

LARISSA AGUIAR DE ALMEIDA

**ESTUDO BIOLÓGICO, MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE DUAS CEPAS DE  
*TRYPANOSOMA CRUZI* (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE) ISOLADAS  
DE EXEMPLARES DE *TRITOMA SORDIDA* E *TRITOMA RUBROVARIA*  
(HEMIPTERA, REDUVIDAE)**

Araraquara  
2015

LARISSA AGUIAR DE ALMEIDA

**ESTUDO BIOLÓGICO, MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE DUAS CEPAS DE  
*TRYPANOSOMA CRUZI* (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE) ISOLADAS  
DE EXEMPLARES DE *TRITOMA SORDIDA* E *TRITOMA RUBROVARIA*  
(HEMIPTERA, REDUVIIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,  
da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de  
Farmacêutica-Bioquímica.

**Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa**

**Co-orientadora: Dra. Aline Rimoldi Ribeiro**

Araraquara  
2015

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio Carlos de Almeida e Vera Lucia Aguiar de Almeida que me apoiaram moralmente e financeiramente por todo período de graduação. Sem eles a vontade de estudar em uma ótima universidade e a inscrição no curso de Farmácia-Bioquímica nunca seria possível. Aos meus irmãos e sobrinhos que apesar de minha ausência, me apoiaram para realização deste trabalho e a finalização do curso de graduação.

Ao professor e orientador Prof. Dr. João Aristeu da Rosa pelo papel desempenhado com dedicação e paciência durante todo o período de estágio de iniciação científica. Sua ética e motivação no trabalho que exerce é responsável pela minha admiração à área acadêmica e seu humanismo é responsável pela minha admiração pessoal, sendo de extrema importância para o meu desempenho na área científica.

À minha co-orientadora e amiga Dra. Aline Rimoldi Ribeiro por toda ajuda, disponibilidade e conhecimento prévio na área. Sua empolgação e determinação é responsável pela minha paixão por *Trypanosoma cruzi*, e sua amizade é responsável pela minha força nas horas difíceis e alegria em experimentos do dia-a-dia e viagens a trabalho.

À minha grande amiga e parceira de laboratório Juliana Damieli Nascimento pela ajuda na produção de relatórios de pesquisa e resumos para congresso, e por todo companheirismo que me ajudou a vencer obstáculos até mesmo em período de intercâmbio. A todos meus amigos que conheci por intermédio do laboratório que com risadas e almoços na copa me fizeram ter gosto por ir trabalhar todos os dias, em especial Amanda Rimoldi, Maria Fernanda Falcone Dias, Renata Tomé, Maria Clara, José Eduardo Ribeiro, Zilda Ribeiro e Jiló Ribeiro.

Aos meus amigos de república que influenciaram no meu desenvolvimento pessoal e, através de conversas e festas, me fizeram esquecer os desafios do dia-a-dia, em especial, Alfredo

Danilo F. Souza, Caroline Costa Lima, Evelin Costa Lima e Vicente Estevam Machado. Aos meus amigos de classe que me ajudaram na conclusão acadêmica e influenciaram indiretamente na concepção deste trabalho, em especial, Ana Paula Carrilho Trindade de Ávila, Cíntia Yuka Satake, Helen Martin, Paulo Vinícius de Oliveira e Taciana Siqueira Pollo.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> (Modificado de CDC, 2009).....	13
<b>Figura 2.</b> Município de Santo Inácio - BA (a). Município de Quaraí - RS (b).....	21
<b>Figura 3.</b> Método para determinar as DTUs de <i>T. cruzi</i> . (Modificado de Lewis, 2009).....	32
<b>Figura 4.</b> Placa de 24 poços utilizada para infecção de macrófagos da linhagem J774. ....	32
<b>Figura 5.</b> Diversidade morfológica em formas epimastigotas das cepas SI7 e QMM12. ....	34
<b>Figura 6.</b> Ocorrência de formas tripomastigotas das cepas SI7 e QMM12 em meio de cultura LIT. .....	35
<b>Figura 7.</b> Programa utilizado para mensuração de imagens. Ferramenta poly line (a) e irregular (b). ....	35
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografias das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa SI7 mensuradas em aumento de 1000X.....	36
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografias das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa QMM12 mensuradas em aumento de 1000X.....	40
<b>Figura 10.</b> Resultado da morfometria efetuada com 30 formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> para as cepas SI7 e QMM12 referente ao comprimento total, largura do corpo, área do cinetoplasto, área do núcleo e índice nuclear. ....	45
<b>Figura 11.</b> Curva de crescimento em meio LIT das cepas QMM12 e SI7 de <i>T. cruzi</i> realizada em triplicata durante dez dias consecutivos. ....	47
<b>Figura 12.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) para visualização da banda com aproximadamente 900 pb referente a cepa SI7. ....	48
<b>Figura 13.</b> Alinhamento das sequências de nucleotídeos no programa BioEdit. Região não variável (a) e região variável (b). ....	49

