentivo, compreensão, sugestões e conselhos no desenvolvimento deste trabalho. Pela experiência e pelo aprendizado humano e profissional que tem me proporcionado.

Ao Fabrício, por me amar, incentivar e apoiar meu crescimento profissional. Por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus pais por todo apoio e carinho, por transmitir grandes valores que levaram as várias conquistas importantes e a superar diversas dificuldades ao longo dos caminhos percorridos.

À minha amada irmã pelo apoio, incentivo, cuidado, força, confiança e carinho.

À Nágila, Jean Marc e Dra. Maria Auxiliadora pela correção do resumo em língua estrangeira (Inglês).

À Prof. Dra. Cláudia Uchôa, pela orientação e formação no estágio docente.

À direção do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas pela disponibilização de sangue dos pacientes para a realização deste trabalho.

À amiga Barbara, pela amizade, companheirismo, conhecimentos compartilhados, ensinamentos, sugestões e oportunidade de convivência.

À amiga Sheila pela ajuda em vários momentos deste trabalho, em especial com os desenhos em câmara clara, pelo apoio, amizade e agradável convivência.

À querida Edna, pela presteza, conselhos, amizade. Pelas colaborações na coloração de lâminas.

Ao Laboratório de Imunomodulação, por disponibilizar o microscópio com captura de imagens.

Ao Prof. Luiz Escoffier e ao Dr. Adeilton Brandão pelo auxílio na caracterização molecular.

Ao Laboratório de Micologia, na pessoa da Dra. Cíntia Borba, por ceder a infraestrutura para a realização da PCR.

Ao Laboratório Nacional e Internacional de Referência em taxonomia de Triatomíneos do IOC/FIOCRUZ por disponibilizar os barbeiros.

Aos meus colegas do curso, pela convivência prazerosa e companheirismo durante esses dois anos.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas (MIP/PPGMPA) pelos conhecimentos valiosos que se fizeram necessários para a realização deste trabalho.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas, em especial ao Prof. Jefferson Carvalho Paes, pela paciência, suporte e por todo incentivo e preocupação. Por zelar pela qualidade do curso.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Há homens que lutam um dia, e são bons; há homens que lutam por um ano, e são melhores; há homens que lutam por vários anos, e são muito bons; há outros que lutam durante toda a vida, esses são imprescindíveis.”

(Bertolt Brecht)

RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Histórico da doença de Chagas	18
1.2. A doença de Chagas: fases de infecção e formas clínicas	19
1.3. Epidemiologia	23
1.4. O parasita: <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
1.4.1. Classificação taxonômica	27
1.4.2. Ciclo evolutivo	29
1.4.3. Caracterização do parasito	31
1.4.3.1. Caracterização morfológicas.....	31
1.4.3.2. Caracterização bioquímica	37
1.4.3.3. Caracterização molecular	39
1.4.4. Variabilidade intraespecífica.....	41
2. JUSTIFICATIVA	45
3. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivo geral	46
3.2. Objetivos específicos	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1. Isolados estudados	47
4.2. Manutenção das hemoculturas de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	48
4.3. Caracterização morfológica.....	48
4.3.1. Análise do padrão diferenciação celular	48
4.3.1.1. Experimento de infecção de inseto vetor com um isolado de paciente chagásico	49
4.3.2. Parâmetro biométrico	50
4.4. Caracterização bioquímica	51
4.5. Caracterização molecular	53
4.5.1. Extração do DNA	53
4.5.2. Análise dos produtos de amplificação do kDNA dos minicírculos	53
4.5.3. Análise dos produtos de amplificação pelo gene de mini-exon	54
4.6. Análise numérica computacional para agrupamento de amostras	56

5. RESULTADOS	57
5.1. Manutenção das hemoculturas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
5.2. Caracterização morfológica	57
5.2.1. Análise do padrão de diferenciação celular	57
5.2.2. Análise biométrica	58
5.3. Caracterização bioquímica	64
5.4. Caracterização molecular	65
5.4.1. Análise dos produtos de amplificação do kDNA dos minicírculos	65
5.4.2. Análise dos produtos de amplificação pelo gene de mini-exon	66
5.5. Análise numérica computacional	67
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÕES	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
9. ANEXOS	85

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Descrição	Pág.
Figura 1	Primeiro caso humano da Doença de Chagas.	19
Figura 2	Criança com Sinal de Romana.	21
Figura 3	Radiografia de um paciente chagásico com cardiomegalia.	22
Figura 4	Forma digestiva da doença de Chagas.	22
Figura 5	Distribuição geográfica de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	24
Figura 6	Principais espécies de <i>triatomíneos</i> transmissores de <i>Trypanosoma cruzi</i> no Brasil.	25
Figura 7	Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> no vertebrado.	31
Figura 8	Formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> no tecido cardíaco.	32
Figura 9	Forma epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em meio de cultivo axênico.	32
Figura 10	Formas sanguícolas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	33
Figura 11	<i>Trypanosoma cruzi</i> em glândula anal de <i>Didelphis marsupiali</i> .	34
Figura 12	Sistema artificial de alimentação de barbeiros.	49
Figura 13	Parâmetros biométricos para estudo de tripanossomas utilizados na Coleção de Tripanossomatídeos.	51
Figura 14	Imagem ilustrando a amplificação do gene de mini-exon através da técnica de PCR multiplex.	55
Figura 15	Estágios evolutivos representativos dos isolados obtidos de pacientes chagásicos crônicos em culturas axênicas.	59
Figura 16	Estágios evolutivos representativos dos isolados obtidos de pacientes chagásicos crônicos em culturas axênicas. Desenhos em câmara clara.	60
Figura 17	Diagrama representativo do padrão isoenzimático dos isolados obtidos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas e das cepas	65

	de referência de <i>T. cruzi</i> .	
Figura 18	Produto do kDNA amplificado por PCR (primers 121 e 122) apresentado pelos isolados obtidos de pacientes chagásicos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.	66
Figura 19	Produto de amplificação pelo gene de mini-exon apresentado pelos isolados obtidos de pacientes chagásicos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas e cepas de referência de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	66
Figura 20	Fenograma de similaridade global utilizando algoritmo de agrupamento de Similaridade Global (SM) de isolados obtidos de pacientes chagásicos crônicos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.	68

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Descrição	Pág.
Tabela 1	<i>Primers</i> para detecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	39
Tabela 2	Nomenclatura 2009 para subgrupos de amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	41
Tabela 3	Diversidade intraespecífica de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	42
Tabela 4	Dados dos pacientes chagásicos em acompanhamento no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.	47
Tabela 5	Parâmetros utilizados para codificação de caracteres para processamento computacional.	56
Tabela 6	Diferenciação celular dos isolados obtidos de pacientes chagásicos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.	58
Tabela 7	Análise morfométrica dos isolados de <i>Trypanosoma cruzi</i> provenientes de pacientes chagásicos crônicos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.	63
Tabela 8:	Análise estatística (T-Test) dos dados biométricos do eixo longitudinal do cinetoplasto de epimastigotas.	64
Tabela 9	Análise estatística (T-Test) dos dados biométricos do comprimento total de tripomastigotas.	64
Tabela 10	Codificação de caracteres selecionados dos isolados IPEC e cepas de referência de <i>Trypanosoma cruzi</i> para processamento computacional usando o índice de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento de UPGMA.	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Padrão de diferenciação celular das amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtidas de pacientes chagásicos crônicos, cultivadas em NNN+LIT 20% SFB.	61
Gráfico 2	Padrão de diferenciação celular das amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtidas de pacientes chagásicos crônicos, cultivadas em LIT.	61
Gráfico 3	Padrão de diferenciação celular da amostra 537 em <i>Triatoma infestans</i> .	62
Gráfico 4	Padrão de diferenciação celular em cepas de referência de <i>Trypanosoma cruzi</i> (Y, CL Brener, Dm28c, F).	62

RESUMO

No presente trabalho foram estudados nove isolados de *Trypanosoma cruzi* obtidos por hemoculturas de pacientes chagásicos crônicos em acompanhamento no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC, FIOCRUZ). Estes pacientes procederam de diferentes regiões do Brasil (BA, PE, MG, PB e RS). Três deles apresentavam a forma clínica cardíaca, e os demais sintomatologia indeterminada. Os objetivos deste estudo foram: a) caracterizar estes isolados utilizando técnicas parasitológicas, bioquímicas e moleculares; b) identificar afinidades entre estes isolados e cepas de referência de *T. cruzi*; c) verificar a possibilidade de correlações destes isolados com subgrupos de *T. cruzi* identificados pelas técnicas acima citadas, além das formas clínicas obtidas pelos pacientes. Os nove isolados cresceram a 27°C cultivados em meio monofásico (LIT) ou bifásico (NNN+LIT suplementado com 20% SFB) e receberam números-código diferentes na Coleção de Tripanossomatídeos (CT-IOC). Todos foram estudados por parâmetros morfobiológicos (diferenciação celular e biometria), bioquímicos (perfil eletroforético de isoenzimas) e moleculares (produtos de amplificação por PCR de sequências de minicírculos do kDNA e genes de mini-exons). Cepas de referência de *T. cruzi* da Coleção de Tripanossomatídeos foram incluídas no trabalho para comparação. Com exceção de um isolado, as amostras em estudo foram capazes de crescer em meio LIT, característica comum entre cepas/clones de *T. cruzi*. Todas cresceram em NNN+LIT. Em meio LIT, apenas quatro amostras completaram a metaciclogênese; três outras só o fizeram em NNN+LIT, enquanto uma não produziu metacíclicos nas condições examinadas, mas o fez em triatomíneos. As análises morfológicas e biométricas dos nove isolados confirmaram sua identidade como *T. cruzi* considerando-se estágios evolutivos observados, comprimento total de tripomastigotas e dimensões dos cinetoplastos de epimastigotas. As nove amostras compartilharam padrão isoenzimático com três das cepas de referência de *T. cruzi* incluídas neste trabalho, evidenciando-se zimodemas distintos entre as amostras analisadas, sendo seis delas associadas à cepa Y (Z2), duas ao clone CL Brener (ZB) e uma ao Dm28c (Z1). Todas as amostras geraram um produto amplificado de 330pb através da análise de minicírculos, confirmando sua identificação específica. Os produtos amplificados pelo gene de mini-exon evidenciaram que oito amostras poderiam ser classificadas no subgrupo Tc II e apenas uma no Tc I. Entretanto duas amostras do subgrupo Tc II, foram reclassificadas no Tc VI considerando a mais recente proposta de subdivisão em *T. cruzi*. No momento, não foi possível identificar correlações estritas entre as características dos isolados e formas clínicas da doença de Chagas, porém, três amostras obtidas de pacientes com a forma cardíaca foram classificadas no subgrupo Tc II.

Palavras chaves: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Hemoculturas. Culturas axênicas. Morfologia. Biometria. Metaciclogênese. Isoenzimas. Reação em Cadeia da Polimerase. Minicírculos do kDNA. Gene de mini-exon. Variabilidade intraespecífica. Subgrupos de *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

In this research, nine *Trypanosoma cruzi* stocks were analyzed by different approaches. These isolates had been obtained by hemoculture from chronic chagasic patients under ambulatory care at Evandro Chagas Research Institute (IPEC, FIOCRUZ), who proceeded from different Brazilian States (BA, PE, MG, PB and RS). Three patients presented cardiac disease and the others indeterminate clinical form. The aims of this study were the following ones: a) to characterize these stocks by using parasitological, biochemical and molecular techniques; b) to search for affinities among them and *T. cruzi* reference strains; c) to verify possible correlations among these isolates and parasite subgroups, besides clinical forms presented by the patients. The nine stocks under study were maintained at 27°C in monophasic (LIT) and/or in biphasic media (NNN+LIT supplemented with 20% fetal calf serum). Thereafter, each one received a code-number at the Trypanosomatid Collection of Oswaldo Cruz Institute (CT-IOC). All of them were studied by morphological and biological parameters (cell differentiation and biometry), as well as by biochemical (isoenzyme electrophoresis) and molecular approaches (amplified products from kDNA minicircle and mini-exon gene sequences by polymerase chain reaction). *Trypanosoma cruzi* reference strains from CT-IOC were also included in this work for comparisons. Excepting one stock, all the others grew well in LIT medium, a common feature of *T. cruzi* strains/clones. Otherwise, all isolates grew in NNN+LIT. Four stocks could rise to metacyclic stages in LIT medium; whereas others (4) only differentiated in NNN+LIT. One stock produced metacyclics solely in the gut of triatomine bugs. The identification of the nine isolates as *T. cruzi* was also confirmed by the morphological features of their evolutive stages, besides the total length of the trypomastigotes and size of the kinetoplasts from epimastigotes. The nine stocks shared isoenzyme patterns with the reference strains included in this work. Six of them had similar profiles with the Y strain (Z2), two with the CL-Brener clone (ZB) and one with the Dm28c clone (Z1). All stocks generated a single 330bp kDNA product, then also confirming their specific identification. The mini-exon gene amplified products evidenced that eight stocks could be classified in the subgroup Tc II and the other in Tc I. However, two isolates identified in Tc II subgroup were reclassified as Tc VI, according to the more recent proposal for *T. cruzi* stock subdivisions. At present, it was not possible determining a strict correlation between parasite features and clinical forms of Chagas' disease. However, it is worth mentioning that three isolates from cardiac patients were included in Tc II subgroup.

Key words: Chagas' disease. *Trypanosoma cruzi*. Hemocultures. Axenic cultures. Morphology. Biometry. Metacyclic differentiation. Isoenzymes. Polymerase chain reaction (PCR). kDNA minicircle. Mini-exon gene. Intraspecific variability. *Trypanosoma cruzi* subgroups.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico da doença de Chagas

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase americana foi descoberta em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, na cidade de Lassance, no norte do Estado de Minas Gerais, quando trabalhava no controle de mosquitos transmissores da malária que dificultavam a construção de uma ferrovia na região (*apud* JURBERG et al., 2005; KROPF, 2009). Inicialmente um inseto triatomíneo *Panstrongylus megistus* foi capturado e estudado em animais de laboratório confirmando a presença do tripanossoma no sangue desses animais denominando-o de *Trypanosoma cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz. Chagas (1909b *apud* SOUSA, 1999) descreveu a primeira infecção natural em um mamífero ocorrida em gato. Posteriormente encontrou o parasita no sangue de uma criança (Figura 1), e associando este achado, examinou e constatou a infecção em outras pessoas que viviam em casas infestadas com o inseto triatomíneo em Lassance. Chagas (1909b *apud* SOUSA, 1999) estudou o parasita em seres humanos, animais experimentais, triatomíneos e em culturas axênicas. Por acreditar que *T. cruzi* apresentava estágios esquizogônico nos pulmões de hospedeiros vertebrados, temporariamente Chagas classificou o parasito em um novo gênero *Schizotripanum*, mas este erro foi logo corrigido por ele em 1913 (*apud* SOUSA, 1999). Chagas encontrou o parasita também em animais silvestres, tatus e macacos esquilos. Além disso, Chagas relatou a evolução de *T. cruzi* em *Triatoma infestans* e a possibilidade dessa espécie e *T. sordida* atuarem como vetores do parasito (*apud* SOUSA, 1999). A evolução do *T. cruzi* em *Triatoma infestans* e a possibilidade desta espécie e *T. sordida* atuarem como vetores também foi relatada por Chagas (*apud* SOUSA, 1999). Assim, um único pesquisador anunciou uma tripla descoberta: o vetor, o patógeno e a doença humana (KROPF, 2009).

Estudos histopatológicos foram realizados por Vianna (1911 *apud* SOUSA, 1999) em pacientes *post-mortem* e animais experimentais constatando o processo de multiplicação do parasita em muitos tecidos principalmente no miocárdio e músculo esquelético. Outros estudos foram realizados a fim de descobrir o desenvolvimento de *T. cruzi* em triatomíneos bem como a infectividade em mamíferos, evidenciando o achado de tripomastigotas no intestino posterior e nas fezes (metacíclicos) do inseto hematófago popularmente conhecido como “barbeiro” (BRUMP, 1912 *apud* SOUSA, 1999; KROPF, 2009).



Figura 1: Primeiro caso humano identificado da doença de Chagas (<http://www4.ensp.fiocruz.br/radis/81>).

1.2. A doença de Chagas: fases de infecção e formas clínicas

Os determinantes da doença de Chagas resultam da quantidade de parasitos na infecção inicial, das formas infectantes no inóculo inicial (número de tripomastigotas), da linhagem de *T. cruzi* inoculada, de ser a primo infecção ou reinfeção, das características das cepas e clones (biodemas) e da resposta imunológica do hospedeiro (COURA, 2003; COURA, 2007).

A infecção chagásica apresenta duas fases bem distintas:

I) Fase aguda ou inicial, na maioria dos casos assintomática ou oligossintomática ou sintomática podendo gerar grande espectro de lesões teciduais que determinam febre, mal estar geral, cefaléia, edema, adenomegalia, hipertrofia dos linfonodos, hepatoesplenomegalia, miocardite (COURA, 2003). Também podem ocorrer sinais de porta de entrada do parasito, que incluem a resposta inflamatória do hospedeiro: Chagoma de Inoculação (lesão cutânea inflamatória que não supura) e o Sinal de Romaña (edema ocular bpalpebral unilateral) (Figura 2) (BRENER, 1987; FNS, 1999).

Essa fase caracteriza-se pela presença do *T. cruzi* no exame direto do sangue. Aproximadamente dois meses após o início da fase aguda, o *T. cruzi*, no que se refere à pesquisa em sangue periférico, dificilmente é encontrado, podendo ser detectado somente por técnicas especiais tais como xenodiagnóstico, hemocultura ou PCR (COURA, 2003).

Na fase aguda ou inicial da infecção, tripomastigotas circulam principalmente por via hematogênica se disseminando pelo organismo do hospedeiro, multiplicando-se no interior dos macrófagos e em uma variedade de outras células, com predominância em células do baço, fígado, linfonodo, tecido conjuntivo intersticial, miocárdio ou músculos esquelético e liso. Nos tecidos, o parasito se multiplica formando pseudo cistos (“ninhos de amastigotas”) que se rompem levando a reação inflamatória e necrose. Os antígenos liberados pelo parasito ligam-se à superfície das células vizinhas, que se tornam alvos de resposta imune celular e humoral. Alguns parasitos, sob a forma de tripomastigota, recirculam e voltam a se localizar em células de outros tecidos, reiniciando o ciclo. Durante essa fase transitória, ocorrem reações inflamatórias, necrose, destruição neuronal e fibrose, perpetuando-se o processo, provavelmente, por um mecanismo autoimune com a participação do parasito ou seus antígenos (COURA, 2003; REY, 2008).

II) Fase crônica, na qual a patogenia da doença de Chagas parece mais complexa, a intensidade de infiltrado inflamatório não tem relação com a presença do parasito, ao contrário da fase aguda, sendo estes muito escassos ou difíceis de serem encontrados. Os parasitos podem ser localizados, com certa dificuldade, principalmente nas células do músculo liso, cardíaco ou esquelético. As lesões inflamatórias são persistentes, discretas, multifocais e difusa e de tendência fibrosante, parecendo depender de fatores imunopatológicos. Esta fase inclui quatro principais tipos de formas: indeterminada, cardíaca, digestiva e mista (BRENER, 1987; FNS, 1999).



Figura 2: Criança com Sinal de Romaña, onde o edema bupalpebral e unilateral é característico (DIAS & COURA, 1997).

Um dos aspectos mais enigmáticos sobre a doença de Chagas diz respeito ao que acontece durante um período médio que pode persistir acima de 10 a 15 anos, após a data da primeira infecção na forma indeterminada. Nela, os indivíduos são assintomáticos e são diagnosticados por exames complementares, tais como positividade em testes sorológicos ou parasitológicos para a doença de Chagas, ausência de manifestações clínicas da doença, exames eletrocardiográficos normais, assim como normalidade nos exames radiológicos do coração, cólon e esôfago (BRENER, 1987; FNS, 1999; COURA, 2003).

A forma cardíaca é a principal causa de morte da doença de Chagas. Os parasitos são dificilmente encontrados no coração, podendo o paciente apresentar-se sem sintomatologia, mas com alterações eletrocardiográficas, insuficiência cardíaca progressiva ou fulminante, além de arritmia grave. Seus sinais e sintomas incluem palpitação, edema, dispnéia, tosse, tontura, desmaio, acidentes embólicos, além da cardiomegalia aparente no exame de raio X (Figura 3) (BRENER, 1987; FNS, 1999). A maioria dos autores está de acordo que as inflamações intensas ocorridas na fase aguda seriam responsáveis pela destruição das fibras cardíacas, observadas na forma crônica cardíaca (TAFURI, 1992). Recentemente, vem se atribuindo a miocardiopatia chagásica crônica a múltiplos fatores como imunodepressão, fibrose e dilatação da microvasculatura associada a uma resposta inadequada do hospedeiro (COURA, 2003).



Figura 3: Radiografia de um paciente chagásico de 40 anos de idade, com cardiomegalia. (GILLES, 2000).

Na forma digestiva (Figura 4) ocorrem alterações ao longo do trato digestivo, ocasionada por lesões nos plexos nervosos (destruição neuronal do sistema nervoso autônomo) com conseqüentes alterações na motilidade e morfologia destes órgãos. Essas alterações originam dilatações no tubo digestivo conhecidas como megaesôfago e megacólon, correlacionadas aos sintomas característicos: disfagia, constipação e distensão intestinal. Os “megas” são diagnosticados através de exames radiológicos (BRENER, 1987; FNS, 1999; COURA, 2007).



Figura 4: Forma digestiva da doença de Chagas. (GILLES, 2000).

O paciente com a forma mista apresenta sintomas da forma cardíaca e digestiva, podendo apresentar mais de um “mega” (COURA, 2003; FNS, 1999).