<b>Figura 14.</b> Árvore filogenética do tipo Neighbor-Joining usada para expressar o alinhamento das sequências do gene SSU rRNA de oito cepas de <i>T. cruzi</i> e uma cepa que encontra-se em grupo externo, <i>Trypanosoma rangeli</i> . Os números correspondem a 10000 réplicas no índice de <i>bootstrap</i> . .....	49
<b>Figura 15.</b> Análise da genotipagem da fração do gene 24S $\alpha$ rRNA da cepa SI7 de <i>T. cruzi</i> . A cepa SI7 é representada pela coluna 3. ....	51
<b>Figura 16.</b> Análise da digestão da fração do gene HSP60 (a) e GPI (b) da cepa SI7 de <i>T. cruzi</i> . A cepa SI7 é representada pela coluna 3. ....	51
<b>Figura 17.</b> Análise da genotipagem da fração do gene 24S $\alpha$ rRNA da cepa QMM12 de <i>T. cruzi</i> .	52
<b>Figura 18.</b> Análise da digestão da fração do gene HSP60 (a) e GPI (b) da cepa QMM12 de <i>T. cruzi</i> . .....	52
<b>Figura 19.</b> Fotomicrografias de formas amastigotas das cepas QMM12 (a, b) e SI7 de <i>T. cruzi</i> (c, d) interiorizadas em macrófagos da linhagem J774. As setas indicam as formas amastigotas. ....	54
<b>Figura 20.</b> Modelo “Two-Hybridization” que evidencia as trocas genéticas durante a evolução de <i>T. cruzi</i> . Os retângulos indicam os diferentes “DTUs”. As fusões entre duas células e a troca de material genético é indicado pelas caixas ovais. As linhagens mitocondriais são evidenciadas pelas diferentes cores (Zingales, B. et al., 2012). ....	58
<b>Figura 21.</b> Distribuição aproximada dos DTUs de <i>T. cruzi</i> no ciclo doméstico e silvestre. (Zingales, B. et al., 2012). ....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Componentes utilizados para o preparo do meio de cultura LIT.....	22
<b>Tabela 2.</b> Componentes utilizados para o preparo do meio de cultura RPMI. ....	22
<b>Tabela 3.</b> Componentes utilizados para preparação de PBS.....	23
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros morfométricos para a caracterização de formas epimastigotas. ....	25
<b>Tabela 5.</b> Resultados obtidos da mensuração de formas epimastigotas da cepa SI <sub>7</sub> de <i>T.cruzi</i> . ...	36
<b>Tabela 6.</b> Média dos resultados das mensurações de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa SI <sub>7</sub> . .....	39
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos a partir da mensuração de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa SI <sub>7</sub> .....	40
<b>Tabela 8.</b> Resultados das mensurações de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa QMM <sub>12</sub> . ...	41
<b>Tabela 9.</b> Resultados das mensurações de formas epimastigotas da cepa QMM <sub>12</sub> de <i>T. cruzi</i> . ...	44
<b>Tabela 10.</b> Resultados obtidos a partir da mensuração de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa QMM <sub>12</sub> . ....	44
<b>Tabela 11.</b> Resultado da curva de crescimento da cepa SI <sub>7</sub> cultivada em meio LIT.....	46
<b>Tabela 12.</b> Resultado da curva de crescimento da cepa QMM <sub>12</sub> de <i>T. cruzi</i> cultivada em meio LIT. .....	46
<b>Tabela 13.</b> Isolados de tripanossomatídeos e seus respectivos números de acesso do GenBank.	50
<b>Tabela 14.</b> Número de amastigotas contados em 24 horas e 72 horas, taxa de multiplicação de amastigotas/macrófagos e o tempo de duplicação em dias. ....	54

## SUMÁRIO

1.1. Considerações Gerais .....	11
1.2. Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	12
1.3. Patologia da doença de Chagas .....	13
1.4. Controle da doença no Brasil .....	14
1.5. Vetores da doença de Chagas .....	14
1.6. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	16
1. Objetivos .....	20
2. Material e Métodos.....	21
3.1.Meio de Cultura - LIT .....	22
3.2.Meio de cultura - RPMI.....	22
3.3.PBS .....	23
3.4.Manutenção das cepas em meio LIT .....	23
3.5.Fixação, Coloração e Mensuração de Formas Epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
3.6.Estudo das formas epimastigotas por meio da cinética de crescimento em meio de cultura LIT .....	25
3.7.Estudo molecular das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> por meio do posicionamento da região V7V8 do gene SSU rRNA.....	26
3.8.Genotipagem das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> pelos genes 24Sα rRNA, HSP60 e GPI .....	28
3.9.Infecção de macrófagos da linhagem J774.....	32

3. Resultados .....	34
4.1.Mensuração de Formas Epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
4.2.Estudo das formas Epimastigotas por meio da cinética de crescimento em meio LIT .....	45
4.3.Estudo molecular das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> por meio do posicionamento da região V7V8 do gene SSU rRNA.....	47
4.4.Genotipagem das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> pelos genes 24S $\alpha$ rRNA, HSP60 e GPI .....	50
4.5.Infecção de macrófagos da linhagem J774.....	53
4. Discussão.....	56
5.1.Estudo Morfológico de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	56
5.2.Estudo biológico da curva de crescimento em meio LIT de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	57
5.3.Estudo molecular das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> por meio do posicionamento da região V7V8 do gene SSU rRNA.....	57
5.4.Genotipagem das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> pelos genes 24S $\alpha$ rRNA, HSP60 e GPI .....	61
5.5.Infecção de macrófagos da linhagem J774.....	63
5. Conclusões .....	64
6. Referências Bibliográficas .....	65

## Resumo

A doença de Chagas, conhecida também como tripanossomíase americana, foi descrita por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909 em Lassance, Minas Gerais. Ela é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitido ao homem por insetos hemípteros conhecidos como “barbeiros” dos quais os gêneros mais importantes são *Panstrongylus*, *Rhodinus* e *Triatoma*. Essa zoonose atinge aproximadamente 10 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina. Sabe-se que esse parasito apresenta grande variabilidade intraespecífica evidenciada por diferenças na patologia, virulência, constituição antigênica e habilidade de evasão à resposta imunológica e essa diversidade pode estar associada à sua adaptação e sobrevivência em diferentes hospedeiros. A diversidade patogênica, imunológica e morfológica inerente a esse flagelado dependem de fatores ainda indeterminados, como variação regional e individual da doença humana em infecções naturais e experimentais. Com o intuito de contribuir para ampliar o conhecimento sobre as populações de *T. cruzi*, propõe-se o estudo biológico, morfológico e molecular de duas cepas isoladas dos exemplares, *Triatoma sordida* (SI<sub>7</sub>) e *Triatoma rubrovaria* (QMM<sub>12</sub>) por Rosa et al. 2004; 2008 coletados nos Estados da Bahia e Rio Grande do Sul, respectivamente.

# 1. Introdução

## 1.1. Considerações Gerais

Em 1909, o cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas na cidade de Lassance, MG, desvendou individualmente e sem recursos tecnológicos hoje existentes uma endemia rural que atingia vários países latino-americanos. Assim, descreveu uma nova espécie de protozoário: *Trypanosoma cruzi*, que recebeu essa denominação em homenagem ao seu orientador Oswaldo Cruz e determinou que esse protozoário infectava pessoas por meio das fezes dos insetos triatomíneos, usualmente chamados de “barbeiro”.

Não se pode esquecer que Rodolfo Talice, no Uruguai, e Salvador Mazza, da Missão de Estudos de Patologia Regional da Argentina, também desmistificaram muitos aspectos da doença respaldando a idéia de que a enfermidade exigia cuidados e enfrentamentos, visto que o vetor multiplica-se em casas rudimentares, portanto, a doença de Chagas revela as péssimas condições de moradia em que grande parte da população latino-americana vive (Neto, 2009). Essa zoonose atinge, aproximadamente, 10 milhões de pessoas principalmente na América Latina da qual cerca de 2,5 milhões estão presentes no Brasil. Além disso, representa um risco para 25 milhões de pessoas em todo o mundo. (Neto, 2009; WHO, 2011).

Hoje a doença de Chagas é considerada negligenciada, visto que a enfermidade não gera lucro para as empresas farmacêuticas e laboratórios de pesquisa. Outra grande dificuldade é que o protozoário é intracelular e, dessa forma, utiliza-se das próprias células do hospedeiro para se multiplicar, portanto para matar o parasito é necessário um fármaco que atravesse a membrana plasmática. Assim o avanço nas pesquisas é dificultado (Clayton, 2010).