A doença de Chagas ainda pode apresentar as seguintes formas clínicas: formas congênita associadas ao aborto, prematuridade e lesões de órgãos nos fetos; e formas em indivíduos imunodeprimidos, estes podendo apresentar parasitemia patente, lesões no sistema nervoso central, miocardite difusa e meningoencefalite (COURA, 2007).

O diagnóstico de rotina da doença de Chagas é realizado através de exames clínicos, testes sorológicos, radiológicos, exames eletrocardiográficos, hemocultura, xenodiagnóstico. Laboratórios especializados podem usar técnicas mais atualizadas como aquelas baseadas na amplificação do genoma do parasito (BRENER, 1987; JUNQUEIRA, 1996).

O tratamento da doença pode ser realizado com Nifurtimox (3-methyl-4(5' nitrofurfurylidene-amino)-tetrahydro-4H1,4-thiazine-1,1-dioxide) e Benznidazol (N-benzyl-2-nitro-1imidazolacetamide) na fase aguda e recente da infecção humana, porém na fase crônica da doença essas drogas não são eficazes (BRENER et al., 1976).

1.3. Epidemiologia

O agente etiológico da Tripanossomíase Americana, a qual ficou conhecida como doença de Chagas, é o protozoário *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909.

Inicialmente, a infecção ocorria exclusivamente entre animais e vetores silvestres. Entretanto, através da destruição de parte dos seus ecótopos naturais com os desmatamentos de florestas, conseqüente rareamento dos animais silvestres que serviam de fonte natural de alimentação e entrada do homem na floresta, os triatomíneos começaram a se alimentar em animais domésticos e humanos, passando a doença a ser considerada uma zoonose (SILVEIRA & VINHÃES, 1998).

A transmissão natural do *T. cruzi* realiza-se através da contaminação da pele ou mucosas pelas fezes dos triatomíneos infectados (BRUMPT, 1912). Os triatomíneos são

responsáveis pela transmissão do parasito aos reservatórios vertebrados, mantendo a zoonose (COURA, 2003).

A distribuição geográfica da doença é exclusiva no Continente Americano, no qual há dispersão do *T. cruzi* desde do sul dos Estados Unidos, onde a infecção chagásica é ocasional, até o sul da Argentina (COURA, 2003; WHO, 2005). Na América central, todos os países são atingidos e a área de distribuição da infecção se amplia com novos estudos. Na América do Sul os países mais afetados são a Venezuela, Chile, Argentina e o Brasil (WHO, 2005) (Figura 5).

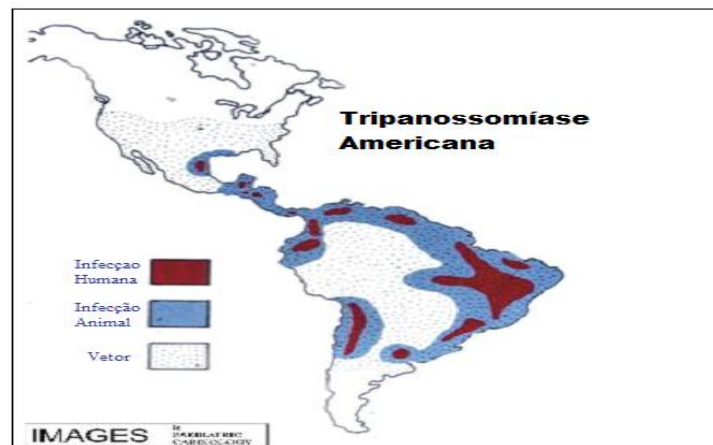


Figura 5: Distribuição geográfica de *Trypanosoma cruzi*. Infecções em animais, seres humanos e vetores (GILLES, 2000).

No Brasil, a doença pode ser considerada endêmica em diversos Estados, desde o Ceará até o Rio Grande do Sul, incluindo Goiás e Minas Gerais. Até alguns anos atrás, a Amazônia, Maranhão e Piauí não faziam parte deste grupo, pela inexistência da endemia humana. No entanto, à medida que as investigações se intensificaram, verificou-se a emergência da doença na região Amazônica e os riscos de sua endemização são de grande preocupação de vários epidemiologistas (COURA, 2003). A distribuição geográfica da doença de Chagas endêmica, como já previsto por Carlos Chagas, em 1909, ocorre em todas as áreas onde há triatomíneos antropofílicos adaptados ao domicílio humano (COURA, 2003; MILES et al., 1977).

A doença de Chagas é considerada como um problema de saúde pública, afetando cerca de 12 a 14 milhões de pessoas na América Latina (DIAS, 2007). Estima-se que 75 a 90

milhões de pessoas são expostas à infecção (COURA, 2007). O surgimento da enfermidade tem sido descrito envolvendo dois aspectos: a adaptação dos triatomíneos a habitats domésticos e a capacidade vetorial dos mesmos. Os pacientes com doença de Chagas podem ter diversas manifestações clínicas, porém, as consideradas como mais importantes são as cardíacas e do trato digestivo.

Atualmente, sabe-se que *T. cruzi* tem sido descrito em mais de 200 espécies e subespécies de mamíferos de diferentes ordens como também em mais de 70 espécies de triatomíneos vetores (BARRETO & RIBEIRO, 1979; SHERLOCK, 1997).

Vários insetos hematófagos da família Reduviidae são vetores do *T. cruzi*. No Brasil, as principais espécies de triatomíneos transmissores do parasito são: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (Figura 6). Estes insetos são popularmente conhecidos como barbeiros.



Figura 6: Principais espécies de triatomíneos no Brasil: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*. (Fonte: <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/chagas>).

Os animais reservatórios do *T. cruzi* são mamíferos pertencentes às seguintes ordens (BARRETO & RIBEIRO, 1979): Marsupialia (ex. gambás, cuícas); Edentata (ex. tatus, preguiça); Chiroptera (ex. morcegos); Carnivora (ex. cães, gatos); Rodentia (ex. roedores em

geral); Primates (ex. sagüís); Lagomorfa (ex. lebres, coelhos). As outras classes de vertebrados como aves, anfíbios, répteis e peixes são refratárias ao *T. cruzi*.

A doença de Chagas é característica de regiões muito carentes, com altos índices de colonização domiciliar e peridomiciliar pelos triatomíneos. Com a necessidade alimentar dos triatomíneos e a invasão pelo homem dos ecótopos naturais do parasito, associada ao desmatamento, estes insetos passaram a alimentar-se tanto em animais domésticos quanto em seres humanos, assim, adaptando-se ao peridomicílio e domicílio (COURA, 2003). Os diferentes tipos de habitação em regiões carentes do norte e nordeste brasileiro como, por exemplo, casas próximas a ambientes silvestres, habitações do tipo pau-a-pique (casas com paredes feitas de barro) e palhas, casca de galhos usadas nas cercas, peridomicílio com criação de animais, são ambientes que propiciam o estabelecimento dos triatomíneos e consequentemente, a infecção. Segundo Coura (2007), os mecanismos de transmissão da infecção por Chagas, têm sido resumidos como segue:

- Principais mecanismos: por via contaminativa em pele e mucosa ocular (vetores triatomíneos), transfusão de sangue, transmissão oral (alimentos contaminados), transplacentária ou através do canal do parto (casos raros).
- Mecanismos secundários: acidentes de laboratórios, manuseamento de animais infectados, transplantes de órgãos, sexualmente (feridas, esperma ou fluidos menstruais), infecção induzida por inoculação ou oralmente.

Shikanai-Yasuda et al. (1991) descreveu a infecção através da transmissão do parasito por via oral em 26 pessoas que haviam ingerido caldo de cana supostamente infectados com triatomíneos esmagados. Um outro surto ocorreu no Amapá e na região amazônica através da ingestão de suco de açaí extraído de palmeiras (VALENTE et al., 1999; COURA et al., 2002).

No Brasil, a transmissão domiciliar por *Triatoma infestans* foi controlada com produtos químicos aplicados diretamente nas moradias e anexos para combater os triatomíneos. Outra forma de controle socialmente mais adequada foi o emprego de programas de melhorias habitacionais para impedir a infestação de vetores. Porém há espécies de triatomíneos silvestres que se adaptam facilmente às moradias, atraídos pelas luzes das casas. A espécie predominante é o *Triatoma brasiliensis*, mas existem outros vetores também importantes na dispersão de *T. cruzi* (DIAS, 2007; FIOCRUZ, 2010).

A variedade de espécies de vetores e de hospedeiros vertebrados de diversos grupos zoológicos, com diferentes *habitats* e hábitos, dificultam a erradicação do *T. cruzi*. Como o ciclo doméstico de transmissão é o principal responsável pela maioria dos casos humanos, o controle da doença passou a ser feito principalmente através de medidas de combate ao vetor (SHERLOCK, 1979; SILVEIRA & VINHÃES, 1998; SANTOS-MALLET, 2000).

Para compreender a dinâmica de transmissão do parasito na natureza é importante o estudo da relação entre o parasito e o vetor. Dentro da visão ecológica no parasitismo, sabe-se que o hospedeiro passa a ser o ecossistema do parasito, onde este é submetido a pressões seletivas que são representadas pelas características fisiológicas do hospedeiro (ARAÚJO, 2006). Diversos são os parâmetros que possam estar associados nesta interação, influenciando o desenvolvimento do *T. cruzi* no vetor, uma vez que para esta interação ocorrer, é necessária a presença de vários fatores celulares e moleculares (GARCIA & AZAMBUJA, 1991). O processo de adaptação ao parasitismo também está relacionado tanto aos mecanismos de escape do parasito quanto as defesas do hospedeiro, incluindo também a competição e/ou cooperação interespecífica de parasitos que estejam ocupando o mesmo habitat, e, em caso de espécies com alto grau de variabilidade intraespecífica, como é o *T. cruzi*, provavelmente competição e/ou cooperação intraespecífica (ARAÚJO, 2006).

1.4. O parasito: *Trypanosoma cruzi*

1.4.1. Classificação taxonômica

A literatura apresenta classificação taxonômica divergente do agente etiológico da doença de Chagas *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*). De acordo com o Comitê de Sistemática e Evolução da Sociedade de Protozoologia, a família Tripanossomatídae encontra-se classificada na Ordem Kinetoplastida, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophora (LEVINE et al., 1980 apud SOUSA, 2007; Rey, 2006). Entretanto, uma nova nomenclatura foi elaborada e proposta em 2005 pelo Comitê da Sociedade Internacional de Protozoologia classificando como Trypanosomatida, Divisão Kinetoplastea, Primeira Divisão Euglenozoa, Supergrupo Excavata. Ainda que o Comitê evite utilizar esta nomenclatura, alguns livros adotaram-na, justificando o fato de estarem baseadas em conhecimentos de ultra-estrutura e filogenia molecular dos parasitos (REY, 2008).

Na Ordem Kinetoplastida estão alocados protozoários com um ou dois flagelos que apresentam uma massa de DNA extranuclear, o cinetoplasto. Os monoflagelados estão classificados na subordem Trypanosomatina e os biflagelados em Bodonina. A subordem Trypanosomatina inclui apenas a família Trypanosomatidae (VICKERMAN, 1976; SOUSA, 2002).

A família Trypanosomatidae apresenta as seguintes características: (1) uma massa de DNA extranuclear denominada cinetoplasto localizada na proximidade do corpo basal do flagelo e contida numa estrutura mitocondrial única que percorre todo o corpo celular, (2) citoesqueleto composto por microtúbulos corticais que não sofrem alterações durante seu ciclo de vida, (3) enzimas da via glicolítica contidas numa organela citoplasmática, o glicosoma e (4) mudança de estágios ao longo do ciclo evolutivo inclusive durante a alternância de hospedeiros (VICKERMAN, 1976).

Os tripanossomatídeos apresentam seus cinetoplastos constituídos por uma massa de DNA peculiar (kDNA), composta por uma rede de moléculas circulares de dois diferentes tamanhos, que correspondem a cerca de 20% do total de DNA (kDNA) da célula, este é composto por dois tipos principais de moléculas circulares denominadas maxicírculos cada um com aproximadamente 20 a 38 kb (dependendo da espécie) e minicírculos com 0.46 a 2.5 kb (BRANDÃO et al., 2000; SOUSA, 2007). Os maxicírculos formam uma rede com 25 a 50 moléculas e são similares ao DNA mitocondrial de outros eucariontes, tendo uma seqüência homogênea de nucleotídeos. Os minicírculos são numerosos (cerca de 5.000 a 27.000 por célula) e são heterogêneos em seqüência de nucleotídeos podendo ser transcritos em pequenas moléculas de RNA (RNA guias), utilizadas para orientar inserções e deleções de resíduos de uridina em transcritos dos maxicírculos, processo conhecido como “edição do RNA” (VICKERMAN, 1994 *apud* SOUSA, 2007).

Hoare (1972) propôs a classificação de espécies do gênero *Trypanosoma* de mamíferos em duas seções: Seção Stercoraria, a qual inclui os subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* e *Megatrypanum*, e Seção Salivaria que inclui os subgêneros *Trypanozoon*, *Duttonella*, *Nannomonas* e *Pycnomonas*. Na Seção *Stercoraria*, o ciclo de desenvolvimento no inseto completa-se no intestino posterior (onde ocorrem os metacíclicos) e a transmissão é contaminativa. Já na Seção *Salivaria*, o ciclo de desenvolvimento no inseto completa-se na porção anterior do tubo digestivo (probóscide, hipofaringe, glândulas salivares) onde os

metacíclicos estão presentes (excetos nos inoculadores mecânicos) com transmissão inoculativa.

Trypanosoma cruzi foi classificado no subgênero *Schizotrypanum* da seção Stercoraria (HOARE, 1972). O subgênero *Schizotrypanum* é formado por tripanossomas que possuem como características principais: estágios tripomastigotas sanguícolas em forma de “C” ou “S”, cinetoplasto volumoso próximo à extremidade posterior e a reprodução intracelular no mamífero sob a forma amastigota. Estes parasitos assemelham-se morfológicamente com a espécie-tipo, *Trypanosoma cruzi*, mas diferem de modo marcante dos tripanossomas de outros subgêneros (HOARE, 1972; SOUSA, 1999).

O *T. cruzi*, por técnicas parasitológicas clássicas, pode ser identificado com base nas seguintes características: * infectividade para animais de laboratórios, principalmente camundongos e cobaias; * tamanho pequeno e peculiaridades morfológicas dos tripomastigotas sanguíneos, entre elas, a presença de um cinetoplasto volumoso e arredondado; * infectividade para triatomíneos, multiplicando-se no intestino médio e posterior; * crescimento fácil em diversos meios de cultura à temperatura de 27° C, nesta condição apresentando estágios similares a dos triatomíneos (epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos); * capacidade de multiplicação intracelular como amastigotas, tanto nos tecidos de mamíferos quanto em cultura de células (BARRETTO & RIBEIRO, 1979).

1.4.2 Ciclo evolutivo

O ciclo biológico do *T. cruzi* envolve diversas formas evolutivas e a participação de um hospedeiro vertebrado (mamífero) e de um invertebrado (triatomíneo) atuando como vetor (Figura 7).

No hospedeiro vertebrado, o ciclo do parasito representa a integração de fenômenos biológicos resultantes da sua fase de circulação no sangue, do seu ciclo intracelular, da resposta imune do hospedeiro e das peculiaridades da população infectante. Uma vez no interior da célula hospedeira, as formas tripomastigotas escapam do vacúolo endocítico e diferenciam-se em amastigotas que se multiplicam por sucessivas divisões binárias em células

do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM). Após três a quatro dias, precedendo o rompimento da célula parasitada, as formas amastigotas evoluem para formas tripomastigotas que são liberadas no meio extracelular. Estas podem infectar células adjacentes, ou ganhar a corrente sangüínea, onde poderão atingir outras células e tecidos (principalmente muscular, liso e esquelético), cumprindo um novo ciclo de multiplicação, ou permanecerem no sangue circulante do hospedeiro vertebrado (forma tripomastigota sanguícola) e serem ingeridas pelo inseto vetor no momento do repasto sangüíneo (VIANNA, 1911; ANDRADE, 1979; BRENER, 1979; VICKERMAN, 1985; ANDRADE, 2000).

A multiplicação inicial nos macrófagos provoca uma reação inflamatória peculiar no local da picada (chagoma de inoculação). Quando a infecção ocorre próximo às pálpebras, forma-se um edema bpalpebral conhecido como sinal de Romana. É importante assinalar que logo após o primeiro contato com os macrófagos, estes tornam-se competentes para pronta destruição do parasito. As formas de epimastigotas, as quais não possuem esse mecanismo de “escape” são logo destruídas pelos macrófagos (ANDRADE, 1979; VICKERMAN, 1985).

O ciclo tripomastigota → amastigota → tripomastigota assegura a continuidade da infecção no hospedeiro vertebrado, pois possibilita a formação de novos “ninhos” de parasito em outros órgãos e tecidos. Em função da resposta imunológica, a intensidade de multiplicação é reduzida, mas o processo inflamatório vai gerar lesões típicas da fase crônica (BRENER, 1979; ANDRADE, 2000).

No hospedeiro invertebrado o ciclo inicia-se quando o triatomíneo ingere as formas tripomastigotas presentes no sangue do vertebrado infectado. Ao chegar ao estômago, os tripomastigotas arredondam-se e migram para o intestino médio, onde se multiplicam por divisão binária sob a forma epimastigota, os quais aderem na ampola retal, sendo assim, responsáveis pela manutenção da infecção. Na ampola retal ocorre a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, os quais se acumulam nessa porção do tubo digestivo e são eliminados através das fezes e urina (VICKERMAN, 1985; ZELÉDON, 1997).

Um dos fatos de maior repercussão sobre o ciclo do *T. cruzi* foi a descoberta feita por Deane *et al.* (1984) de um duplo ciclo do *T. cruzi* nas glândulas anais do gambá (*Didelphis marsupialis*). Este mesmo hospedeiro apresentava formas de desenvolvimento do parasito encontradas em vertebrados e invertebrados.

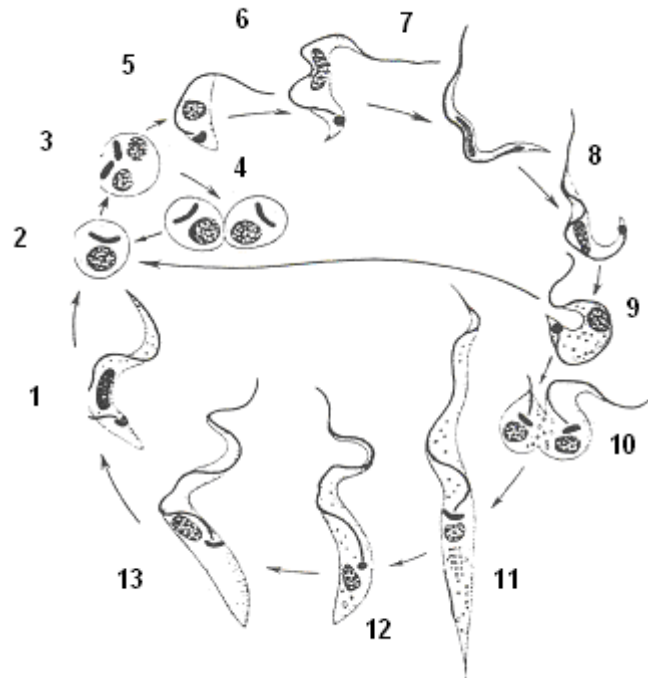


Figura 7: Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* no vertebrado (1-9) e no vetor (9-13, 1) (BRUMPT, 1912).

1.4.3. Caracterização do parasito

A caracterização do *T. cruzi* é necessária à identificação do grupo a que o isolado (cepa ou clone) pertence e, assim sendo, buscar entendimento sobre seu papel na patogênese da doença de Chagas, formas clínicas e resposta ao tratamento com drogas específicas (WHO, 1991). Também contribui para o conhecimento da eco-epidemiologia do parasito e correlações com outras informações sobre o mesmo, seus reservatórios, transmissores e a doença na região (MILES, 1980; 1978; 1977).

1.4.3.1. Caracterização morfológica

Os estágios evolutivos dos tripanossomatídeos são nomeados de acordo com a forma do corpo celular, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e o ponto de emergência do flagelo. Os estágios mais conhecidos são: promastigota, paramastigota, opistomastigota, endomastigota, coanomastigota, epimastigota, tripomastigota, amastigota e esferomastigota (VICKERMAN, 1990; *apud* SOUSA, 2002).

Entretanto, o *T. cruzi* apresenta os seguintes estágios de acordo com seu desenvolvimento no organismo do vertebrado e no inseto transmissor (BRENER, 1965; BRENER 1985; SOUSA, 1999; SOUSA, 2002):

- ❖ **amastigota** – formas ovais ou arredondadas, cinetoplasto em forma de bastão, sem flagelo livre visível ao microscópio óptico (Figura 8).

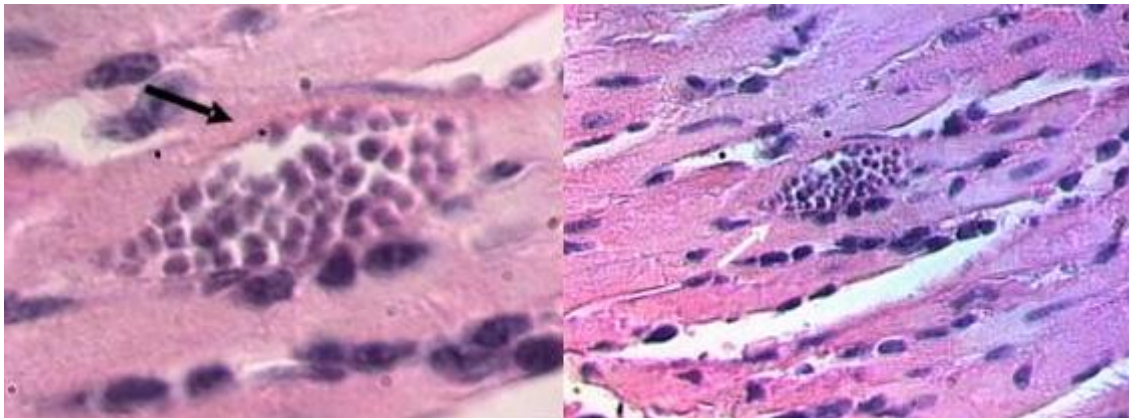


Figura 8: Formas amastigotas do *Trypanosoma cruzi* no tecido cardíaco (1.000× e 400×). Observe o ninho de amastigotas (seta). (Fonte: Arquivos de Parasitologia FCFRP/USP).

- ❖ **epimastigota** - formas alongadas, núcleo esférico, cinetoplasto em forma de bastão, anterior ou próximo ao núcleo, flagelo livre emergindo lateralmente, correndo unido ao corpo do parasito, constituindo a chamada “membrana ondulante” (Figura 9).



Figura 9: Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* em meio de cultivo axênico. (Fonte Arquivos de Parasitologia FCFRP/USP).

- ❖ **tripomastigota** – formas em C ou S, núcleo redondo ou alongado, cinetoplasto volumoso, esférico e posterior ao núcleo, flagelo emergindo lateralmente, formando a “membrana ondulante” (Figura 10) (BRENER & CHIARI, 1963; SILVA, 1959; SOUSA, 1999).

O comprimento total das formas sanguíneas pode variar entre 16,3 e 21,8 μm (HOARE, 1972). Estes estágios podem também apresentar variações gerais (Figura 10), sendo reconhecidas como formas finas (A1, B3, C1), largas (A2, B1, C3), curtas (B2), muito largas (C4, C5) e intermediárias (A3, C2).

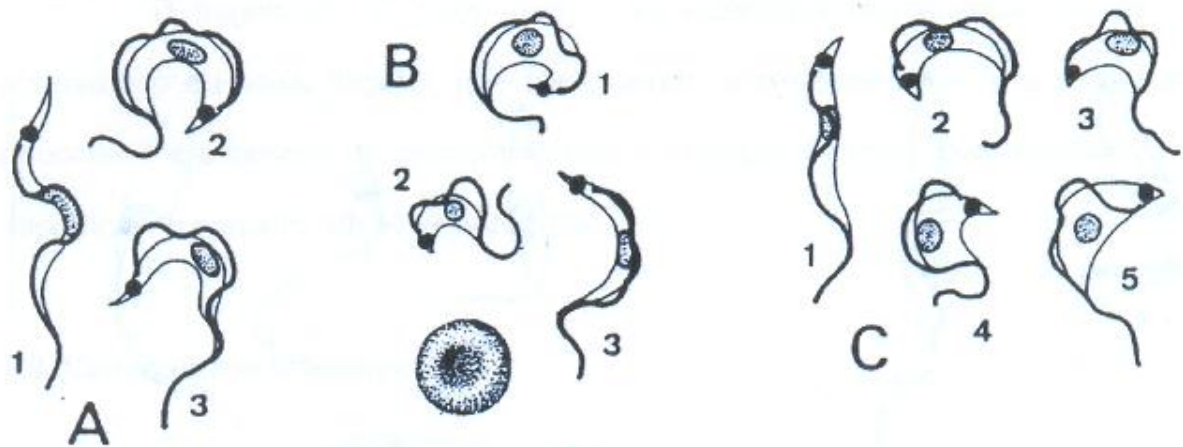


Figura 10: Formas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*: (A) cepa Y; (B) cepa FL; (C) cepa CL. Desenhos em câmara clara com escala equivalente a 10 μm (SOUSA, 1999).

No hospedeiro invertebrado ocorrem epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos e no vertebrado, ocorrem amastigotas e tripomastigotas sanguíneas. Entretanto, um outro aspecto da biologia do *T. cruzi* foi descrito por Deane et al. (1984), que descobriram estágios tipicamente do invertebrado no lúmen das glândulas anais de gambás *Didelphis marsupialis* (Figura 11).

Chagas (1909) havia observado a presença de formas largas e delgadas do parasito no sangue periférico. Brener & Chiari (1963) e Brener (1965) mostraram que no sangue periférico de camundongos infectados experimentalmente com diferentes cepas de *T. cruzi* havia co-relações nas percentagens de tripomastigotas delgadas, largas e muito largas. As formas delgadas são encontradas apenas na fase aguda da infecção em cepas de elevada

virulência e “macrofagotrópicas” (BRENER, 1965; ANDRADE, 1974; BRENER, 1977; 1985). As formas largas são as únicas encontradas em qualquer fase da infecção. Além disso, as formas delgadas são mais susceptíveis ao sistema imunológico do hospedeiro (BRENER & CHIARI, 1963; BRENER, 1969). Brener em 1977 sugeriu a classificação de cepas em dois tipos polares, com bases nos aspectos morfológicos e de parasitismo tissular.

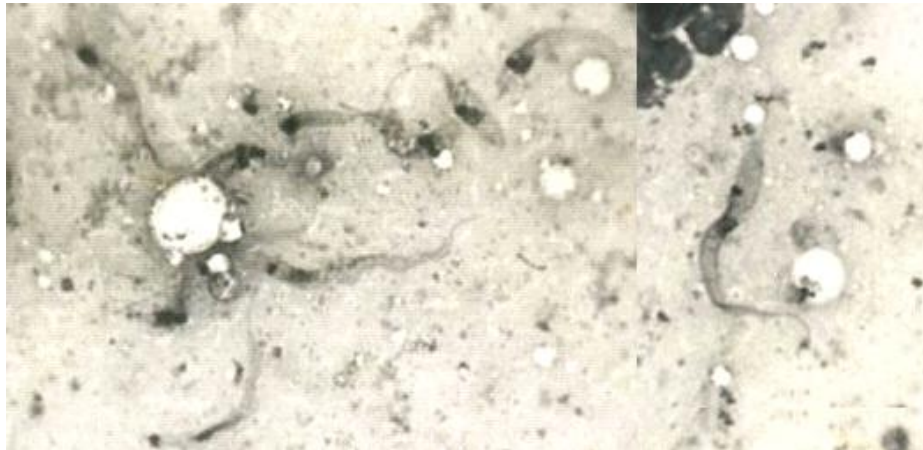


Figura 11: *Trypanosoma. cruzi* em esfregaços corados pelo Giemsa de glândula anal de *Didelphis marsupialis*. (Fonte: Originais de M. A. Sousa).

Segundo Andrade (1974), os parâmetros acima descritos são elementos de caracterização e isoladamente não são suficientes para tipar cepas de *T. cruzi*.

Um dos parâmetros utilizados para a caracterização das diferentes cepas do *T. cruzi* é o estudo do comportamento biológico do parasito *in vivo* como infectividade em animais experimentais, sendo o modelo murino um dos mais empregados, e em triatomíneos (SOUSA, 1999).

Os principais estudos sobre caracterização biológica de cepas de *T. cruzi* têm sido feitos em camundongos suíços não isogênicos (BRENER & CHIARI, 1963; BRENER 1965; 1969; ANDRADE, 1974; BRENER, 1977; MELLO E BRENER, 1978; ANDRADE, 1990). Andrade (1990) afirma que o camundongo suíço por ser um grupo heterogêneo representa melhor as características da população humana nas áreas endêmicas. Contudo, outras linhagens têm sido usadas para caracterizar cepas, e estudar aspectos específicos da doença de Chagas experimental (BICE & ZELEDON, 1970; ANDRADE, 1985; ARAÚJO & CHIARI, 1988). Atualmente, tem sido dada ênfase ao uso de linhagens isogênicas, tentando-se obter infecções padronizadas (SOUSA et al., 1995; ANDRADE, 2000).

Diversos parâmetros têm sido empregados, tais como virulência e patogenicidade, parasitismo tissular preferencial e morfologia das formas sangüíneas.

Segundo Andrade (1974), virulência é a capacidade do parasito de multiplicar-se no hospedeiro experimental, a qual é influenciada por vários fatores. Patogenicidade refere-se à habilidade de produzir lesões tissulares e mortalidade. Assim existem tanto cepas de alta virulência e elevada patogenicidade quanto cepas de baixa virulência com elevado poder patogênico (ANDRADE, 1985).

Muitos estudos de caracterização biológica mostraram que cepas de *T. cruzi* procedentes de diferentes reservatórios e vetores de regiões do mesmo país e de países diferentes possuem um comportamento distinto em animais de laboratório (níveis de parasitemia, parasitismo preferencial e taxas de mortalidade) (BADINEZ, 1945; BRAND et al., 1949; ANDRADE, 1974; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997). As causas que explicam isto poderiam ser fatores ambientais, imunológicos, virulência, patogenicidade e a possível seleção de cepas e clones ao passar pelos diferentes vetores e por hospedeiros vertebrados. Possivelmente, estes fatores expliquem a variabilidade no comportamento biológico do *T. cruzi* (BICE & ZELDON, 1970; DEANE et al., 1984; MAGALHÃES et al., 1996).

Vianna (1911) demonstrou que o *T. cruzi* é encontrado em diversos tecidos do hospedeiro vertebrado, porém determinados tecidos são preferencialmente parasitados (BADINEZ, 1945). Outros autores mostraram que o parasitismo tissular preferencial da cepa é uma característica biológica importante a ser considerada no modelo experimental (BICE & ZELEDON, 1970; ANDRADE, 1974; MELO & BRENER, 1978). Cepas com diferentes padrões de parasitismo tissular têm sido descritas, mas todas são preferencialmente parasitos de musculaturas lisa, esquelética e cardíaca (SOUSA & ALENCAR, 1984). Entretanto, no início da infecção algumas cepas podem parasitar células do sistema fagocítico mononuclear (MELO & BRENER, 1978; SOUSA & ALENCAR, 1984). *T. cruzi* foi descrito também no lúmem de glândulas anais de marsupiais (DEANE et al., 1984a).

A diversidade de *T. cruzi* passou a ser estudada com maior freqüência a partir de meados do século XX. Nussenzweig et al. (1962) e Nussenzweig & Goble (1966) classificaram as cepas deste parasito de diferentes origens em 3 tipos antigênicos (A, B, C).

Brener & Chiari (1963) e Brener (1965) utilizaram o critério morfobiológico para analisar 7 cepas de *T. cruzi*, reunindo-as também em 3 tipos. Posteriormente, algumas destas cepas foram estudadas em relação a outros aspectos de sua biologia, sendo que 2 tipos, estes representados pelas cepas Y e CL, foram considerados polares (BRENER 1977, 1985, MELO & BRENER 1978). Andrade (1974) estudou diversos isolados de pacientes chagásicos do Recôncavo Baiano (além de cepas de origem humana de outras procedências) por parâmetros morfobiológicos e histopatológicos, propondo sua classificação em 3 padrões, hoje conhecidos como biodemas I, II e III (ANDRADE & MAGALHÃES 1997).

O tipo I é constituído por cepas que se multiplicam rapidamente, elevada parasitemia e mortalidade dos camundongos, ocorrendo entre o 7º e 12º dia pós-infecção. Possuem predomínio das formas delgadas e acentuado parasitismo de macrófago na fase inicial da infecção. São protótipos as cepas Y e Peruana (ANDRADE, 1974; ANDRADE, 1985; SOUSA et al., 1995; ANDRADE & MAGALHÃES 1997).

As cepas do tipo II apresentam uma multiplicação relativamente lenta, com picos de parasitemia irregulares entre os 12º e 20º dia após infecção, período no qual também a mortalidade é máxima. Predominam formas largas com baixa percentagem de formas delgadas na fase inicial da infecção; parasitismo preferencial de músculo com acometimento predominante do miocárdio. A cepa São Felipe é o protótipo (ANDRADE, 1974; ANDRADE, 1985; ANDRADE & MAGALHÃES 1997).

Cepas do tipo III possuem baixa multiplicação, picos de parasitemia tardios, entre os dias 20 e 30 após a infecção; taxa de mortalidade baixa em torno de 50 dias após infecção. Predominam formas largas com acometimento principal da musculatura esquelética. O protótipo é a cepa Colombiana (ANDRADE, 1974; ANDRADE, 1985; ANDRADE & MAGALHÃES 1997).

Sousa (1999) observou que as cepas de *T. cruzi* com formas sanguíneas muito largas (BRENER & CHIARI 1963; BRENER 1965, 1977), não se enquadram nos biodemas propostos por Andrade (1974). Também não foram considerados por Brener, Andrade & Cols aquelas cepas que não dão parasitemia patente em animais experimentais (SOUSA, 1999).

Além dos parâmetros *in vivo*, a utilização *in vitro* através de meios de cultura para a caracterização de tripanossomas é uma opção eficaz nas pesquisas científicas. *Trypanosoma cruzi* cresce facilmente a 27°C em meios de cultura como NNN (Novy, Macneal, Nicolle), LIT (Liver Infusion-Tryptose), Warren, dentre outros, apresentando estágios evolutivos similares aos encontrados em triatomíneos (SOUSA, 1999).

Diversos experimentos foram feitos com populações de *T. cruzi* em meio de cultura. Chiari (1974a; b) comprovou que distintas cepas do *T. cruzi* mantidas por longo tempo em cultura apresentam diferentes potenciais infectantes. Possivelmente algumas populações tenham melhor desenvolvimento que outras, resultando em modificação do perfil genético original (ENGEL et al., 1982). Clones com menores tempos de geração seriam selecionadas pela cultura em detrimento daqueles que apresentam tempo de gerações maiores e, portanto menores graus de crescimento (MANGIA, 1995). Contreras et al. (1994) mantiveram por três anos, mediante repiques sucessivos em cultura, duas cepas de *T. cruzi* verificando após esse período que a capacidade de metaciclogênese dos parasitos foi reduzida, resultando em atenuação da virulência. Lima et al. (1995) compararam a cinética de crescimento e o tempo de duplicação depois de quatro anos de passagens mensais em meio LIT (liver infusion-tryptose), de três clones de um isolado procedente de um marsupial naturalmente infectado. Concluíram que os parâmetros estudados não são estáveis e não deveriam ser usados como marcadores biológicos, chamando a atenção de que esta pode ser outra forma de seleção de subpopulações do *T. cruzi*.

1.4.3.2. Caracterização Bioquímica

Dentre as técnicas bioquímicas, a análise eletroforética de isoenzimas (*e.g.* MILES et al., 1977; 1978; 1980; ANDRADE et al., 1983; ROMANHA & BRENER, 1988; TIBAYRENC & AYALA, 1988) foi de grande importância para a caracterização de cepas de *T. cruzi* e composição de grupos com padrões eletroforéticos semelhantes denominados zimodemas. A análise de isoenzimas continua sendo utilizada nos dias atuais, pois estas são controladas por princípios Mendelianos (aloenzimas), sendo assim, consideradas bons marcadores genéticos (TIBAYRENC, 1995).

A técnica de eletroforese de isoenzimas utiliza extratos crus e solúveis do organismo a ser estudado, aonde a atividade particular de uma enzima pode ser visualizada, após a

eletroforese, aportando-se o substrato apropriado e evidenciando-se o produto mediante uma reação de coloração. Em condições controladas, diferenças na mobilidade isoenzimática implicam em diferenças genéticas entre população de organismos (MILES, 1985). Os resultados podem ser analisados por simples comparação ou através de procedimentos matemáticos baseados em índices de similaridade ou distância genética (READY & MILES, 1980; MILES, 1985).

O padrão isoenzimático foi primeiramente estudado por Toye (1974) que encontrou variações dentre os isolados. Miles et al. (1977; 1980) iniciaram os estudos de genética populacional do *T. cruzi* mediante análise de isoenzimas com cepas procedentes da Bahia e posteriormente de diferentes regiões do Brasil. Eles empregaram seis enzimas: ALAT, ASAT, glucofosfate isomerase (GPI), glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH), enzima málica (ME) e fosfoglicomutase (PGM), determinando a existência de dois distintos grupos de cepas chamadas de zimodemas Z1 e Z2. O Z1 corresponde aos isolados de marsupiais e triatomíneos silvestres e Z2 alberga os isolados domésticos derivados de infecções humanas e mamíferos domiciliados. Estudos posteriores mostraram a presença de um terceiro zimodema (Z3) também associado com o ambiente silvestre. Andrade et al. (1983) analisando por isoenzimas algumas amostras classificadas nos biodemas acima citados (ANDRADE, 1974) encontraram correlações entre estes e os zimodemas principais de Ready & Miles (1980). Outros zimodemas, então nomeados de ZA, ZB, ZC e ZD, foram identificados em isolados de pacientes crônicos de Minas Gerais (ROMANHA, 1982, SCHLEMPER JR, 1982). ZA é equivalente ao Z2 de Miles et al. (1977), enquanto ZB e ZC são distintos e ZD representa a mistura de parasitos com padrões ZA e ZC. Tibayrenc & Ayala (1988), analisando 15 *loci* enzimáticos em mais de 500 amostras de *T. cruzi* de diversas regiões das Américas e diferentes hospedeiros, identificaram 43 zimodemas. Logo após, Tibayrenc & Breniere (1988) observaram que tais amostras poderiam ser reunidas em dois grupos (que chamou de clones principais), os quais representariam entidades genéticas discretas (agamoespécies).

Diferentes autores têm mostrado a grande heterogeneidade das cepas do *T. cruzi* provenientes de distintos hospedeiros em diversos países da América Latina através do perfil eletroforético de enzimas (TIBAYRENC & MILES, 1983; MILES et al., 1984). Também tem-se relacionado os perfis isoenzimáticos com outros parâmetros, tais como: manifestações clínicas, área geográfica (ANDRADE E MAGALHÃES, 1997; ACOSTA et al., 2001), comportamento biológico em animais experimentais (STEINDEL et al., 1995; ANDRADE &

MAGALHÃES, 1997), resistência a quimioterápicos (CASTRO-SILVA et al., 1989) e marcadores moleculares (TIBAYRENC et al., 1993; FERNANDES et al., 1997).

1.4.3.3. Caracterização Molecular

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, atualmente é possível identificar e caracterizar amostras, cepas e clones de *T. cruzi*.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido usada para diagnóstico parasitológico de várias doenças. Esta técnica resulta na amplificação da sequência do DNA alvo que são abundantes e específicos para o parasita. A alta conservação das sequências do kDNA em *T. cruzi* detecta o parasita num fragmento de 330pb (GUHL et al., 2002). A análise do tamanho de fragmentos do kDNA amplificados por PCR utilizando-se os "primers" 121(5'AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA3') e 122 (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA3') (WINKER et al., 1994; JUNQUEIRA et al., 1996) mostrou ser específico para minicírculos do *T. cruzi* (STURM et al., 1989 *apud* JUNQUEIRA et al., 1996), podendo realizar-se tanto com culturas positivas para tripanossomas, quanto a partir do sangue coletado diretamente do paciente visando confirmação do diagnóstico de *T. cruzi* ou outra espécie de *Trypanosoma* (SABBADINI et al., 2002).

Diferentes primers podem ser usados para diagnóstico da infecção por *T. cruzi* conforme descrito na tabela 1 (GUHL et al., 2002).

Tabela 1: Primers para detecção de *Trypanosoma cruzi*. (GUHL et al., 2002).

Alvo do DNA	Nome dos primers	Sequência dos primers 5' 3'	Peso molecular
kDNA minicircle variable regions	CV1	GAT TGG GGT TGG AGT ACT ACT AT	270 bp
	CV2	TTG AAC GGC CCT CGG AAA AC	
kDNA minicircle variable regions	S35	AAA TAA TGT ACG GGT GAG ATG CAT GA	330 bp
	S36	GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT	
kDNA minicircle constant regions	S33A	TCA TGC ATC TC(C/A)CCC GTA CAT TAT TT	83 bp
	S34A	TAT ATT ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC	
kDNA minicircle constant regions	S34A	TAT ATT ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC	122 bp
	S67	TGG TTT TGG GAG GGG (C/G)(G/C)(T/G) TCA A(A/C)T TT	
kDNA minicircle variable regions	121	AAA TAA TGT ACG GGT GAG ATG CAT GA	330 bp
	122	GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA	
195 bp Nuclear repetition	TCZ1	CGA GCT CIT GCC CAC ACG GGT GCT	188 bp
	TCZ2	CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG	
195 bp Nuclear repetition	DLAZ1	GCG AAA CAG ATA TTG ACA GAG	195 bp
	DLAZ2	TGT TCA CAC ACT GGA CAC CAA	
Mini-exon gene	GE12	GGG AAG CTT CTG TAC TAT ATT GGT A	582 bp
	GE13	GGG AAT TCA ATA TAG TAC AGA AAC TG	
Mini-exon gene intergenic spacer	TC1	GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC	300 bp
	TC	CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG	
Mini-exon gene intergenic spacer	TC2	CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G	350 bp
	TC	CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG	
1025 bp Nuclear repetition	O1	TGG CTT GGA GGA GTT ATT GT	250 bp
	O2	AGG AGT GAC GGT TGA TCA GT	
rRNA 24 Sx	DF1	AAG GTG CGT CGA CAG TGT GG	110 bp
	DF2	TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT	125 bp
Flagellum protein gene	BF1	ATG GGT GCT TGT GGG TCG AAG	692 bp
	BF2	TCA AGC CTT CTC CGG CAC GTT	250 bp
Variable domain LSU RNA	D72	TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT	
	D75	GCA GAT CTT GGT TGG CGT AG	
	RG3	GCC CAA AGG GTA AGG CTC	

Em relação ao DNA nuclear várias são as ferramentas moleculares disponíveis atualmente para caracterizar cepas do *T. cruzi*. O gene de mini-exon está presente no genoma nuclear dos Kinetoplastida em aproximadamente 200 cópias arranjadas em seqüências repetitivas. É constituído por três regiões distintas: exon, intron e região intergênica. O exon é uma seqüência de 39 nucleotídeos, altamente conservados nos membros desta Ordem, e é adicionado pós-transcricionalmente a todos os RNAs mensageiros nucleares. O intron é moderadamente conservado entre as espécies de um mesmo gênero ou subgênero e a região intergênica é muito divergente entre as espécies. Com relação especificamente ao *T. cruzi*, a região intergênica do gene de mini-exon pode ser amplificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), possibilitando o agrupamento de diferentes isolados nos dois grupos principais: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (FERNANDES, 1996; SOUTO et al., 1996; FERNANDES et al., 1998).