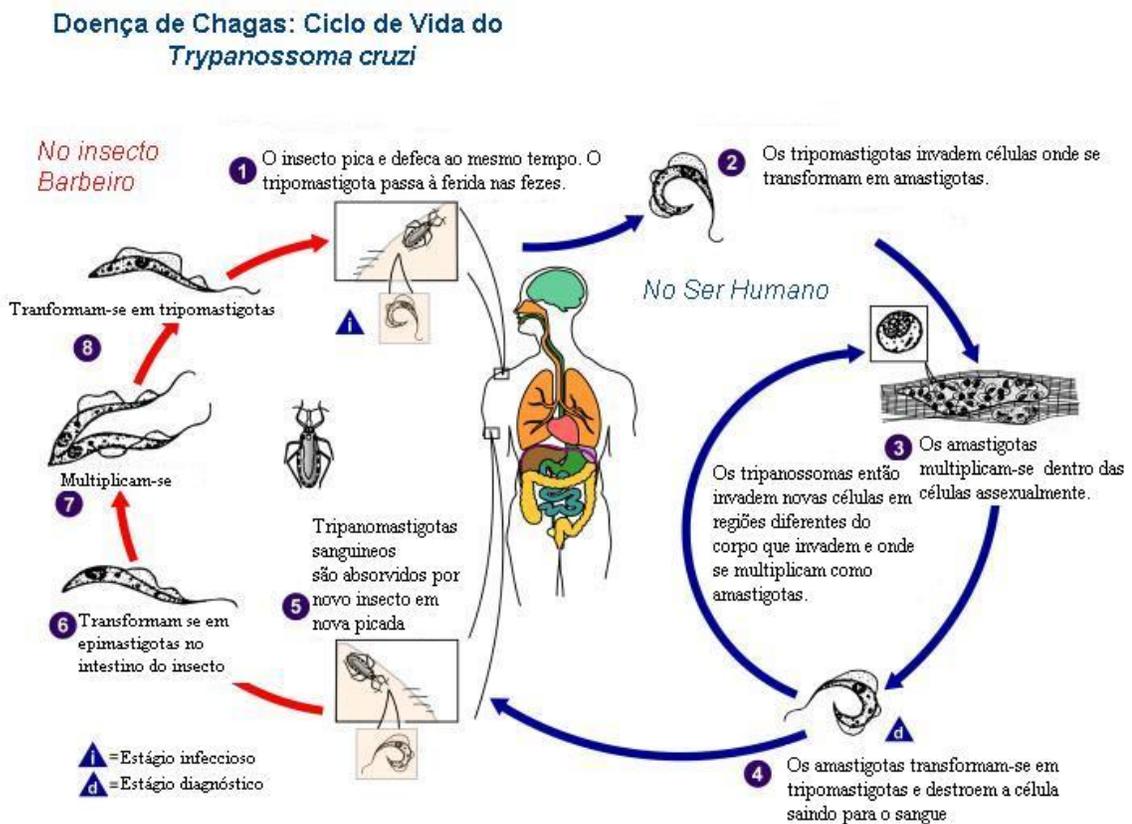
Entretanto, há dois medicamentos utilizados para tratar a doença, o benzonidazol e o nifurtimox os quais só são efetivos no início da enfermidade, ou seja, na fase aguda. Ambos têm 80% de cura se tomados na dose ideal, no tempo correto e no início da doença. Porém, esses medicamentos possuem efeitos adversos severos, além disso, algumas cepas do parasito podem se tornar resistentes a eles tornando-os mais patogênicos e difíceis de combater (Clayton, 2010).

## **1.2. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi***

O ciclo biológico de *T. cruzi* inclui dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado. No hospedeiro invertebrado há a predominância de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas (Tyler e Engman, 2001), sendo que as formas epimastigotas são caracterizadas por terem um formato alongado, flagelo livre na porção anterior e cinetoplasto justaposto ao núcleo e as tripomastigotas metacíclicas possuem um formato alongado, com cinetoplasto posterior ao núcleo e flagelo que estende-se por toda a célula sendo livre na porção anterior. Já no hospedeiro vertebrado há a predominância de formas tripomastigotas e amastigotas, sendo que as primeiras são bem parecidas com as tripomastigotas metacíclicas encontradas no vetor e as segundas caracterizadas com formato arredondado com flagelo curto que não se exterioriza.

O hospedeiro invertebrado (triatomíneo) se infecta com o *T. cruzi* pela ingestão de sangue de animais hospedeiros infectados durante o repasto sanguíneo. As formas tripomastigotas se tornam arredondadas no estômago originando as formas esferomastigotas, essas se transformam em epimastigotas também no estômago. As epimastigotas aderem à superfície do intestino médio e posterior, onde se multiplicam intensamente. Logo migram para o reto, na porção posterior, transformando-se em tripomastigotas metacíclicas sendo eliminadas pelas fezes e pela urina dos triatomíneos (Tyler e Engman, 2001).

No momento em que o vetor deposita as fezes no vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas atingem o animal por uma entrada na pele ou pela mucosa. Os parasitas invadem a corrente sanguínea e atingem os tecidos, onde se diferenciam em amastigotas e se dividem no interior das células. Posteriormente, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que são liberadas com a ruptura da célula, atingindo a corrente sanguínea. Assim podem infectar novas células ou serem ingeridas pelo vetor iniciando um novo ciclo (Andrade, 2000).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (Modificado de CDC, 2009).

### 1.3. Patologia da doença de Chagas

Essa doença se apresenta em duas fases, aguda e crônica. A fase aguda é a fase inicial na qual os parasitos circulam no sangue, normalmente é assintomática e dura por volta de dois meses.

Na fase crônica os parasitos se encontram nos tecidos, normalmente o muscular cardíaco, muscular esquelético e digestivo que com o decorrer do tempo podem causar lesões, inflamações e destruição do tecido. A severidade e os sintomas da doença são resultantes da heterogeneidade de *T. cruzi*, que pode ser percebida em cepas isoladas, assim como pela resposta imune do hospedeiro (Souto et al., 1996).

#### **1.4. Controle da doença no Brasil**

A doença de Chagas é uma enzootia, ou seja, há sempre a possibilidade de domiciliação de vetores e infecção humana acidental. Sabe-se também que a doença possui grande número de reservatórios, sendo eles animais domésticos e silvestres, assim como há pouca expressão clínica da infecção aguda, nenhuma vacina existente e os medicamentos disponíveis podem causar severos efeitos adversos. Portanto, a doença dificilmente poderá ser erradicada. Mas há um método de controlar a enfermidade por meio do controle do vetor. O controle pode ser realizado por meio da aplicação de inseticidas nas habitações infestadas e melhoria nas condições de habitação da população carente existente na América Latina (Silveira, 2000).

Entretanto, a doença não é transmitida apenas vetorialmente, mas também por transfusão sanguínea, transmissão vertical durante a gestação, transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (WHO, 2011). Assim, é necessário manter a vigilância epidemiológica para o correto controle da doença. Em especial para o Brasil esse é o maior desafio visto que há uma progressiva descentralização da Fundação Nacional da Saúde (Vinhaes e Dias, 2000).

#### **1.5. Vetores da doença de Chagas**

A principal característica biológica dos Triatominae é que todas as espécies sem distinção de fase ninfal e sexo são obrigatoriamente hematófagas, necessitando de sangue de vertebrados

para completar o seu desenvolvimento. Portanto, os triatomíneos em qualquer fase do seu desenvolvimento podem ser infectados e transmitir o *T. cruzi* (Garcia e Azambuja, 2000).

O ambiente onde se dá a transmissão da doença é aquele onde a população vive, casas mal construídas, o que revela a baixa condição econômica dessas pessoas. São nessas casas que os vetores se adaptam e transmitem *T. cruzi* pela deposição de fezes no momento do repasto sanguíneo (Silveira, 2000). Entretanto, a capacidade vetorial não depende apenas da adaptação ao domicílio. Depende também da infectividade do vetor, do tempo entre o repasto e dejeção e da antropofilia para as diferentes espécies (Silva et al., 1993).

Percebe-se então que o controle do vetor é extremamente necessário para a profilaxia da doença. Assim, em 1983 o Ministério da Saúde juntamente com o FINSOCIAL – Fundo de Investimento Social – investiram recursos para o programa de controle do vetor, a fim de romper a cadeia de transmissão da doença (Vinhaes e Dias, 2000).

Após o início do programa de controle do vetor foram feitos inquéritos sorológicos em crianças de 7 a 14 anos em alguns estados brasileiros, entre eles dois em destaque para esse trabalho, Rio Grande do Sul em que foram coletados exemplares de *Triatoma rubrovaria* para o isolamento da cepa QMM12, e Bahia onde foram capturados exemplares de *Triatoma sordida* para o isolamento da cepa SI7. O inquérito nacional sobre a prevalência de doença de Chagas conduzido em 1980 revelou que de 20857 pessoas examinadas sorologicamente, 0,70% apresentavam anticorpos para *T. cruzi*. Na Bahia, de 26657 exames sorológicos, 0,03% eram chagásicos.