Primers TCC (CCCCCTCCCAGGCCACACTG), TC1 (GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC) e TC2 (CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG) foram designados para amplificar os espaços não transcritos. TCC foi desenhado com uma seqüência comum para ambos os grupos, e TC1 e TC2 foram desenhados para seqüência única de cada grupo. Os primers TCC, TC1 e TC2 produzem um fragmento de 300 bp para o grupo 2 e 350bp para o grupo 1 (GUHL et al., 2002). Fernandes (2001) desenvolveu um teste de PCR multiplex utilizando os oligonucleotídeos TC I (5'-ACA CTT TCT GTG GCG CTG ATC G-3'), TC II (5'-TTG CTC GCA CAC TCG GCT GCAT-3'), TC 3 (5'-CCG CGW ACA ACC CCT MAT AAA AAT G-3'), TR (5'-CCT ATT GTG ATC CCC ATC TTC G-3') e ME (5'-TAC CAA TAT AGT ACA GAA ACT G-3'), baseado no espaçador não transcrito (região intergênica) do gene de mini-exon que permite determinar se um isolado em particular é *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, *T. cruzi* zimodema 3 ou *T. rangeli*.

Usando as seqüências do gene de mini-exon verificou-se que *T. cruzi* pode ser dividido em dois grandes grupos claramente definidos (linhagens 1 e 2) (SOUTO et al., 1996; ZINGALES et al., 1998). Esta divisão é coincidente com a subdivisão isoenzimática proposta por Miles et al. (1977, 1980). Brisse et al. (2000) descreveram cinco subgrupos de *T. cruzi* II (linhagens IIa, IIb, IIc, IId e IIe), totalizando seis linhagens filogenéticas distinguidas em *T. cruzi*. Recentemente, um novo consenso para nomenclatura intraespecífica de *Trypanosoma cruzi* foi recomendada por Zingales et al. (2009) propondo a classificação de cepas de *T. cruzi* em seis DTU's (Unidade Taxonômica Discreta), *T. cruzi* I a VI (tabela 2).

Tabela 2: Nomenclatura 2009 para subgrupos de amostras de *Trypanosoma cruzi* (ZINGALES *et al.*, 2009).

Subdivisão genética de <i>Trypanosoma cruzi</i> (DTU)	Abreviação	Equivalência ao regime de agrupamento para <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. cruzi</i> I	Tc I	<i>T. cruzi</i> I e DTU I
<i>T. cruzi</i> II	Tc II	<i>T. cruzi</i> II e DTU IIb
<i>T. cruzi</i> III	Tc III	Z3/Z1 ASAT, Z3-A, DTU IIc e <i>T. cruzi</i> III
<i>T. cruzi</i> IV	Tc IV	Z3, Z3-B e DTU IIa
<i>T. cruzi</i> V	Tc V	Z2 Boliviano, rDNA 1/2, clonet 39 e DTU II d
<i>T. cruzi</i> VI	Tc VI	Z2 Paraguaio, Zimodema B e DTU IIe

O grupo Tc I foi encontrado principalmente em triatomíneos e mamíferos silvestres, enquanto que Tc II foi usualmente observado em seres humanos (SOUTO *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 1998; ZINGALES *et al.*, 1998). Fernandes *et al.* (1999a) verificaram a presença de ambos grupos em marsupiais, Tc II primatas não humanos no Rio de Janeiro, e também verificaram a associação preferencial de Tc I com diferentes hospedeiros. Esses e outros fatos ilustram a complexidade do ciclo silvestre do *T. cruzi* o qual tem ajudado a entender como estes ciclos estão conectados; além do mais, esta nova divisão do *T. cruzi* tem trazido contribuições importantes na compreensão da eco-epidemiologia da doença de Chagas (FERNANDES *et al.*, 1999a).

1.4.4. Variabilidade intraespecífica

Trypanosoma cruzi é uma espécie heterogênea. Utilizava-se a expressão do termo “complexo *cruzi*” para referir-se ao protozoário antes de existirem as técnicas e equipamentos hoje disponíveis (COURA, 1966). A diversidade de aspectos morfológicos, imunológicos e patogênicos que o *T. cruzi* apresenta (na dependência de diversos fatores), justificariam essa designação (COURA, 1966). Essa diversidade fica evidente em diferentes populações do parasito, conhecidas como cepas ou isolados que circulam entre diversos hospedeiros vertebrados e invertebrados, silvestres e domésticos (MOREL *et al.*, 1986; ZINGALES *et al.*, 1998). Lumsden (1970 *apud* ANDRADE, 1974) define “cepa” como uma população derivada de um “isolado”, mantida em cativeiro em reprodução contínua por passagens seriadas, mecânica ou cíclica, em cultura ou em animais de laboratório. Dentre as mais conhecidas,

podemos destacar: Berenice (isolada por xenodiagnóstico da paciente de mesmo nome, possivelmente estudada por Carlos Chagas), Y (isolada por xenodiagnóstico de um caso agudo humano), CL, FL, MR (isoladas a partir de fezes de triatomíneos provenientes do Rio Grande do Sul) e Colombiana (isolada de caso agudo na Colômbia).

A variabilidade intraespecífica do *T. cruzi* pode ser explicada pela sua ampla distribuição geográfica no Continente Americano e diversidade de hospedeiros (BARRETTO & RIBEIRO, 1979). A investigação de tal diversidade pode ser realizada através de análises morfológica, biológica, bioquímicas e moleculares do parasito. Nesta perspectiva, estudos recentes têm demonstrado que a heterogeneidade intraespecífica de isolados de *T. cruzi* podem ser referidos e/ou classificados como cepas, clones principais, biodemas, zimodemas, linhagens e grupos, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3: Diversidade intraespecífica de *Trypanosoma cruzi* (SANTOS-FAISSAL, 2009).

Metodologia	Grupos	Autores
Tipos antigênicos	A, B, C	Nussenzweig, 1962 Nussenzweig & Goble, 1996
Morfologia das formas sanguíneas	Cepas polares Y e CL Formas delgadas Formas largas	Brener, 1965 Brener & Chiari, 1963 Deane, 1974
Morfologia, parasitismo, letalidade	Biodemas I, II e III	Andrade, 1974
Isoenzimas	Zimodemas 1, 2, 3 Zimodemas A, B, C, D	Miles 1977, 1980 Romanha, 1982
Perfis de restrição do kDNA	Esquizodemas	Morel, 1980
Isoenzimas RAPD	Grupo I Grupo II	Tibayrenc, 1995
rRNA Genes de não-exons	Linhagem 1- doméstico Linhagem 2- silvestre	Souto et al., 1996 Zingales et al., 1998
Técnicas parasitológicas, bioquímicas e moleculares	Tc I- silvestre Tc II - doméstico	Anon, 1999 Zingales et al., 2009
Técnicas parasitológicas, bioquímicas e moleculares	Tc II a, b, c, d, e	Brisse et al., 2000
Técnicas parasitológicas, bioquímicas e moleculares	Tc I, Tc II, Tc III, Tc IV, Tc V, Tc VI	Zingales et al., 2009

Diversos autores destacaram que a variabilidade desta espécie depende da cepa do parasito, fase da infecção, bem como espécies hospedeiras (BRENER & CHIARI, 1963; BRENER, 1965; ANDRADE, 1974). Algumas cepas de *T. cruzi* foram agrupadas de acordo com o predomínio de cada forma e comportamento com animais experimentalmente infectados, principalmente considerando os padrões de parasitemia, parasitismo tissular, virulência e letalidade (BRENER, 1965; ANDRADE, 1974). Estudos sugerem que as diferentes formas sangüíneas podem também possuir diferentes papéis biológicos e que as características de uma cepa dependem do predomínio de cada uma delas (BRENER, 1965; 1969). Vários autores forneceram evidências de que as formas delgadas seriam mais aptas à invasão celular, enquanto as largas ao desenvolvimento em triatomíneos e culturas axênicas (SILVA, 1959; BRENER, 1969; DEANE, 1979). A ocorrência de tripomastigotas sangüíneos indiferenciados foi sugerida por Deane (1979) tanto em células quanto em culturas axênicas, representando provavelmente as formas intermediárias. Brener e Chiari (1963) relataram que o padrão de crescimento de diferentes cepas de *T. cruzi* em cultura, também varia de acordo com as formas sangüíneas predominantes no momento da semeadura.

Com base nos resultados do comportamento biológico em animais experimentais, assim como estudos bioquímicos e moleculares, diversos autores têm mostrado diferenças intraespecíficas de amostras do *T. cruzi* isoladas de diferentes hospedeiros e de várias áreas geográficas (BICE & ZELEDON, 1970; PETANA & COURA, 1974; MILES et al., 1977; MELLO & BRENER, 1978; MOREL et al., 1980; ANDRADE, 1985; ARAÚJO & CHIARI, 1988). Considerando essa diversidade do *T. cruzi*, a caracterização das populações que circulam na natureza é fundamental para a avaliação do papel desses parasitos na patogênese da doença de Chagas.

Além do mais, um mesmo hospedeiro pode ser infectado simultaneamente por cepas diferentes de *T. cruzi*. Um fato marcante é a demonstração da presença de “clones principais” (TIBAYRENC & BRENIÉRE, 1988). Sabe-se hoje que o *T. cruzi* tem uma estrutura clonal (TIBAYRENC & AYALA, 1988; TIBAYRENC & AYALA, 1991). Isto implica na existência de entidades independentes (clones), as quais apresentam propriedades biológicas diferentes, distribuídos em grandes áreas geográficas, os mais freqüentes sendo chamados de clones principais (TIBAYRENC & BRENIÉRE, 1988). Entre os clones mais estudados destacamos os CL Brener e Dm28c.

Estudos recentes baseados em ferramentas moleculares mostram que esses clones “principais” que circulam numa área endêmica poderiam ser os responsáveis pelas manifestações clínicas e o tipo de resposta a quimioterápicos observados nos pacientes dessas áreas (CAMPOS & ANDRADE, 1996; ANDRADE; 1999).

Uma hipótese atual sugere que essa heterogeneidade e multiclonalidade das cepas poderiam determinar seu parasitismo preferencial e conseqüentemente variações nas formas clínicas da doença (ANDRADE, 1999). Macedo & Pena (1998) propuseram uma hipótese tentando relacionar a variabilidade genética do *T. cruzi* com sua patogenia, denominada de modelo histotrópico clonal. Este modelo parte do conhecimento já estabelecido de que o *T. cruzi* tem uma estrutura de população clonal e de que muitas cepas são policlonais (MACEDO et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1999). Entretanto, pode ocorrer seleção destes clones ou subpopulações em decorrência das técnicas de isolamento empregadas, tal como crescimento em animais experimentais ou culturas *in vitro*. Vago et al. (2000) verificaram a hipótese clonal histotrópica em humanos proposta por Macedo & Pena (1998), confirmando que os clones presentes no tecido cardíaco de pacientes são diferentes daqueles existentes no esôfago, ou seja, distintos genótipos do *T. cruzi*. Estes apresentaram uma distribuição preferencial em tecidos de pacientes chagásicos crônicos, sugerindo que a variabilidade genética do parasito é um dos fatores determinantes para a forma clínica da doença.

O polimorfismo genético do *T. cruzi* tem sido demonstrado quando são empregados marcadores isoenzimáticos (MILES et al., 1978; STEINDEL et al., 2008; TIBAYRENC & AYALA, 1988), sequências de genes de mini-exons e amplificação aleatória do DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA - RAPD) (ANDRADE, 1974; MILES, 1977; ZINGALES et al., 1998).

2. JUSTIFICATIVA

Como parte de um projeto amplo de caracterização de isolados de pacientes chagásicos crônicos de diferentes Estados brasileiros em acompanhamento no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, este estudo justifica-se pela necessidade de caracterização por diferentes abordagens de nove destes isolados obtidos pela equipe da Coleção de Tripanossomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz. A caracterização além de confirmar o diagnóstico, contribui para o conhecimento da diversidade intraespecífica em *Trypanosoma cruzi*, e futuras tentativas de correlações entre procedência, forma clínica do paciente e reação ao tratamento quimioterápico específico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Como parte de um projeto abrangente, conhecer a diversidade de novos isolados de *Trypanosoma cruzi* obtidos de pacientes chagásicos crônicos e buscar correlações com formas clínicas apresentadas pelos mesmos.

3.2. Objetivos específicos

- ❖ Caracterizar os nove isolados obtidos de pacientes chagásicos crônicos do IPEC mantidos em cultivo axênico por abordagens morfológicas, bioquímicas e moleculares.
- ❖ Comparar estes isolados com amostras de referência da Coleção de Tripanossomatídeos utilizando os mesmos parâmetros.
- ❖ Agrupar as amostras obtidas dos pacientes do IPEC com as cepas de referência de *T. cruzi* da Coleção de Tripanossomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz com base em caracteres compartilhados (fenotípicos e genotípicos).
- ❖ Verificar a possibilidade de correlações destes isolados com subgrupos de *T. cruzi* definidos pelas técnicas acima citadas, além das formas clínicas apresentadas pelos pacientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Isolados estudados

No presente trabalho, foram estudados nove isolados obtidos por hemocultura de amostras de *Trypanosoma cruzi* de pacientes portadores de doença de Chagas em acompanhamento no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) e mantidos em culturas axênicas para caracterização morfológica, bioquímica e molecular. Todos os pacientes procediam de diferentes Estados do Brasil (BA, PE, MG, PB, RS), três deles apresentavam a forma clínica cardíaca e os demais a forma indeterminada (Tabela 4).

Tabela 4: Dados dos pacientes chagásicos crônicos em acompanhamento no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC-FIOCRUZ).

Pacientes	Idade	Gênero	Forma Clínica	Procedência	Código do isolado CT-IOC
L.F.S.	49	M	Indeterminada	PE	537
J.M.C.	55	M	Indeterminada	MG	538
M.C.J.B.	51	F	Indeterminada	BA	539
L.T.A.	47	F	Indeterminada	RS	540
J.N.S.	65	M	Indeterminada	PB	541
J.M.M.	51	M	Cardíaca	BA	543
J.J.C.	66	M	Cardíaca	PE	544
M.N.G.	44	F	Cardíaca	MG	545
C.S.	53	M	Indeterminada	MG	553

4.2. Manutenção das hemoculturas de *Trypanosoma cruzi*

As culturas axênicas obtidas dos pacientes foram mantidas em estufa a 27,3°C sob duas condições de cultivos: meio *liver infusion/tryptose* (LIT) (CHIARI & CAMARGO, 1984) e meio bifásico contendo uma base de agar sangue na fase sólida *Novy MacNeal Nicolle* (NNN) com 3 mL de LIT suplementado com o total de 20% de soro fetal bovino (SFB) na fase líquida. O meio LIT foi utilizado para eliminar a possibilidade de crescimento de outra espécie de *Trypanosoma* (*Trypanosoma rangeli*), confirmando a pureza das amostras de *T. cruzi*. Todas as culturas e subculturas foram examinadas quinzenalmente, criopreservadas em Nitrogênio líquido e depositadas com números-código diferentes na Coleção de Tripanosomatídeos (CT IOC).

4.3. Caracterização morfológica

Para análise morfológica foram preparados esfregaços sobre lâminas de vidro finas, fixados com metanol por 10 minutos, tratados com HCl 5N também por 10 min e após lavadas em fluxo delicado de água e secas no ambiente. Em seguida, foram corados por aproximadamente 1h com solução de *Giemsa* (Merck) diluída em tampão fosfato 0,02M, pH 7,2 e o excesso deste corante retirado sob fluxo de água corrente. Para a preservação da coloração, estas lâminas foram montadas utilizando-se lamínulas finas e resina sintética (Permount™ -Fisher) (SOUSA, 2000, SOUSA et al., 2007). As observações dos esfregaços corados foram observadas ao microscópio óptico (M.O. *Hund* H600) com objetiva de imersão (1.000×), visando identificação e quantificação de estágios evolutivos e confecção de desenhos com o auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio óptico.

4.3.1. Análise do padrão de diferenciação celular

O padrão de diferenciação celular de cada amostra foi analisado ao microscópio óptico (1.000×) em lâminas coradas pelo *Giemsa* procedentes de culturas axênicas dos nove isolados cultivados em meios monofásico (LIT) e bifásico (NNN+LIT). Nestes exames foram

quantificados os seguintes estágios evolutivos: epimastigostas, transições epi-tripomastigotas, tripomastigotas, tripomastigotas metacíclicos, divisões e outros estágios menos frequentes (formas arredondadas em particular na extremidade posterior). Estes estágios foram quantificados, com o exame de aproximadamente 200 células encontradas ao acaso. Quando não foi possível evidenciar a formação de metacíclicos, foram realizados experimentos em barbeiros, conforme descrito no item seguinte.

4.3.1.1 Experimento de infecção de inseto vetor com um isolado de paciente chagásico

Uma das amostras obtida dos pacientes chagásicos (CT-IOC 537) foi usada para infectar experimentalmente ninfas de 3º estágio de *Triatoma infestans* não alimentados há 30 dias utilizando para este fim sistema artificial de alimentação que emprega preservativos de látex não lubrificadas. Os insetos foram obtidos do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos do IOC/Fiocruz.

Para infecção experimental dos insetos, utilizou-se cerca de 10^7 células/mL procedentes de cultura em NNN+LIT. Em seguida preparou-se uma papa de hemácia com sangue de carneiro desfibrinado estéril centrifugando três vezes (1500g, 10 min, 10°C), retirando-se o plasma e camada leucocitária após a primeira centrifugação e descartando o sobrenadante nas posteriores adicionando salina estéril até o seu volume inicial (20mL). No preservativo colocou-se a papa de hemácias e a suspensão de parasitos. Esta suspensão foi aquecida em banho Maria a 37°C e oferecida aos triatomíneos conforme a ilustração abaixo (Figura 12).



Figura 12: Sistema artificial de alimentação de barbeiros (Fonte: Protocolo Operacional Padrão da Coleção de Tripanossomatídeos).

Os triatomíneos foram dissecados após 30 dias do repasto infectante. Fixou-se o inseto com o auxílio de um alfinete entomológico transpassado nas imediações do pronoto. O conexivo e a parte superior do exoesqueleto foram cortados para retirada do tubo intestinal. Este foi macerado em solução salina suplementada com antibióticos (5-fluocitosina a 0,01%, penicilina e estreptomicina a 0,15%). Após, uma alíquota do material foi examinada a fresco ao microscópio óptico (400×). Verificado a positividade, o material foi corado com *Giemsa* tamponado para análise de metaciclogênese. Foi determinado um número de amostragem (n) igual a 24.

4.3.2. Parâmetro biométrico

Os estágios de epimastigotas e tripomastigotas foram desenhados com auxílio de câmara clara, medidas em centímetros e convertidos em micrômetros por um fator de multiplicação deduzido do tamanho de uma escala de 10 μm , a qual tem sido incluída em todas as pranchas originais. Esta escala foi confeccionada com o auxílio de uma lâmina micrométrica de referência padronizada pela Coleção de Tripanossomatídeos.

Os seguintes parâmetros morfométricos foram considerados: comprimento total (CT) incluindo o comprimento do corpo e o flagelo livre, índice nuclear (IN) que corresponde à razão baseada na distância entre a extremidade posterior ao meio do núcleo (PN) e a distância entre a extremidade anterior ao meio do núcleo (NA), e o comprimento do cinetoplasto (CK) dos epimastigotas (DIAS & FREITAS, 1943; HOARE, 1972; SOUSA, 2000).

Foram tomadas medidas de 30 epimastigotas e até 20 tripomastigotas de cada cultura analisada (Figura 13). Os valores obtidos foram convertidos em planilha do programa Excel visando o cálculo da média, desvio padrão e variação por amostragem.

As dimensões dos estágios analisados dos isolados procedentes de pacientes chagásicos e amostras de referência de *T. cruzi* foram analisadas estatisticamente empregando-se Test T- Student.

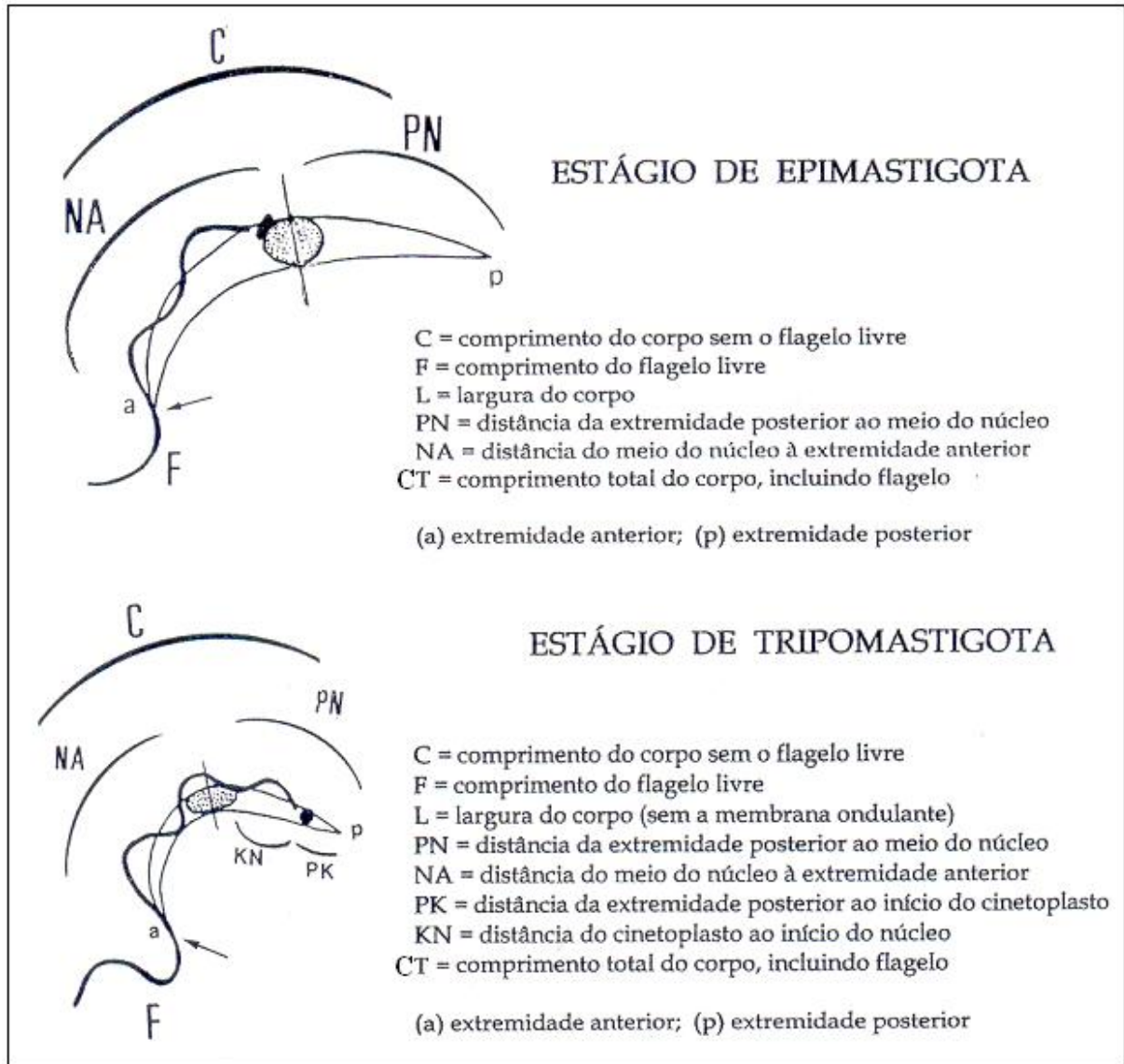


Figura 13: Parâmetros biométricos utilizados em trabalhos da Coleção de Tripanossomatídeos, IOC, Fiocruz. (DIAS & FREITAS, 1943; DEANE & DAMASCENO, 1961; HORE, 1972).

4.4. Caracterização bioquímica

Os isolados obtidos dos pacientes chagásicos e de amostras de referência de *T. cruzi* da Coleção de Tripanossomatídeos foram crescidos em meio apropriado para obtenção de massas de cerca de 10^8 células. Após lavagem das células com salina a 1% de glicose, o *pellet* obtido por centrifugação foi estocado em Nitrogênio líquido até o uso.

A determinação do perfil isoenzimático foi realizada através de eletroforese em gel de agarose e posterior análise do padrão de isoenzimas de todas as amostras em diversos sistemas

enzimáticos, segundo protocolo operacional da Coleção de Tripanossomatídeos baseado em Cupolillo *et al.* (1994) e Ready & Miles (1980).

Inicialmente, as massas parasitárias foram retiradas do criobanco e, após descongelamento, adicionou-se a estas células cerca de 100µl de solução de lise (10mL Tris HCl 0,05M pH8,0; 10mL Triton X-100 10%; 37mg EDTA dissódico; 15 mg Diitretol (DTT); 13mg ácido n-amino-capróico e H₂O q.s.p. 80 mL).

Para a confecção do gel de corrida, utilizou-se agarose a 1% (1g agarose, 50mL H₂O, 50 mL de tampão específico) aquecida e distribuída sobre *Gel Bond* em suporte de vidro horizontal (124 x 258mm); após solidificação, este gel foi mantido em 4°C por 24h.

Foram aplicadas 4 µl da suspensão de todas as amostras bem como uma alíquota de solução corante utilizada para indicar o momento de interrupção das corridas (azul de bromofenol 3,4mg/mL; xilenocianol 2,8mg/mL) na superfície do gel utilizando-se uma fita plástica com demarcação dos poços. A corrida foi realizada em cuba de eletroforese horizontal refrigerada na seguinte programação: 150 V, 320 mA, 70 W. Após a corrida, os géis foram submetidos a reação enzimática utilizando uma mistura contendo agarose 1% e tampões, substratos, co-fatores e corantes específicos de cada sistema. Após a revelação, a reação foi interrompida com ácido acético glacial 5% e os géis secos ao ar para posterior análise.

Os seguintes sistemas enzimáticos foram utilizados para a comparação do perfil eletroforético: ME (Enzima málica - E.C. 1.1.1.40), MDH (Malato desidrogenase - E.C. 1.1.1.37), PGM (Fosfoglicomutase - E.C. 2.7.5.1) e GPI (Glicose-6-fosfato isomerase – E.C. 5,3,1,9). Amostras de referência de *T. cruzi* foram incluídas em cada corrida eletroforética (Y, CL-Brener, Dm28c).

4.5. Caracterização molecular

4.5.1. Extração do DNA

A extração do kDNA foi realizada a partir de células de culturas axênicas positivas contendo cerca de 10^7 a 10^8 células por amostra. As amostras foram distribuídas em tubos Falcon ® de 15 mL (contendo 5 mL de meio NNN e 10 mL meio LIT 10 ou 20% SFB). As culturas foram lavadas 3 vezes por centrifugação (13.250g, 10 min, 4°C), desprezando-se o sobrenadante e ressuspensando-se o sedimento em solução salina/EDTA (NaCl 0,85%; EDTA 0,01 M, pH 8,0). Ao final deste processo, as massas parasitárias foram transferidas para tubo de criopreservação e ressuspensa em 1 mL de DNAzol e após centrifugadas (13.250g, 10 min, 4°C). Após essa etapa, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf ®) e ao mesmo acrescentou-se 500 µl de etanol anidro gelado (100%) e a seguir, esta suspensão foi homogeneizada e centrifugada nas condições acima citada. Após descarte do sobrenadante, adicionou-se ao *pellet* etanol a 70 %, centrifugou-se (3.500g, 2 min., 4°C) e ao final descartou-se o sobrenadante e os tubos foram secos ao ar. Após esta etapa, foram adicionados 100 µl de H₂O bidestilada. Todo o procedimento foi realizado no interior de capela de segurança (própria para extração DNA), utilizando-se materiais novos e estéreis, a fim de evitar contaminação do DNA por qualquer agente externo.

4.5.2. Análise dos Produtos de amplificação do kDNA dos minicírculos

A amplificação molecular foi feita por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se os iniciadores 121 (5'AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA3') e 122

(5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA3') baseados em fragmentos do kDNA dos minicírculos (JUNQUEIRA et al. 1996).

A PCR foi realizada num volume final de 50 µl contendo 1 ng de kDNA como molde, 200 ng de cada iniciador, 5 mM dNTP, 50 mM MgCl₂, tampão recomendado pelo fabricante (10X concentrado), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e H₂O bidestilada. A reação de amplificação foi realizada em termociclador de acordo com as seguintes condições de temperatura: a) desnaturação (94°C, 2 min. e 15 seg.); b) anelamento (55°C, 20 seg.); c) extensão (72°C, 20 seg.). Foram realizados 34 ciclos desta sequência e um ciclo final 2 minutos a 72°C. A reação foi finalizada a 4°C.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,6% com tampão TBE 1X. Ao ser solidificado demarcou-se os poços utilizando-se um pente para aplicação das amostras. Subsequentemente, o gel já colocado no interior da cuba de eletroforese horizontal (Amersham) foi submerso em tampão TBE 1X e então aplicando-se o volume total de 18 µl de cada amostra (15 µl do DNA amplificado e 3 µl do corante - Orange G). O controle negativo e marcador de 100 pb (DNA Ladder - Invitrogen®) e 1Kb (Ø X174 DNA *Hae* III digest - Sigma) também foram aplicados no gel. As seguintes programações foram utilizadas: 60V por aproximadamente 3h. Ao término da corrida eletroforética, os géis foram incubados com brometo de etídio (20 ng/mL), examinados sob luz ultravioleta e fotografados (Mini BIS Pro - BioAmérica).

4.5.3. Análise dos produtos de amplificação pelo gene de mini-exon

A tipagem pelo gene de mini-exon foi desenvolvida através da PCR multiplex, baseado na região não transcrita (região intergênica) do gene de mini-exon que permite determinar se um isolado em particular é *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, *T. cruzi* zimodema 3 ou *T. rangeli* (FERNANDES et al., 2001).

A amplificação da região não transcrita do gene de mini-exon foi realizado com uma mistura de cinco oligonucleotídeos: três oligonucleotídeos derivados de uma região hipervariável de *T. cruzi* (TC I 5'-ACA CTT TCT GTG GCG CTG ATC G-3'; TC II 5'-TTG CTC GCA CAC TCG GCT GCAT-3' e TC 3 5'-CCG CGW ACA ACC CCT MAT AAA

AAT G-3'), um oligonucleotídeo para uma região específica de regiões não transcritas de *T. rangeli* (TR 5'-CCT ATT GTG ATC CCC ATC TTC G-3') e um último oligonucleotídeo correspondendo a sequência presente na região conservada do gene de mini-exon (ME 5'-TAC CAA TAT AGT ACA GAA ACT G-3') (FERNANDES et al., 2001) (Figura 14).

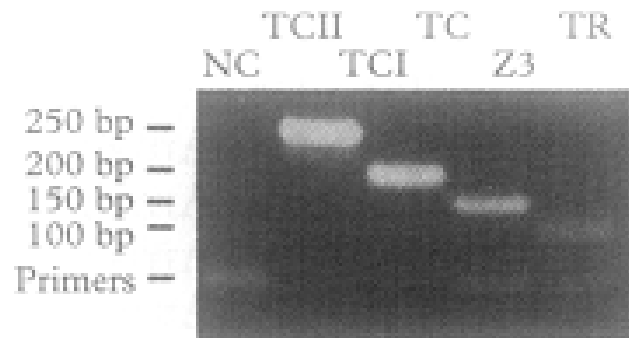


Figura 14: Imagem ilustrando a amplificação do gene de mini-exon através da técnica de PCR multiplex. NC – controle negativo, TC I (200 pb), TC2 (250 pb) e Z3 (150 pb) – cepas de referência de *T. cruzi* e TR (100 pb) – cepa de referência de *T. rangeli* (FERNANDES et al., 2001).

A PCR foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Fernandes et al. (2001) com algumas modificações e segundo protocolo operacional do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do IOC, utilizando-se 10-50 ng do DNA genômico, 50 pmoles/ μ l de cada *primer*, 10 μ M do DNTPs, 25mM de $MgCl_2$ (Gold), 2,5 U de Taq Gold (Perkim Elmer) e tampão recomendado pelo fabricante (10X Gold). A amplificação procedeu nas seguintes condições: 1 ciclo a 95°C (5 min.), 35 ciclos a 94°C (30 seg.), 55°C (30 seg.) e 72°C (30 seg.) e um ciclo a 72° (10 min.). A reação foi finalizada com um ciclo a 4°C. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 0,5X usando um marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder - Invitrogen®). A corrida eletroforética foi realizada a 80V por aproximadamente 2h e visualizado sob luz ultravioleta após ser corado com brometo de etídeo.

4.6. Análise numérica computacional para agrupamento de amostras

Os resultados de diferentes análises feitas neste trabalho foram codificados numericamente e submetidos à análise computacional com o *software* NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System – versão 2.1; Applied Bioestatistic) visando agrupamento de amostras pela similaridade global. Foram utilizados os coeficientes de similaridade SM (*Simple Matching*) e o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages*).

A análise numérica computacional foi realizada com base em 8 caracteres considerados estáveis e 20 variantes (Tabela 5). Estes caracteres foram codificados em uma matriz de dados, sendo a presença de um caracter referida como 1 e a ausência deste como 0.

Tabela 5: Parâmetros utilizados para codificação de caracteres para processamento computacional.

CARACTERES	PARÂMETROS CONSIDERADOS	NÚMERO DE VARIANTES
Crescimento em meio LIT	Sim, Não	2
Diferenciação para metacíclicos	Presença ou ausência	2
Bandas Sistema MDH	Presença ou ausência de 2 bandas	2
Bandas Sistema ME	Presença ou ausência de 3 bandas	3
Bandas Sistema GPI	Presença ou ausência de 5 bandas	5
Bandas Sistema PGM	Presença ou ausência de 2 bandas	2
Produtos amplificados do kDNA de minicírculos	Presença ou ausência de 330 pb	2
Produtos amplificados pelo gene de mini-exon	200 pb, 250 pb	2

5. RESULTADOS

5.1. Manutenção das hemoculturas de *Trypanosoma cruzi*

Com exceção de um isolado (CT-IOC 538), as amostras em estudo foram capazes de crescer em meio LIT. Todas cresceram em NNN+LIT. O comportamento morfológico de casa isolado, dentre eles o crescimento da cepa e a diferenciação celular, foi melhor obtido em meio bifásico (NNN+LIT com total de 20% SFB).

5.2. Caracterização morfológica

Por essa abordagem, foi possível detectar estágios evolutivos típicos de *T. cruzi*, tais como: epimastigotas (alguns em transições), tripomastigotas, tripomastigotas metacíclicos, além de formas de divisões. Os epimastigotas eram geralmente largos com variabilidade de tamanhos, com cinetoplastos em bastão e volumoso, enquanto os tripomastigotas metacíclicos com cinetoplastos volumoso e redondo. Estes dados podem ser observados nas pranchas ilustrativa dos estágios evolutivos (Figuras 15 e 16).

5.2.1. Análise do Padrão de diferenciação celular

A análise do padrão de diferenciação celular foi realizada pela quantificação dos percentuais dos diferentes estágios evolutivos, destacando-se a presença de metacíclicos. Assim, foi possível observar que dos nove isolados estudados sob as duas condições de cultivo

citadas, apenas quatro completaram a metaciclologênese em meio LIT (CT-IOC's 540, 541, 544 e 545). Quatro outras só o fizeram em NNN+LIT (CT-IOC 538, 539, 543, 553), enquanto uma não produziu metacíclicos nas condições examinadas (CT-IOC 537). Entretanto, esta última apresentou diferenciação para metacíclicos no intestino de *Triatoma infestans*. O padrão de diferenciação de todos os isolados analisados (Tabela 6), bem como as cepas de referência de *T. cruzi* utilizadas estão representadas nos gráficos 1 a 4.

Tabela 6: Diferenciação celular dos isolados obtidos de pacientes chagásicos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC-FIOCRUZ).

CEPA	CT-IOC ORIGINAL	CT-IOC SUBCULTURA	MEIO	EPIMASTIGOTAS %	TRANSIÇÃO %	TRIPOMASTIGOTA %	TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO %	DIVISÃO %	TOTAL	n
LFS.PE.49	537	537	NNN+LIT	96,0	1,5	1,0	ND	1,5	100%	200
	537	542	LIT	81,9	4,4	2,4	ND	11,3	100%	204
JMC.MG.56	538	538	NNN+LIT	76,5	3,0	1,5	4,5	14,5	100%	200
	538	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100%	ND
MCJB.BA.51	539	539	NNN+LIT	74,0	1,5	13,0	11,0	0,5	100%	200
	539	607	LIT	86,1	4,5	6,9	ND	2,5	100%	202
LTA.RS.47	540	540	NNN+LIT	81,9	4,1	9,5	1,3	3,2	100%	221
	540	598	LIT	86,0	1,4	6,3	2,9	3,4	100%	207
JNS.PB.65	541	541	NNN+LIT	61,7	1,9	12,6	16,0	7,8	100%	206
	541	575	LIT	62,0	2,0	12,5	19,5	4,0	100%	200
JMM.BA.51	543	543	NNN+LIT	58,9	1,5	18,3	19,8	1,5	100%	202
	543	577	LIT	93,5	ND	2,0	ND	4,5	100%	110
JJC.PE.66	544	544	NNN+LIT	84,0	1,5	2,5	11,5	0,5	100%	200
	544	600	LIT	84,5	2,0	8,0	2,5	3,0	100%	200
MNG.MG.44	545	545	NNN+LIT	85,0	5,8	5,4	1,9	1,9	100%	206
	545	602	LIT	78,5	1,4	10,8	19,3	ND	100%	213
CS.MG.53	553	553	NNN+LIT	63,5	ND	16,5	17,5	2,5	100%	200
	553	608	LIT	93,0	1,5	3,5	ND	2,0	100%	200

5.2.2. Análise biométrica

Os dados biométricos de epimastigotas e tripomastigotas dos isolados obtidos estão apresentados na tabela 7. Através da análise dos resultados das medidas do comprimento total de epimastigotas, observamos variações nas dimensões das células na maioria dos isolados em meio LIT.

Para validar os resultados obtidos na caracterização biométrica, os valores de comprimento total dos tripomastigotas e eixo longitudinal do cinetoplasto dos epimastigotas, por serem considerados parâmetros com menor variação, foram submetidos à análise

estatística para comparação com as cepas de referência de *T. cruzi*, utilizando-se o teste *T-Student*. Os resultados obtidos nessa análise confirmaram a semelhança significativa entre os parâmetros escolhidos: $p < 0,259$ para o comprimento dos cinetoplastos de epimastigotas (Tabela 8) e $p < 0,315$ para o comprimento total dos tripomastigotas (Tabela 9).

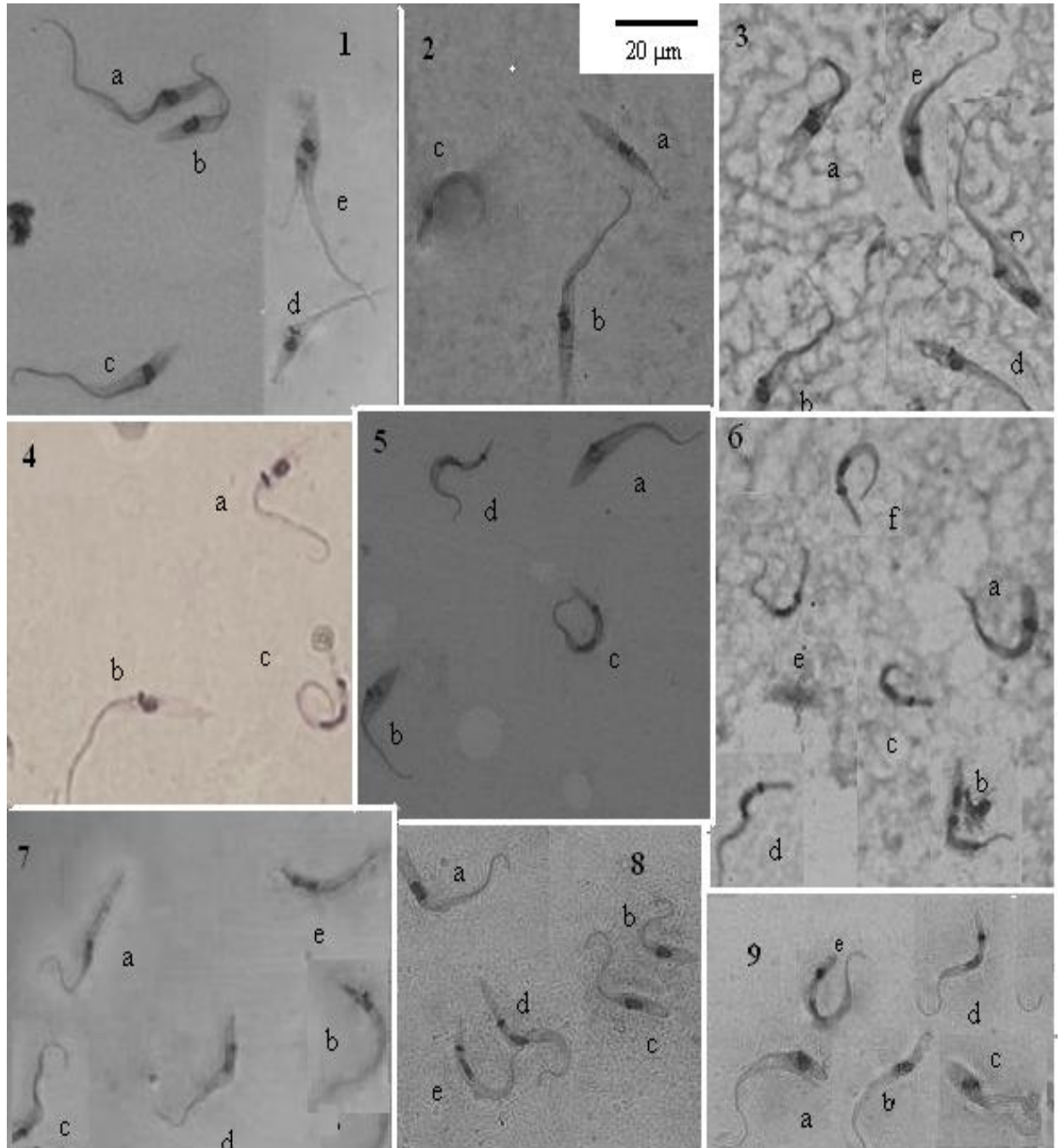


Figura 15: Estágios evolutivos representativos dos isolados obtidos de pacientes chagásicos crônicos em culturas axênicas: (1) 537, (2) 538, (3) 539, (4) 540, (5) 541, (6) 543, (7) 544, (8) 545, (9) 553. Estágios epimastigotas (1 a-d; 2 a-b, 3 a-c,e; 4 a-b; 5 a-b; 6 a-b; 7 a-c; 8 a-c; 9 a-c), tripomastigotas metacíclicos (2 c; 4 c; 5 c-d; 6 c-f; 8 d-e; 9 d-e), tripomastigotas (7 d-e), transição epi-tripomastigota (3 d), divisão (1 e). Micrografias em Giemsa tamponado retiradas no microscópio óptico com captura de imagem acoplada ao microcomputador com aumento de 100X e com escala de 20 µm.