Em 1997, a FNS – Fundação Nacional de Saúde - capturou triatomíneos em todos estados brasileiros, exceto São Paulo, e determinou o índice de positividade de tais a fim de verificar se as medidas de controle adotadas até o momento apresentavam impacto no controle da doença. *Triatoma sordida* foi a espécie mais capturada no ano com 41,16% do total de triatomíneos capturados no país, e de 81970 exemplares havia um índice de positividade para o *T. cruzi* de

0,85%. *Triatoma rubrovaria* foi a sexta espécie mais capturada com 1815 exemplares dos quais 1,02% estavam infectados com o parasito.

### **1.6. *Trypanosoma cruzi***

O protozoário quando visto em gota sanguínea apresenta movimentos que deslocam as hemácias por meio da movimentação do flagelo. Segundo Pinto (1942), as formas finas se movem irregularmente por todos os campos do microscópio, enquanto as formas largas permanecem algum tempo no mesmo campo.

Em 1909, Chagas já havia percebido a presença de formas largas e finas circulando no sangue. Brener e Chiari (1963) confirmaram a hipótese demonstrando que as diferentes formas eram advindas de cepas diferentes.

As formas finas são predominantes em cepas com maior tropismo para macrófagos, são mais virulentas (Brener 1965, Andrade 1974) e mais susceptíveis ao sistema imune do hospedeiro (Brener e Chiari 1963, Brener 1969). Enquanto que as formas largas possuem uma menor virulência e maior tropismo para as células musculares.

Com o objetivo de aprofundar o estudo morfológico das formas sanguíneas, o método biométrico Pearson (1914) e Hoare e Broom (1938) foram aplicados por Dias e Freitas Filho (1943), estabelecendo os seguintes parâmetros:

DNP: Distância posterior ao núcleo

DNA: Distância anterior ao núcleo

FL: Comprimento do flagelo livre

CT: Comprimento total

IN: Índice nuclear (DNP/DNA)

Entretanto, é importante lembrar que esses são elementos para caracterização e, portanto, não são suficientes sozinhos para a classificação de cepas de *T. cruzi*. Para a correta classificação, utilizam-se três fatores: o comportamento biológico das cepas em animais de laboratório e as características bioquímicas e moleculares das cepas (Bice & Zeledón 1970, Miles et al. 1977, Carneiro et al. 1991).

Para definir o comportamento biológico das cepas em animais de laboratório foram definidos parâmetros de interação parasito-hospedeiro, parasitemia, morfologia, tropismo nos tecidos e lesões histopatológicas. Assim três grupos foram propostos, os biodemas (Andrade, 1974).

Biodema I refere-se a um rápido crescimento *in vitro*, alta parasitemia entre o 7º e 12º dia pós infecção, alta mortalidade, presença de formas finas e tropismo para os macrófagos. Biodema II refere-se a um crescimento mais lento, com parasitemia irregular que varia entre o 12º e 20º dia após infecção e danos no tecido muscular. E o Biodema III refere-se a uma parasitemia que varia entre o 20º e 30º dia após infecção, baixo índice de mortalidade, presença de formas largas e danos no músculo esquelético (Andrade et al 1983, Andrade & Magalhães, 1997).

Para definir as características bioquímicas das cepas Miles et al.(1977, 1978, 1980) realizaram estudos para a análise de perfis eletroforéticos de seis enzimas: ALAT, ASAT, GPI (glucofosfato isomerase), G6PDH (glicose 6 fosfato desidrogenase), ME (enzima málico) e PGM (fosfoglicomutase). Assim, eles sugeriram a classificação em três grupos, denominados zimodemas (Z1, Z2 e Z3).

Zimodema 1 e Z3 estão associados às cepas que circulam no meio de transmissão silvestre, enquanto que Z2 circula no ciclo doméstico (Miles et al. 1978, 1980). Esses zimodemas podem

estar relacionados às formas clínicas da doença devido às diferentes associações hospedeiro-vetor e sua distribuição geográfica (Luquetti et al. 1986, De Souza et al., 2000).

Durante o Simpósio Internacional Comemorativo da Descoberta da doença de Chagas em 1999 foi adotada a subdivisão da espécie de *T. cruzi* em duas linhagens principais, *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII) com o propósito de padronizar a nomenclatura das duas linhagens principais do parasito (Anonymous, 1999).

*Trypanosoma cruzi* I é usualmente encontrado em mamíferos e triatomíneos silvestres, ou seja, no ciclo de transmissão silvestre e *T. cruzi* II é encontrado em humanos, ou seja, no ciclo de transmissão doméstico (Fernandes et al. 1998, Zingales et al. 1998).

Em 2000, Brisse et al. propuseram a subdivisão do grupo TcII em cinco subgrupos, TcIIa - TcIIe, baseado em análises de outros marcadores.

Ocorreu uma revisão da nomenclatura, em que cada subgrupo passou a ser classificado como um grupo independente, denominados *DTUs* (Discrete Typing Units). Assim, TcI, TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId e TcIIe passaram a ser designados como TcI, TcIV, TcII, TcIII, TcV e TcVI, respectivamente (Zingales et al., 2009).

E para definir as características moleculares das cepas utilizam-se técnicas de biologia molecular sendo necessário o cultivo de parasitas em meio de cultura. Sabe-se que quando cepas multiclonais são mantidas em meio de cultura ou em animais laboratoriais ocorre uma seleção das sub-populações do parasito (Morel et al. 1980, 1986; Deane et al. 1984a, b; Gonçalves et al. 1984; Carneiro et al. 1990; Gomes et al. 1991; Alves et al. 1994). Portanto, é possível prever que o homem atua como filtro biológico ao selecionar as subpopulações mais adaptadas a se desenvolverem em seu organismo (Oliveira et al., 1998, 1999; Macedo et al., 2001).

A fim de analisar o polimorfismo genético das populações de *T. cruzi* são utilizados marcadores, genes e seqüências, sendo os mais utilizados o gene ribossômico e genes

mitocondriais. Os genes do RNA ribossômico sofrem várias etapas de processamento dando origem a três moléculas de RNA maduras, 5.8S, 18S (subunidade maior ou SSU) e 24S (subunidade menor ou LSU) (Sogin et al., 1986; Hernández et al., 1990).

Esses genes são alvos de identificação de gêneros, espécies, linhagens e genótipos, pois apresentam diversas regiões com diferentes graus de conservação (Souto et al., 1996; Zingales et al., 1998; Brisse et al., 2001; Stevens et al., 2001; Maia da Silva et al., 2004b; Hamilton et al., 2004, 2007; Rodrigues et al., 2006; Cortez et al., 2006; Ferreira et al., 2007, 2008; Viola et al., 2008, 2009a,b).

O pequeno tamanho do gene 18 S permite sua fácil obtenção por amplificação de PCR e a presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas o que permite alinhamentos confiáveis com regiões conservadas (U1 – U8) e nove regiões variáveis (V1 – V9) são características importantes para a utilização da sequência de gene SSU rRNA (Hernández et al., 1990). Desse modo, a partir do alinhamento da sequência de gene SSU rRNA é possível distribuir os isolados de *T. cruzi* entre os seis grupos infragenéricos (*DTUs*).

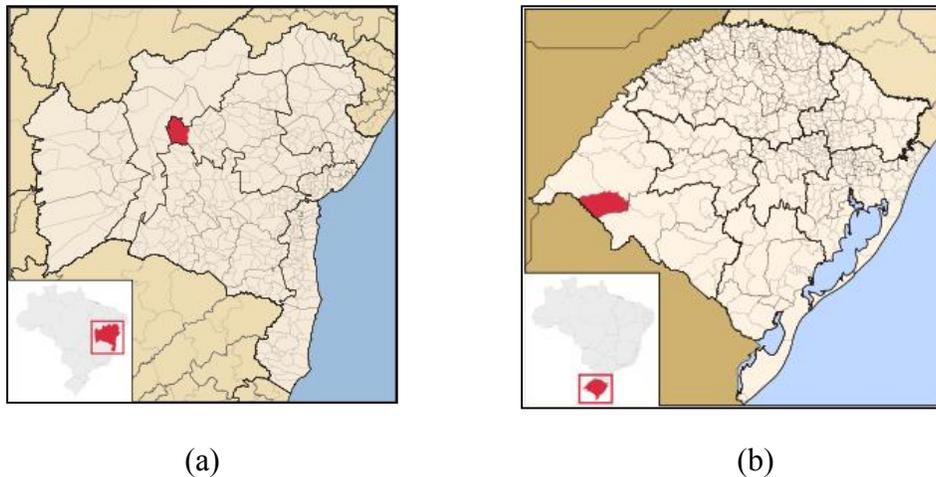
Sabe-se também que cada linhagem de *T. cruzi* pode determinar variabilidade quanto à patogenicidade, maior ou menor virulência, bem como distintas constituições antigênicas e interação com o sistema imunológico do hospedeiro. De acordo com Rimoldi et al., 2011 cepas isoladas de *Triatoma sordida* e de um gato doméstico em Santo Inácio – Bahia apresentaram comportamento distintos embora pertencentes a mesma linhagem de *T. cruzi* (grupo II). Portanto, este projeto tem como intuito caracterizar duas cepas de *T. cruzi* isoladas de *T. sordida* e *T. rubrovaria* oriundas das regiões Nordeste e Sul do Brasil de forma a ampliar o conhecimento desse patógeno, bem como contribuir para um controle mais efetivo da infecção nas regiões onde foram isoladas as duas cepas de *T. cruzi* estudadas.