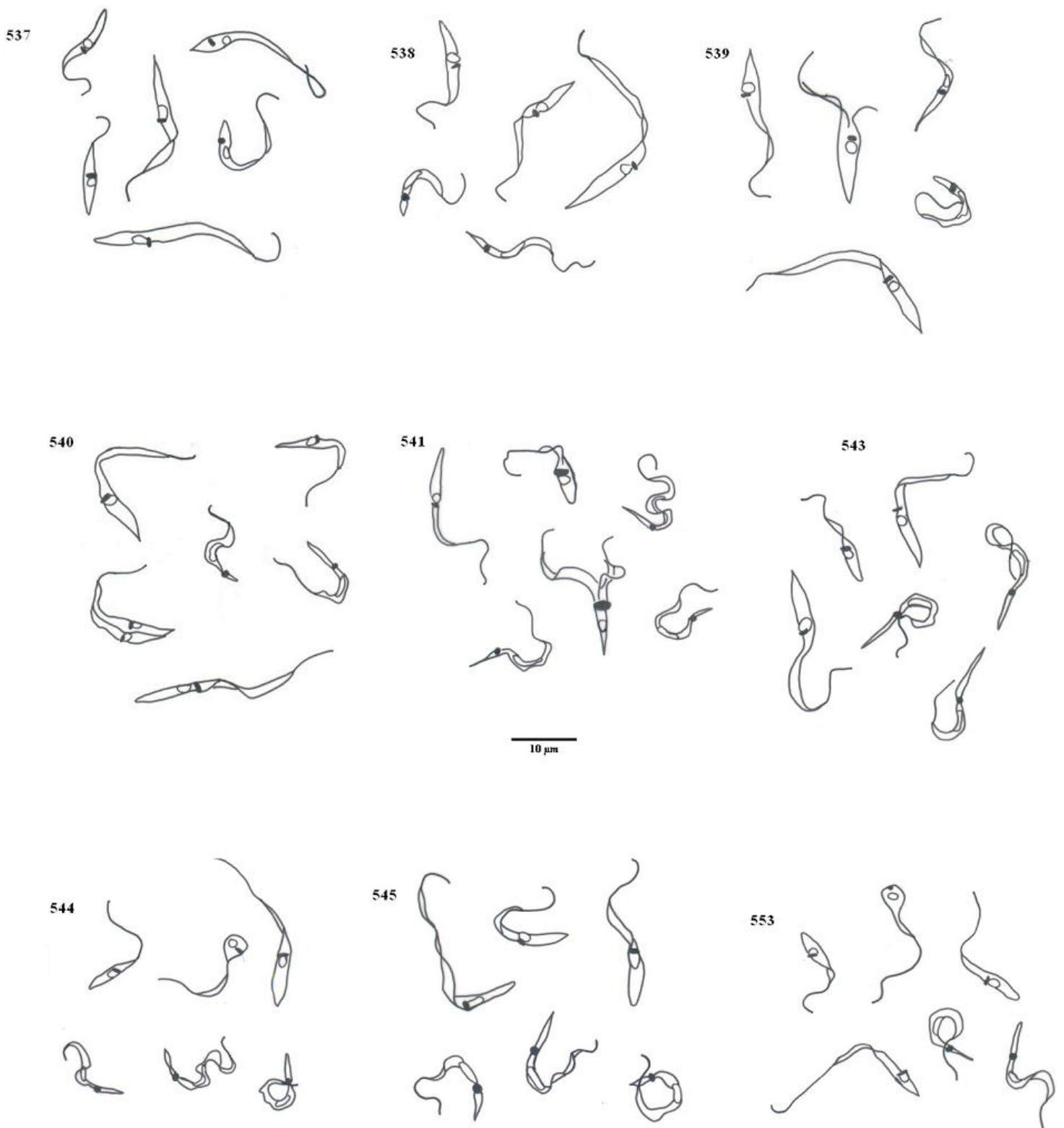


Figura 16: Estágios evolutivos representativos dos isolados obtidos de pacientes chagásicos crônicos em culturas axênicas. Desenhos em câmara clara de lâminas coradas pelo *Giemsa* tamponado.

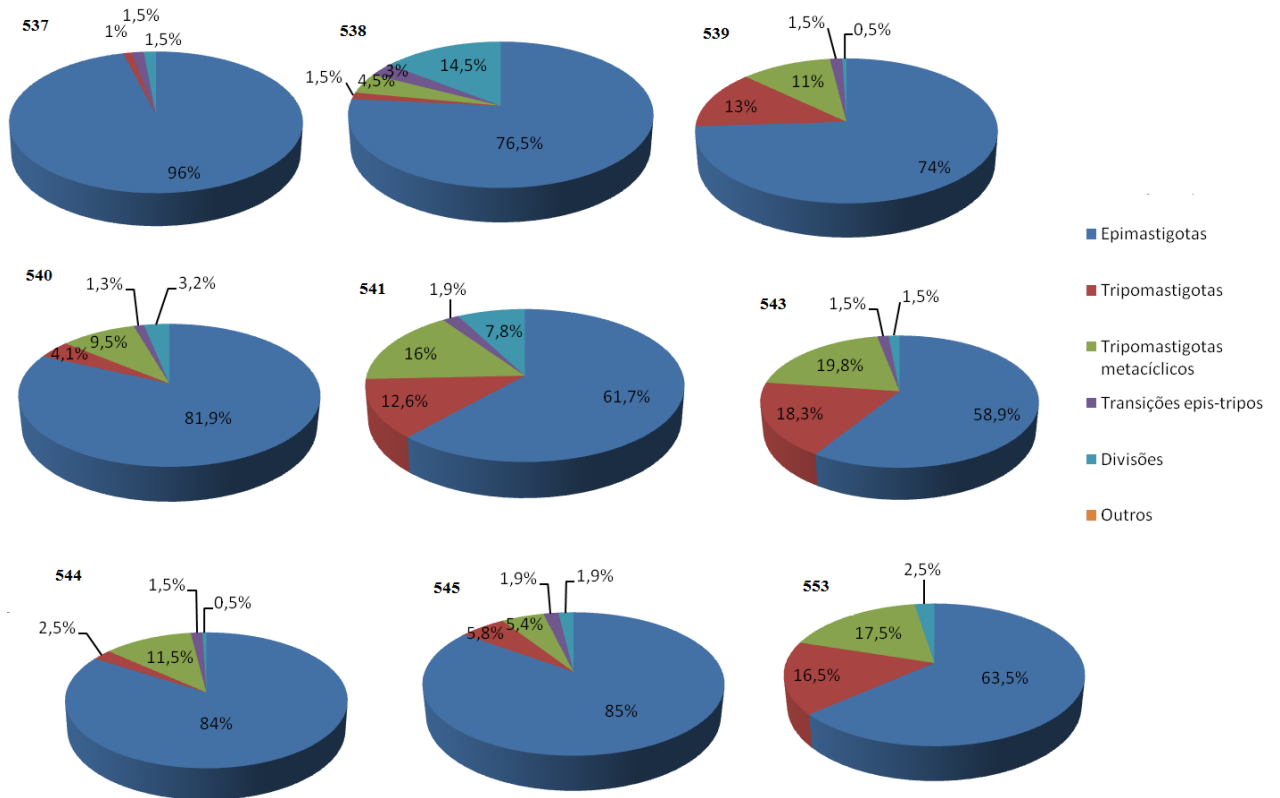


Gráfico 1: Padrão de diferenciação celular das amostras de *Trypanosoma cruzi* obtidas de pacientes chagásicos crônicos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, cultivadas em NNN+LIT 20% SFB.

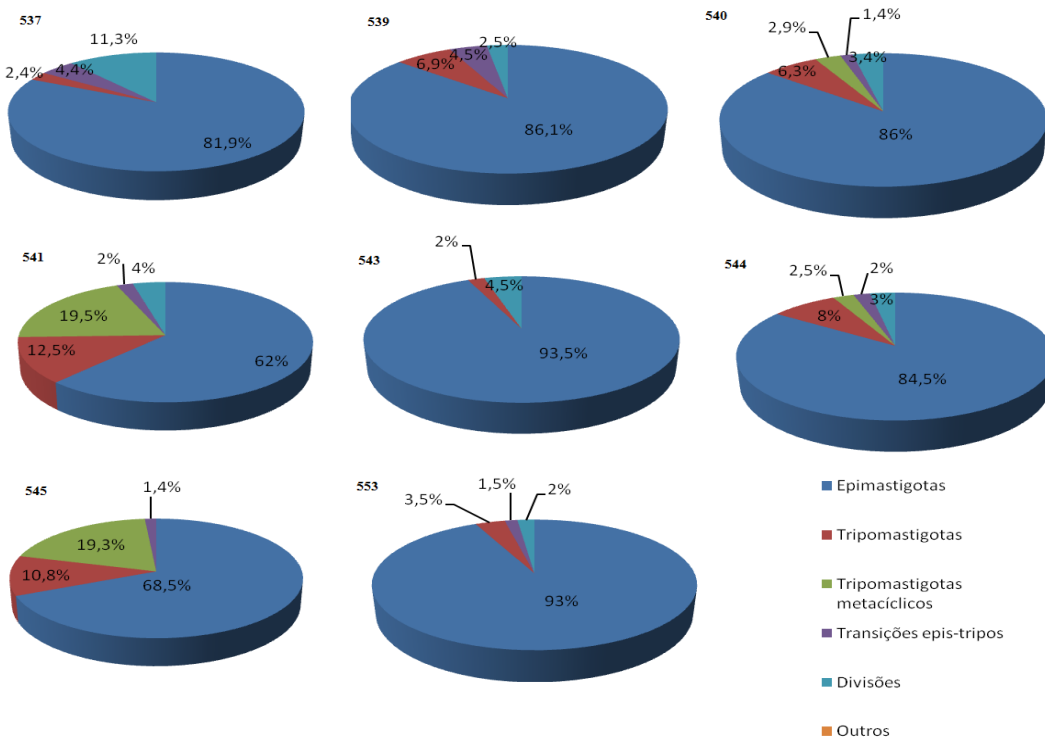


Gráfico 2: Padrão de diferenciação celular das amostras de *Trypanosoma cruzi* obtidas de pacientes chagásicos crônicos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, cultivadas em LIT.

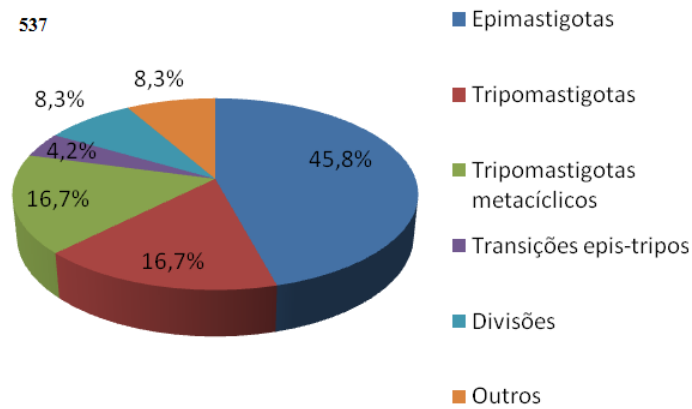


Gráfico 3: Padrão de diferenciação celular da amostra 537 em *Triatoma infestans*.

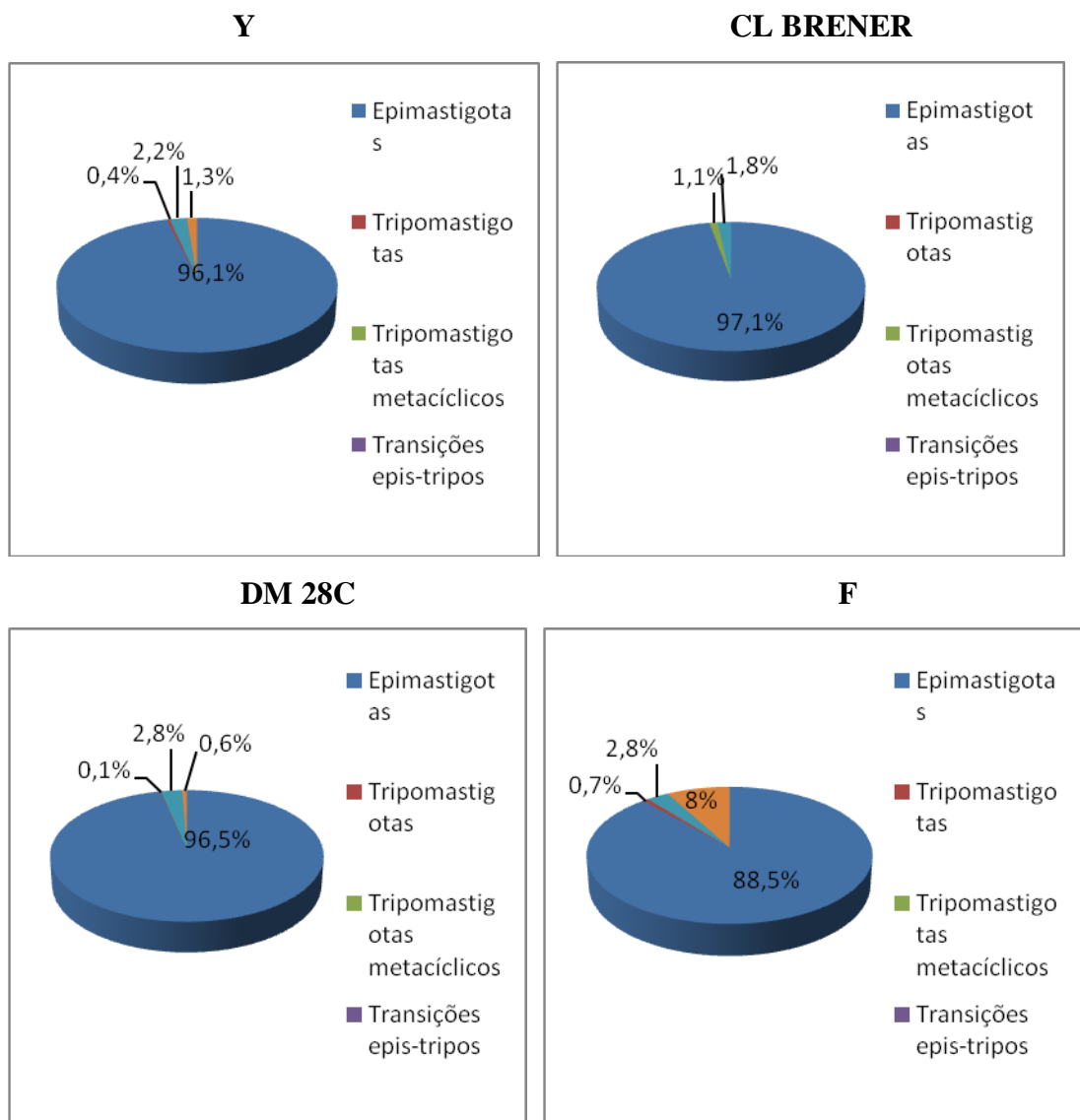


Gráfico 4: Padrão de diferenciação celular em cepas de referência de *Trypanosoma cruzi* (Y, CL Brener, Dm28c, F).

Tabela 7: Análise morfométrica dos isolados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de pacientes chagásicos crônicos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

Cepa	CT-IOC Amostra original	CT-IOC Subcultura	Meio	Epimastigotas [†]			Tripomastigotas		
				CT	IN	CK	CT	IN	n
LFS.PE.49	537	537	NNN+LIT 20% SFB	29,1±5,5 (18,7-40,7)	0,7±0,4 (0,3-1,5)	1,7±0,3 (1,2-2,7)	ND	ND	ND
	537	542	LIT	30,8±5,8 (20,4-42,2)	0,7±0,3 (0,1-1,5)		ND	ND	ND
JMC.MG.55	538	538	NNN+LIT 20% SFB	27,5±4,1 (20,8-37,4)	0,6±0,3 (0,3-1,9)	1,7±0,2 (1,2-2,3)	22,5±4,7 (10,2-30,0)	1,2±0,4 (0,6-2,2)	20
	538	ND	LIT	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MCJB.BA.51	539	539	NNN+LIT 20% SFB	28,7±4,4 (19,6-39,6)	0,9±0,6 (0,4-2,5)	1,8±0,3 (1,2-2,3)	21,3±4,5 (16,1-32,6)	1,4±1,2 (0,5-6,0)	20
	539	607	LIT	22,7±3,9 (16,1-29,6)	0,5±0,2 (0,3-0,8)		ND	ND	ND
LTA.RS.47	540	540	NNN+LIT 20% SFB	24,3±4,4 (15,3-33,5)	0,6±0,2 (0,3-1,1)	1,7±0,2 (1,2-2,1)	20,1±3,0 (16,1-27,4)	1,4±0,5 (0,6-2,7)	20
	540	598	LIT	29,7±6,4 (17,4-39,8)	0,5±0,3 (0,2-1,6)		19,7±2,5 (14,4-24,8)	1,4±0,4 (0,7-1,8)	20
JNS.PB.65	541	541	NNN+LIT 20% SFB	23,8±4,7 (16,1-33,5)	0,5±0,2 (0,2-1,0)	1,8±0,3 (1,2-2,3)	19,1±2,5 (14,8-24,4)	1,1±0,3 (0,5-1,8)	20
	541	575	LIT	23,3±6,5 (11,9-35,9)	0,9±0,5 (0,3-1,6)		20,2±3,6 (12,6-26,5)	1,3±0,4 (0,6-1,9)	15
JMM.BA.51	543	543	NNN+LIT 20% SFB	27,2±5,5 (19,1-38,3)	1,1±0,8 (0,4-3,9)	1,6±0,3 (1,0-2,3)	24,9±3,0 (20,2-31,7)	1,2±0,6 (0,5-2,3)	10
	543	577	LIT	30,2±6,1 (18,5-43,0)	0,5±0,1 (0,2-0,8)		ND	ND	ND
JJC.PE.66	544	544	NNN+LIT 20% SFB	25,7±7,0 (15,5-39,5)	0,7±0,3 (0,3-1,6)	1,6±0,2 (1,2-2,1)	19,0±2,1 (15,7-22,2)	1,2±0,4 (0,6-2,2)	20
	544	600	LIT	25,3±5,1 (17,9-34,4)	0,5±0,1 (0,3-0,8)		ND	ND	ND
MNG.MG.44	545	545	NNN+LIT 20% SFB	25,5±4,6 (17,2-36,1)	0,8±0,3 (0,3-1,3)	1,7±0,2 (1,5-2,3)	23,2±2,5 (20,0-28,7)	1,1±0,4 (0,6-2,4)	30
	545	602	LIT	28,5±5,3 (16,9-35,7)	0,6±0,4 (0,2-1,7)		26,5±2,1 (23,5-30,8)	1,0±0,3 (0,6-1,5)	12
CS.MG.53	553	553	NNN+LIT 20% SFB	24,1±4,8 (17,4-33,9)	0,6±0,3 (0,2-1,1)	1,8±0,2 (1,2-2,3)	22,1±2,6 (17,4-28,2)	1,2±0,4 (0,6-2,1)	20
	553	608	LIT	27,3±5,1 (14,8-38,3)	0,7±0,4 (0,3-2,1)		ND	ND	ND
Y	106	106	NNN+LIT	28,4±6,0 (14,8-44,4)	0,8±0,3 (0,4-2,0)	1,9±0,3 (1,3-2,3)	ND	ND	ND
CL-Brener	005	005	NNN+LIT	24,1±3,5 (15,3-30,5)	0,8±0,3 (0,4-1,5)	1,8±0,3 (1,2-2,3)	19,0±2,4 (14,4-22,2)	1,2±0,4 (0,7-2,0)	20
Dm28c	010	010	NNN+LIT	27,1±6,0 (14,8-41,4)	1,0±0,6 (0,4-3,4)	1,7±0,3 (1,2-2,3)	ND	ND	ND
F	003	003	NNN+LIT 20% SFB	24,3±4,4 (15,5-33,5)	0,8±0,6 (0,3-3,0)	1,8±0,2 (1,5-2,3)	ND	ND	ND

Todas as amostras estão em µm (média, desvio padrão e variação).

CT-IOC - Número Código na Coleção de Tripanossomatídeos IOC; **Amostra original** - hemocultura isolada de pacientes chagásicos crônicos do IPEC mantida em NNN+LIT; **Subcultura** - amostra original submetida ao meio LIT; **CT**- comprimento total incluindo o flagelo livre; **IN** - índice nuclear; **CK**- cinetoplasto; **n** - número de amostragem; * n=30; **ND** - não determinado: não encontrado e / ou poucos parasitos encontrados nesse estágio.

Tabela 8: Análise estatística (T-Test) dos dados biométricos do eixo longitudinal do cinetoplasto de epimastigotas.

	Isolados IPEC		Amostras de Referência de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Significância estatística (p)
Média/SD	1,7 ± 0,07	X	1,8 ± 0,1	p < 0,259

Tabela 9: Análise estatística (T-Test) dos dados biométricos do comprimento total de tripomastigotas.

	Isolados IPEC		Amostras de Referência de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Significância estatística (p)
Média	21,6	X	19,0	p < 0,315

* Os dados não apresentaram desvio padrão pois apenas a amostra CL-Brener apresentou estágio tripomastigota diferenciado.

5.3. Caracterização bioquímica

A análise da mobilidade eletroforética dos sistemas enzimáticos MDH, ME, GPI, PGM, dos nove isolados estudados compartilharam bandas com três das cepas de referência de *T. cruzi* incluídas neste trabalho.

Os sistemas MDH e ME revelaram pequenas variações no padrão eletroforético para as nove amostras analisadas e para as cepas de referência de *T. cruzi*. Entretanto, os sistemas GPI e PGM evidenciaram a heterogeneidade dos isolados estudados. Assinalamos que os isolados 539 e 540 apresentaram perfis eletroforéticos semelhantes ao clone CL-Brener, 541 ao Dm28c e os demais a cepa Y. O diagrama apresentado na figura 17 ilustra estes resultados.

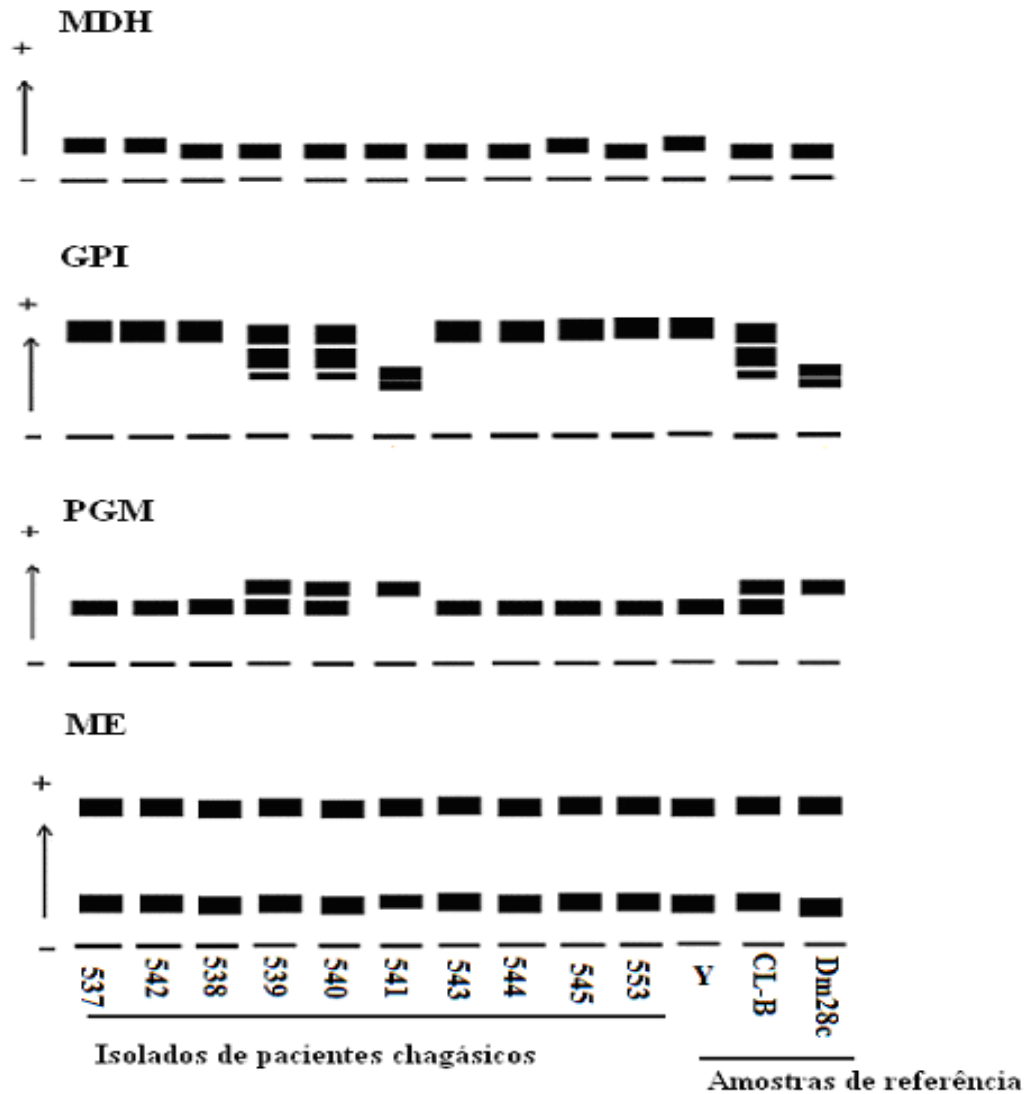


Figura 17: Diagrama representativo do padrão isoenzimático dos isolados obtidos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas e de amostras de referência de *T. cruzi*.

5.4. Caracterização molecular

5.4.1. Análise dos produtos de amplificação do kDNA dos minicírculos

Todos os isolados do IPEC, bem como as cepas de referência de *T. cruzi* estudadas, geraram um produto amplificado de 330pb procedentes dos minicírculos do kDNA amplificados por PCR com os *primers* 121/122 (Figura 18).

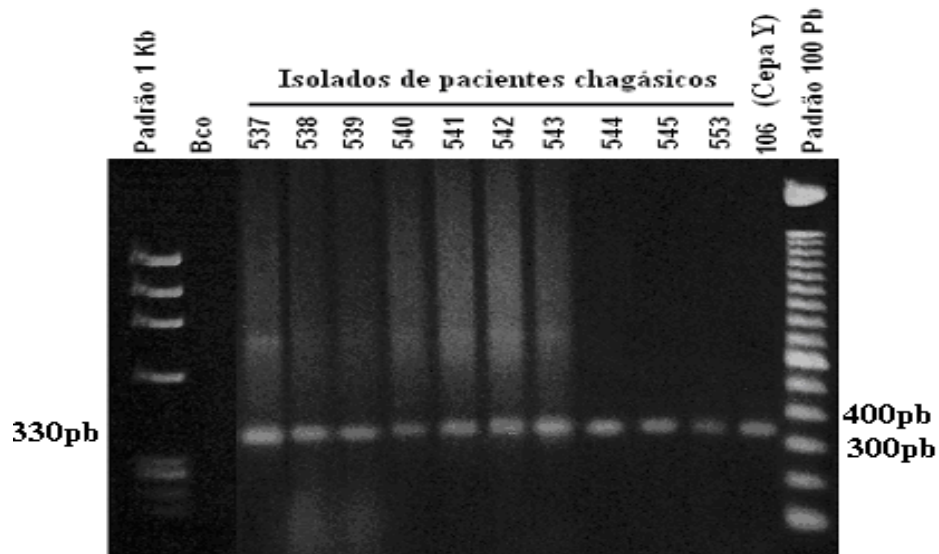


Figura 18: Produto do kDNA amplificado por PCR (*Primers* 121 e 122) apresentado pelos isolados obtidos de pacientes chagásicos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

5.4.2. Análise dos produtos de amplificação pelo gene de mini-exon

Os produtos de amplificação por PCR multiplex do gene de mini-exon são apresentados na figura 19.

O isolado CT-IOC 541, bem como as cepas de referência de *T. cruzi* Dm28c e F, apresentaram fragmentos de 200 bp, indicando sua classificação no subgrupo Tc I. Por outro lado, os demais isolados e a cepa Y utilizada como referência, apresentaram um produto amplificado de 250 pb sendo desta forma classificadas no subgrupo Tc II de *T. cruzi*.

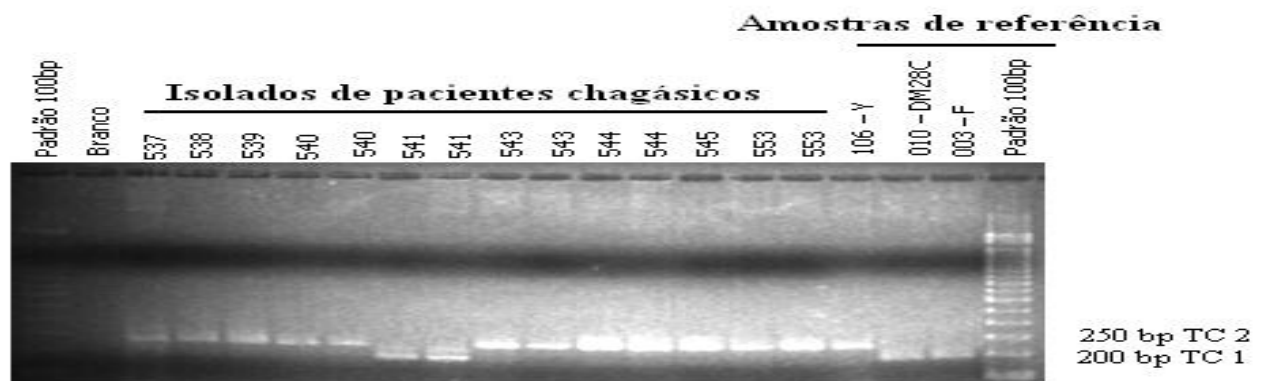


Figura 19: Produto de amplificação pelo gene de mini-exon por PCR multiplex apresentado pelos isolados obtidos de pacientes chagásicos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas e cepas de referência de *T. cruzi*.

5.5. Análise numérica computacional

A matriz numérica de dados selecionada para esta análise está apresentada na tabela 10. A análise computacional destes dados utilizando índice de similaridade global (SM) e algoritmo de agrupamento (UPGMA) permitiu a elaboração do fenograma apresentado na figura 20. Os resultados mostraram a variação intraespecífica das amostras estudadas, evidenciadas pela formação de subgrupos de *T. cruzi*.

Tabela 10: Codificação de caracteres selecionados dos isolados IPEC e cepas de referência de *T. cruzi* para processamento computacional usando o índice de similaridade de Jaccard e algoritmo de agrupamento de UPGMA.

	Crescimento em Lit	Metaciclogênese	MDH	ME	GPI	PGM	PCR kDNA de minicírculos 330pb	PCR gene de mini - exon
	1 2	1 2	1 2	1 2 3	1 2 3 4 5	1 2	1 2	1 2
CT-IOC 537	10	01	01	010	00001	10	10	01
CT-IOC 538	01	10	10	010	00001	10	10	01
CT-IOC 539	10	10	10	010	01110	11	10	01
CT-IOC 540	10	10	10	010	01110	11	10	01
CT-IOC 541	10	10	10	001	11000	01	10	10
CT-IOC 543	10	10	10	010	00001	10	10	01
CT-IOC 544	10	10	10	010	00001	10	10	01
CT-IOC 545	10	10	01	010	00001	10	10	01
CT-IOC 553	10	10	10	010	00001	10	10	01
CT-IOC 106 (Y)	10	01	01	010	00001	10	10	01
CT-IOC 005 (CL-Brener)	10	10	10	010	01110	11	10	01
CT-IOC 010 (Dm28c)	10	01	10	100	11000	01	10	10

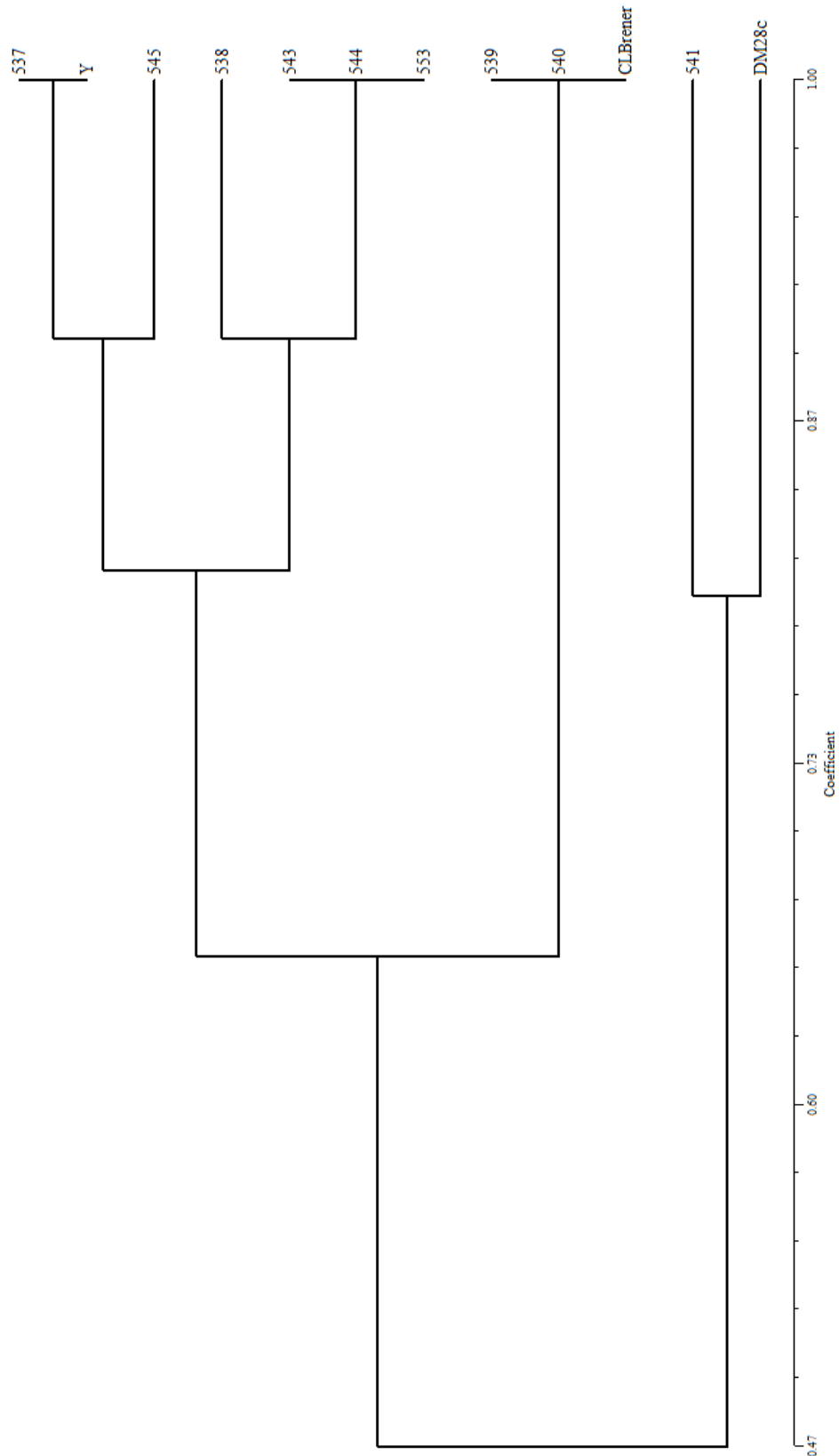


Figura 20: Fenograma de similaridade global utilizando algoritmo de agrupamento de Similaridade Global (SM) de isolados obtidos de pacientes chagásicos crônicos do IPEC (537, 538, 539, 540, 541, 543, 544, 545, 553) e cepas de referência de *Trypanosoma cruzi* (Y, CL Brener e Dm28c).

6. DISCUSSÃO

A diversidade apresentada por isolados de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 foi observada praticamente logo após sua descoberta (CHAGAS, 1912). Também foram observadas variações nas manifestações clínicas da doença de Chagas, além de diferenças regionais (ANDRADE & ANDRADE, 1979, BRENER, 1987).

Trypanosoma cruzi cresce em diversos meios de cultivos convencionais a temperatura cerca de 27°C, apresentando estágios similares aos encontrados em insetos triatomíneos (e.g. HOARE, 1972; BARRETO & RIBEIRO, 1979; SOUSA, 1999). Neste trabalho observou-se que, com exceção de um isolado (CT-IOC 538), as amostras em estudo foram capazes de crescer em meio LIT, característica comum entre cepas e clones de *T. cruzi*. Entretanto Sousa et al. (2005) observaram que uma das cepas de referência de *T. cruzi* (cepa F) também é incapaz de crescer em LIT. Todas cresceram em NNN+LIT 20% SFB.

Os isolados estudados apresentaram estágios evolutivos e cinetoplastos típicos de *T. cruzi* (HOARE, 1972; BARRETO & RIBEIRO, 1979; SOUSA, 1999; SOUSA et al., 2008; MADEIRA et al., 2009; SANTOS-FAISSAL, 2009). Entretanto, um isolado não produziu metacíclicos nas condições de cultivos estudadas (CT-IOC 537), mas revelou estes quando mantidos em triatomíneos, assim confirmando sua identidade como *T. cruzi*. Dentre os estágios observados, os mais predominantes foram os epimastigotas. Em meio LIT, apenas quatro amostras apresentaram diferenciação para metacíclicos (CT-IOC 540, 541, 544 e 545) enquanto que as cultivadas ao meio NNN+LIT 20% SFB, com exceção da amostra CT-IOC 537, completaram a metaciclogênese.

Estudos biométricos com amostras de referência de *T. cruzi* revelaram dois importantes parâmetros de valor diagnóstico para caracterização e identificação de *T. cruzi*: comprimento total de tripomastigotas, além da dimensão do cinetoplasto de epimastigotas (SOUSA et al., 2008; MADEIRA et al. 2009; SANTOS FAISSAL, 2009), por isso foram selecionados também neste estudo. Os isolados obtidos de pacientes do IPEC apresentaram médias de comprimento total entre 19,0–26,5 μm e de dimensões dos cinetoplastos entre 1,6–1,9 μm , estas se encaixam nos valores obtidos com cepas de referência (SANTOS-FAISSAL, 2009), mas são pouco significantes estatisticamente (CT= $p < 0,315$; K= $p < 0,259$).

Estes resultados mostram a diversidade biológica e morfológica das diferentes amostras em estudo, tal como foi também observada por Sousa et al.(2005) com cepas de referência de *T. cruzi*.

Com o avanço nas técnicas de análise bioquímica e molecular de microrganismos, os isolados de *T. cruzi* também passaram a ser estudados por estas abordagens (revisão de GIBSON & MILES, 1985). Dentre estas técnicas, a análise eletroforética de isoenzimas (e.g. MILES et al. 1977; 1978; 1980; ANDRADE et al. 1983; TIBAYRENC & AYALA 1988) e dos perfis de restrição do DNA do cinetoplasto (e.g MOREL et al., 1980) foram de grande importância para a caracterização de cepas de *T. cruzi* e identificação de subgrupos com padrões eletroforéticos semelhantes, estes denominados, respectivamente, zimodemas e esquizodemas.

A análise de isoenzimas (aloenzimas) continua sendo utilizada nos dias atuais, pois estas são consideradas bons marcadores genéticos (e.g. MILES et al., 1980; TIBAYRENC, 1995). Os três zimodemas de Miles et. al. (1977; 1978) (Z1, Z2 e Z3) foram encontrados infectando o homem na fase aguda da doença mas na fase crônica Z2 foi principalmente encontrado (apud ROMANHA & BRENER, 1988). Essa predominância de *T. cruzi* Z2 em pacientes na fase crônica tem sido relatada por muitos autores (ROMANHA & BRENER, 1988). No presente estudo, foi possível observar a diversidade dos isolados tendo-se encontrado três grupos com mais de 70% de similaridade. O primeiro grupo incluía as amostras CT-OC 537, 538, 543, 544, 545 553 e a cepa Y, este pertencente ao zimodema 2 de

Miles et al. (1977; 1978), o segundo grupo incluía CT-IOC 539, 540 e CL-Brener correspondente ao zimodema B, e o terceiro grupo incluía as amostras CT-IOC 541 e Dm28c associadas ao zimodema 1. Os isolados dos pacientes que apresentavam a forma cardíaca (CT-IOC 543, 544 e 545) foram agrupados no primeiro grupo, possivelmente associado ao Zimodema 2. Os isolados obtidos dos pacientes que apresentavam a forma indeterminada distribuíram-se nos três grupos encontrados. Assinalamos que há relatos controversos entre correlações de formas clínicas e zimodemas de *T. cruzi* (*apud* ROMANHA et al., 1988). Uma outra evidência é que, embora outros autores tenham encontrado os três zimodemas em pacientes chagásicos crônicos, nenhum foi conclusivamente responsável por uma forma clínica da doença (*apud* ROMANHA et al., 1988). Outro achado importante do presente estudo foi à presença de *T. cruzi* Z1 isolado de paciente crônico com forma clínica indeterminada. Embora este zimodema já tenha sido relatado em pacientes humanos principalmente na fase aguda, no Brasil o mesmo é frequentemente associado a reservatórios silvestres (principalmente marsupiais) (MILES et al., 1978; MILES et al., 1980; ROMANHA et al., 1988). O presente trabalho também confirma a predominância de *T. cruzi* Z2 em pacientes chagásicos crônicos (MILES et al. 1978; MILES et al., 1980; *apud* ROMANHA et al., 1988).

Após a separação das cepas de *T. cruzi* em três zimodemas principais (MILES et al. 1977), outros autores consideraram a existência de diferentes zimodemas (ROMANHA & BRENER, 1988; TIBAYRENC & AYALA, 1988; DE LUCAD'ORO, et al., 1993). Vale ressaltar o trabalho de Tibayrenc & Ayala (1988) que estudaram grande número de amostras de *T. cruzi* (mais de 500) e analisando 15 *loci* enzimáticos evidenciaram 43 zimodemas. Posteriormente concluíram que tais zimodemas poderiam ser reunidos em um número limitado de grupo, os quais denominaram de clones principais (TYBAYRENC & BRENIÉRE, 1988).

Souto & Zingales (1993) utilizando marcadores moleculares, propuseram a subdivisão de *T. cruzi* apenas em dois grupos: grupo I (que incluía as cepas Y, CL e Yuyu) e grupo II (incluindo, por exemplo, Dm28c, F, G dentre outras). Após, Tibayrenc (1995) propõe a subdivisão de *T. cruzi* em duas linhagens filogenéticas principais, grupo 1, para as cepas descritas como zimodema 1, e grupo 2 para as amostras agrupadas nos zimodemas 2 e 3. Subsequentemente, Souto et al. (1996) estudando diversas amostras de *T. cruzi* através da amplificação por PCR de seqüências da região 24S α do rRNA e de uma determinada região

do gene de mini-exon, confirmaram a existência destes 2 grupos principais, os quais chamaram de linhagens 1 e 2 correspondendo aos subgrupos atualmente conhecidos como Tc II e Tc I respectivamente (ANON, 1999). Novos avanços na técnica de PCR (PCR multiplex) possibilitaram uma melhor discriminação de espécies de *Trypanosoma* e seus subgrupos (FERNANDES et al., 2001). No presente estudo confirmamos a presença de Tc I e Tc II nos isolados dos pacientes chagásicos e a variabilidade dentro das amostras de cada subgrupo.

Considerando a recomendação de uma reunião da comunidade científica (ANON, 1999) e um novo consenso para a nomenclatura de subgrupos de amostras de *T. cruzi* proposta por Zingales et al. (2009), os isolados estudados neste trabalho foram classificados em três subgrupos: Tc I (para o isolado CT IOC 541 que agrupou com a cepa Dm28c), Tc II (para todas as amostras que agruparam com a cepa Y tais como CT-IOC's 537, 538, 543, 544, 545 e 553) e Tc VI (para as amostras que agruparam com a cepa CL Brener CT-IOC's 539 e 540). Tais conclusões basearam-se nas análises feitas neste estudo e nos agrupamentos de amostras apresentados no fenograma (Figura 20).

7. CONCLUSÕES

Todas as amostras estudadas foram caracterizadas e confirmadas como *T. cruzi* por abordagens morfológicas, bioquímicas e moleculares.

A diversidade intraespecífica foi observada através da capacidade de crescimento ou não em meio Lit, variações nas taxas de metaciclogênese, análises de isoenzimas e de produtos de amplificação por PCR de seqüências do gene mini-éxon.

Todos os isolados apresentaram afinidades com todas as cepas de referência incluídas neste estudo, os mesmos agrupando-se com base na similaridade global através de procedimentos da taxonomia numérica.

No presente trabalho não foi possível identificar correlações estritas entre as características dos isolados estudados e formas clínicas. Porém, isolados de pacientes portadores da forma clínica cardíaca foram classificados no subgrupo Tc II.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANON. Recommendation from a satellite meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94 (Suppl. 1), p. 429-432, 1999.

ARAÚJO, C.A.C. *Variáveis relacionadas ao Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909) e ao vetor Triatoma brasiliensis (Neiva, 1911) que interferem na interação parasito-hospedeiro*. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, 2006.

ARAÚJO, S.M.; CHIARI, E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 83: 175-181, 1988.

ANDRADE, S.G. *Patologia experimental da doença de Chagas*. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. A., BARRAL-NETTO, M. (eds.). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 177-200.

ANDRADE, S.G. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strain and the importance of principal clones. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94 (supl. 1), p. 185-187, 1999.

ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B. Biodemes and zynodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Medicina Tropical*, v. 30, p. 27-35, 1997.

ANDRADE, S.G.. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardiopatia in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 85, p. 17-27, 1990.

ANDRADE, S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 18 (supl.), p. 39-46, 1985.

ANDRADE, V.; BRODSKY, C.; ANDRADE, S.G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 77, p. 796-799, 1983.

ANDRADE, S.G. Biological characterization of strains of *Trypanosoma cruzi*. In: Anais do Congresso Internacional de Doença de Chagas. Rio de Janeiro, 1979.

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

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. Patologia. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. A. *Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p.199-248.

BADINEZ, S.O. Contribución a La anatomia patológica de La enfermedad de Chagas experimental. *Biológica*, v. 3, p. 3-52, 1945.

BARRETO, M.P.; RIBEIRO, R.D. Reservatórios silvestres do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 39 (1), p. 25-36, 1979.

BICE, D.E.; ZELEDON, R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J Parasitol*, v. 56, p. 663-670, 1970.

BRAND, T.; TOBIE, E.J.; KISSLING, E.R.; ADAMS, G. Physiological and pathological observations on four strains of *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis*, v. 82, p. 5-16, 1949.

BRANDAO, A. A.; MIRANDA, A.; [DEGRAVE, W. M.](#); SOUSA, M. A. The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. *Zeitschrift Für Parasitenkunde (Parasitology Research)*, Berlin, v. 86, n. 10, p. 809-812, 2000.

BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 82 (suppl), p. 205-213, 1987.

BRENER, Z. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev. Soc. Bras Med Trop*, v. 18 (supl), p. 1-8, 1985.

BRENER, Z. O parasito: relações hospedeiro-parasito. In: Brener, Z., Andrade, Z. A. (eds.). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 1-41.

BRENER, Z. Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *PAHO Scient Publ*, v. 347, p. 11-21, 1977.

BRENER, Z.; COSTA, C.A.G.; CHIARI, C. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agentes. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 18, p. 450-455, 1976.

BRENER, Z. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann. Trop Med Parasitol*, v. 59, p. 19-26, 1969.

BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 59, p. 19-26, 1965.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 5, p. 220-224, 1963.

BRIONES, M.R.S.; SOUTO, R.P.; STOLF, B.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol*, v. 104, p. 219-232, 1999.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J.C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Rev Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 111, p. 95-105, 2000.

BRUMPT, E. Le *Trypanosoma Cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex Boueti* et *Ornithodoros moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. *Bull. Soc. Pathol. Exotique*, v. 5 (5), p. 360-367, 1912.

CAMARGO, M.; SILVA, G.R.; CASTILHO, E.A.; SILVEIRA, A.C. Inquérito Sorológico da Prevalência de Infecção Chagásica no Brasil, 1975/1980. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 26, p. 192-204, 1984.

CAMPOS, R.M.F.; ANDRADE, S.G. Characterization of subpopulations (clones and subclones) of the 21SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 91, p. 795-800, 1996.

CHAGAS, C. Sobre um tripanossomo do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pelo *Triatoma geniculata* Latr. (1811). Possibilidade de ser o tatu um depositário do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior (nota prévia). *Brasil-Médico*, v. 30, p. 305-306, 1912.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v 1, p.159-218, 1909.

CHIARI, E. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* metacyclic tripomastigotes from culture kept in laboratory for different periods of time. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.16, p.61-67, 1974a.

CHIARI, E. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* culture form kept in laboratory for different periods of time. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.16, p. 81-87, 1974b.

CHIARI, E.; CAMARGO, E.P. Culturing and cloning of *Trypanosoma cruzi*. In: MOREL, C.M.(ed). *Genes and antigens of Parasites. A laboratory manual*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1984. p. 23-26.

CONTREARAS, V.T.; ARAQUE, W.; DELGADO, V.S., 1994. *Trypanosoma cruzi*: metacyclogenesis in vitro-changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 253-259.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102 (supl. 1), p. 113-122, 2007.

COURA, J.R. Tripanosomose, Doença de Chagas. *Ciência e Cultura*, v. 55 (1), p. 30-33, 2003.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A. S.; MILES, M.A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitology*, p. 171-176, 2002.

COURA, J.R.; FERNANDES, O.; ARBOLETA, M.; BARRET, T.V.; CARRARA, N.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D.A. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 90, p. 278-279, 1996.

COURA, J.R. Contribuição ao estudo da doença de Chagas no Estado da Guanabara. *Rev Bras Malariol D Trop*, v. 18, p. 9-98, 1966.

D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*, Tejera, 1920. In: Lumsden, W.H.R.; Evans, D.A. (eds). *The biology of the Kinetoplastida*. New York: Academic, v.1, 1976. P. 327-403.

DEANE, M.P.; LENZI, H.L. & JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 70, p. 513-515, 1984.

DEANE, M.J.P.; SOUSA, M.A.; PEREIRA, N.M.; GONÇALVES, A.M.; MOMEM, H.; MOREL, C.M. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods selected individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. *The Journal of Protozoology*, v. 31(2), p. 276-280, 1984.

DEANE, M.P. Significance of polymorphism in *Trypanosoma cruzi*. In: *Anais do Congresso Internacional sobre doença de Chagas*. Rio de Janeiro, 1979. p. A6-A7.

DEANE, M.P.; DAMASCENO, R.G. Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. II. Tripanosomas de macacos da Zona do Salgado, Estado do Pará. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.3, p. 61-70, 1961.

DE LUCAD'ORO, G.M.; GARDENAL, C.N.; PERRET, B.; CRISCI, J.V.; MONTAMAT, E.E. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations from Argentina estimated from enzyme polymorphism. *Parasitology*, v. 107, p. 405-410, 1993.

DIAS, J.C.P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cad Saúde Pública*, v. 23, supl. 1, p. 513-522, 2007.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. *Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. 486 p.

DIAS, E.; FREITAS, L. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotripanum*. I. Introdução, material e técnica, problema e métodos estatísticos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 38, p. 427-436.

ENGEL, J.C.; DVORAK, J.A.; SEGURA, E.L.; CRANE, M.S.T. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. *J Protozool*, v. 29, p.555-560, 1982.

FERNANDES, O.; SANTOS, S.S.; CUPOLILLO, E.; MENDONÇA, B.; DERRE, R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; SANTOS, L.C.; STURM, N.R.; NAIFF, R.D.; BARRET, T.V.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian

Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, p. 97-99, 2001.

FERNANDES, O.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; PINHO, A.P.; MOREL, C.M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; JANSEN, A.M. 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*, v. 118, p. 161-166, 1999a.

FERNANDES, O.; SOUTO, R.P.; CASTRO, J.A.; BORGES, J.; CARRARA, N.; JUNQUEIRA, A.C.; NAIFF, R.; BARRET, T.V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R. 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*, v. 58, p. 807-811, 1998.

F.N.S. Doenças Infecciosas e Parasitárias do Ministério da Saúde: Doença de Chagas – Aspectos clínicos e epidemiológicos. 1999. Disponível em: <http://www.hemonline.com.br/chagas.htm>.

FIOCRUZ. Disponível em <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe>. 2010.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*, p. 240-244, 1991.

GIBSON, W.C.; MILES, M.A. Application of new technology to epidemiology. *Brit Med Bull*, v. 41, p. 115-124, 1985.

GILLES, H. Parasitic disease affecting the heart in childhood. *Images Paediatric Cardiology*, v. 5, p. 28-39, 2000.

GUHL F.; JARAMILLO C.; CARRANZA J.C.; VALLEJO G.A. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and of *Trypanosoma rangeli*. *Archives of Medical Research*, v. 33, p. 362-370, 2002.

HORE, C. A. *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. X: The Stercoraria*. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1972.

JANSEN, A. A ecologia e a complexidade dos ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* na natureza. In: ARAÚJO-JORGE T., CASTRO S.L. (org). *Doença de Chagas. Manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. p. 25-31.

JUNQUEIRA, A.C.V.; CHIARI E.; WINCKER P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 90, p. 129-132, 1996.

JURBERG, J.; GALVÃO, C.; NOIREAU, F.; CARCAVALHO, R.U.; ROCHA, D.S.; LENT, H. *Uma iconografia dos Triatomíneos*. Rio de Janeiro: Editora Gama Filho, 2005. 48p.

KROPF, S.P.; SÁ, M.R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *História, Ciência e Saúde*, v. 16, supl. 1, p. 13-34, 2009.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozool*, v. 27, p. 37-58, 1980.

LIMA, V.S.; MANGIA, R.H.; JANSEN, A.M.. *Trypanosoma cruzi* clones: growth kinetics and doubling time after a long term "in vitro" maintenance. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 90, supl. 1, p. 93, 1995.

MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas' disease. *Parasitol Today*, v. 14, p. 119-123, 1998.

MACEDO, A.M.; MARTINS, S.M.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol*, v. 55, p. 147-154, 1992.

MAGALHÃES, J.B.; ANDRADE, S.G.; SHERLOCK I. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomines (biological and biochemical patterns). *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 38, p. 23-28, 1996.

MELLO, R.C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol*, v. 64, p. 314-332, 1978.

MILES, M.A. Isozyme characterization. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 18 (Supl), p. 53-59, 1985.

MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A.A.; PÓVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 74, p. 221-237, 1980.

MILES, M.A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J.J.; LAINSON, R.; TOYE, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature*, v. 272, p. 819-821, 1978.

MILES, M.A.; TOYE, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.J. 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*, v. 71, p. 217-225, 1977.

MOREL, C.; DEANE, M.P.; GONÇALVES, A.M. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol Today*, v. 2, p. 97-100, 1986.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 77, p. 6810-6814, 1980.

MUHLPFORDT, H. Über die bedeutung und feinstruktur des blepharoplasten bei parasitischen flagellaten. I. Teil. *Z Tropenmed Parasit*, v. 14, p. 357-398, 1963.

NUSSENZWEIG, V.; GOBLE, F.C. Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Exp Parasitol*, v. 18, p. 224-230, 1966.

NUSSENZWEIG, V.; DEANE, L.M.; KLOETZEL, J.M. Diversidade na constituição antigênica de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas do homem e de gambá. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 4, p. 409-410, 1962.

OLIVEIRA, R.P.; MELO, A.I.R.; MACEDO, A.M.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94 (Supl. 1), p. 65-70, 1999.

PETANA, W.B.; COURA, J.R. Experimental Studies on *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* strains isolated from man, animals and from triatomines bugs in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 8, p. 315-323, 1974.

READY, P.D.; MILES, M.A. Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 74, p. 207-211, 1980.

REY, L. 2008. Parasitologia. 4ª ed. In: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ.900 pp.

REY, L. 2006. Parasitologia. 3ª ed. In: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ.856 pp.

RIBEIRO DOS SANTOS, R.; SOARES M.B.P.; CARVALHO A.C.C. Transplante de medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 37 (6), p. 490-495, 2004.

RIOU, G.; PAUTRIZEL, R. Nuclear and kinetoplast DNA from trypanosomes. *Journal Protozool*, v. 16, p. 509-513, 1969.

ROMANHA, A.J. Aplicações da biologia molecular na doença de Chagas. Utilização do PCR no diagnóstico da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 25 (Suppl III), p. 27-29, 1992.

ROMANHA, A.J., BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme pattern as an epidemiological tool. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 83, p. 383-386, 1988.

ROMANHA, A.J. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado, Belo Horizonte: UFMG, 1982.

SABBADINI P.S.; FELISBINO K.F.O.; GONÇALVES T.C.M.; JUNQUEIRA A.C.V.; SOUSA M.A. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorhini*: morphobiological, biochemical and molecular analyses after co-infection in *Triatoma rubrofasciata*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 44 (Suppl 12), p. 93, 2002.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491, 1988.

SANTOS-FAISSAL, B.N. Análise de marcadores para o diagnóstico diferencial de amostras de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* mantidas em culturas axênicas. Dissertação de mestrado, Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense, UFF, 2009.

SANTOS-MALLET, J.R. Vetores da doença de Chagas e sua relação com o hospedeiro vertebrado e o parasito. In: ARAÚJO-JORGE, T., CASTRO, S.L. (ORG). *Doença de Chagas. Manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. p 25-31.

SARAVIA, N.G.; HOLGUÍN, A.F.; CIBULSKIS, R.E.; D’ALESSANDRO, A. Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the eastern plains, piedmont, and highlands of Colombia. *Am. J. Trop Med Hyg*, v. 36 (1), p. 59-69, 1987.

SHERLOCK, I.A.; CARCAVALLO, R.U.; GIRÓN, I.G. Listo f natural and experimental flagellate infections in several triatominae species. In: CARVALHO, R.U.; GIRÓN, J.; JURBERG, J.; LENT, H. (eds). Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. Vol. I, p. 289-298.

SHERLOCK, I.A. Vetores. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. (ORG). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 42-88.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MARCONDES, C.B.; GUEDES, L.A.; SIQUEIRA, G.S.; BARONE, A.A.; DIAS, J.C.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J.E.; PERES, B.A.; ARRUDA JÚNIOR, E.R. Possible oral transmission of acute Chagas’ disease in Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop São Paulo*, v. 33(5), p. 351-357, 1991.

SILVA, L.H.P. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 1(2), p. 99-118, 1959.

SILVA-JÚNIOR, R.; BRANQUINHA, M.H.; SOUSA, M.A. *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 e *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920: destino após co-cultivo e co-infecção em triatomíneos. *Rev Soc Bras Medicina Tropical*, v. 35 (supl I), p. 169, 2002.

SILVEIRA, A.C.; VINHÃES, M. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Medicina Tropical*, v. 31 (supl II), p. 15-60, 1998.

SOUSA, M.A.; FONSECA, T.S.; SANTOS, B.N.; SANTOS-PEREIRA, S.M.; CARVALHAL, C.; HASSLOCHER-MORENO, A.M. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in chronic Chagas’ disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-Fiocruz, Brasil). *Parasitology Research*, v. 103, p. 697-703, 2008.

SOUSA, M.A. Apostila do curso “Biologia e Taxonomia de Tripanossomatídeos”. Rio de Janeiro: Direitos autorais reservados, 2007. 100pp.

SOUSA, M.A.; SANTOS, B.N.; SANTOS-PEREIRA, S.N.; SABBADINI, P.S.; XAVIER-MONTEIRO, C.S. Caracteres morfológicos de diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* mantidas em culturas axênicas: valor para diagnóstico diferencial destas espécies. *Rev Soc Brs Medicina Tropical*, v. 38 (Supl. 1), p. 404, 2005.

SOUSA, M.A. Apostila do curso “Biologia e Taxonomia de Tripanossomatídeos”. Rio de Janeiro: Direitos autorais reservados, 2002. 62pp.

SOUSA, M.A. *Tripanossomatídeos de insetos e plantas: análise do crescimento, diferenciação e divisão celular, biometria e fenômenos sugestivos de sexualidade*. Valor

- taxonômico*. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, 2000.
- SOUSA, M.A. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94 (Suppl. I), p. 205-210, 1999.
- SOUSA, M.A.; SANTOS, S.M.; SCHAEFER, G.V. Aspects of the biological behavior of *Trypanosoma cruzi* Y strain in inbred mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 90 (Suppl. I), p. 93, 1995.
- SOUSA, M.A.; ALENCAR, A.A. On the tissual parasitism of *Trypanosoma cruzi* Y strain in swiss mice. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 26 (6), p. 316-321, 1984.
- SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Bioch Parasitol* v. 62, p. 45-52, 1996.
- SOUTO, R.P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Bioch Parasitol*, v.62, p. 45-52, 1993.
- STEINDEL, M.; PACHECO, L.K.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; MORAES, M.H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T.C.M.; STOCO, P.H.; MURTA, S.M.F.; CARVALHO-PINTO, C.J.; GRISARD, E.C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolate from humans, vectors and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 60, p. 25-32, 2008.
- STURM, N.R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* v. 33, p. 205-214, 1989.
- TAFURI, W.L. Patogênese. *Rev Soc Bras Medicina Tropical*, v. 25 (supl III), p. 19-22, 1992.
- TIBAYRENC, M.. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol*, v. 36, p. 48-115, 1995.
- TIBAYRENC, M.; AYALA, F. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today*, v. 7, p. 228-232, 1991.
- TIBAYRENC, M.; AYALA, F. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution*, v. 42, p. 277-292, 1988.
- TIBAYRENC, M.; BRENIERE, S.F. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 83 (Suppl I), p. 249-255, 1988.
- TIBAYRENC, M; ÉCHALAR, L; BRÉNIÈRE, F.; LEMESRE, J-L.; BARNABÉ, C.; DESJEUX, P. Sur le statu taxonomique et médicale des souches isoenzymatiques de

Trypanosoma cruzi. Considérations sur la valeur systématique et immunogénique des différentes isoenzymes. *C R Acad Sc Paris*, v. 296 (Série B), p. 721-726, 1983.

TOYE, P.J. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 68, p.147, 1974.

VAGO, A.R.; ANDRADE, L.O.; LEITE, A.A.; REIS, D.A.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; TOSTES, S.; MOREIRA, M.C.V.; FILHO, G.B.; PENA, S.D.J. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. *Am J Pathol*, v.156, p. 1805-1809, 2000.

VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; FRAIHA NETO, H. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazil Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, p. 395-398, 1999.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas”. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 3, p. 276-294, 1911.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid eflagellates. *Int J Parasitol*, v. 24 (8), p. 1317-1331, 1994.

VICKERMAN K. Phylum Zoomastigina. Class Kinetoplastida. In: MARGULIS L.; CORLISS J.O.; MELKONIAN M.; CHAPMAN D. (org). *Handbook of Protoctista*. Boston: Jonas & Bartlett, 1990. p. 215-238.

VICKERMAN, K. The developmental cycles and biology of pathogenic tripanosomes. *British Med. Bulletin*, v. 41, p. 105-114, 1985.

VICKERMAN, K. The diversity of the Kinetoplastid flagellates. In: LUMSDEN, W. R.L., EVANS, D. E. (org.). *Biology of the Kinetoplastida*. New York: Academic Press, 1976. p. 1-34.

WIKIPEDIA. Disponível em > <http://pt.wikipedia.org><..2009.

WINKER, P.; BRITTO C.; BORGES-PEREIRA, J.; CARDOSO M.A.; OELEMANN W.; MOREL C.M. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood stocks from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Med Hyg*, v. 51, p. 771-777, 1994.

WHO. Control of Chagas Disease. Report of a WHO Expert Committee, WHO Technical Report Series nº 811, Geneva, 95pp, 1991.

ZELÉDON, R. In: CARCAVALO, R. V., GIRÓN, I.G., JUBERG, J., LENT, H. (org.). *Atlas de vetores da doença de Chagas nas Américas*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. p. 271-287.

ZINGALES, B.; SOUTO R.P.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brasil base don dimorphisms of RNA and mini-exon gene sequences. *Inter J. Parasitol*, v. 28, p. 105-112, 1998.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI a TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104 (7), p. 1051-1054, 2009.

9. ANEXO

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](#)