## 1. Objetivos

- ✓ Avaliar a morfologia das formas epimastigotas das cepas QMM<sub>12</sub> e SI<sub>7</sub> de *T. cruzi* mantidas em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*).
- ✓ Estudar biologicamente as formas epimastigotas das cepas QMM<sub>12</sub> e SI<sub>7</sub> de *T. cruzi* a partir da cinética de crescimento em meio LIT.
- ✓ Caracterizar molecularmente as cepas QMM<sub>12</sub> e SI<sub>7</sub> de *T. cruzi* por meio do posicionamento da região V7V8 do gene SSU rRNA.
- ✓ Definir as DTUs das cepas QMM<sub>12</sub> e SI<sub>7</sub> por meio da sequência de genes 24S $\alpha$ , HSP60 e GPI e comparar com aquelas obtidas pelo posicionamento da região V7V8 do gene SSU rRNA.
- ✓ Comparar a taxa de infecção das cepas QMM<sub>12</sub> e SI<sub>7</sub> em macrófagos da linhagem J774.

## 2. Material e Métodos

A cepa SI<sub>7</sub> foi isolada a partir de exemplares de *Triatoma sordida* coletados no peridomicílio do Distrito de Santo Inácio no Estado da Bahia por Rosa et al. em 2004 (Figura 2a). A cepa QMM<sub>12</sub> foi isolada a partir de exemplares de *Triatoma rubrovaria* coletados no bairro de Macarrão, município de Quaraí, Rio Grande do Sul por Rosa et al. em 2008 (comunicação pessoal) (Figura 2b).



**Figura 2.** Município de Santo Inácio - BA (a). Município de Quaraí - RS (b).

O isolamento das cepas QMM<sub>12</sub> e SI<sub>7</sub> foi realizado por meio de compressão abdominal de triatomíneos e as fezes obtidas foram diluídas em salina 0,9% e visualizadas em microscópio óptico comum. As amostras positivas (0,3mL) foram inoculadas em camundongos Swiss de 21 dias de idade e em meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose).

As cepas foram mantidas por repiques sucessivos em meio de cultura LIT.

### 3.1.Meio de Cultura - LIT

O meio de cultura utilizado para o crescimento de *T. cruzi* foi o meio LIT (Liver Infusion Tryptose) desenvolvido por Camargo (1964) e modificado por Martinez (2004), conforme abaixo na Tabela 1.

**Tabela 1.** Componentes utilizados para o preparo do meio de cultura LIT.

Solução	Quantidade
NaCl	4,0g
KCl	0,4g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,0g
Glucose	2,0g
Tryptose	5,0g
Liver Infusion broth	5,0g
Haemin (sigma)	25,0mg
Soro fetal bovino	100,0mL
Água MiliQ	qsp .1000,0mL

### 3.2.Meio de cultura - RPMI

O meio de cultura utilizado para o crescimento dos macrófagos foi o meio RPMI com 10% de soro fetal bovino. Os reagentes utilizados e suas devidas concentrações encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Componentes utilizados para o preparo do meio de cultura RPMI.

Reagentes	Quantidade
Meio RPMI 1640	1 ampola
Água destilada	900mL
NaCO <sub>3</sub>	2,0g
Tampão Hepes	2,38g

Após a adição de todos os componentes foi necessário acertar o pH para 7,2 com NaOH 1M ou HCl 1M. Feito o acerto de pH, deve-se passar esta solução por um filtro com membrana de poro de 0,22 $\mu$ m dentro do fluxo laminar e adicionar 100mL de soro fetal bovino inativado.

Essa solução foi mantida em geladeira e no momento de seu uso foi adicionado 100 $\mu$ L de penicilina e 100 $\mu$ L de estreptomicina para 1000mL do meio.

### 3.3.PBS

Para realizar a lavagem dos macrófagos foi utilizado PBS, solução salina tamponada com fosfato 0,01mol/L. Os reagentes para sua preparação encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Componentes utilizados para preparação de PBS.

Reagente	Quantidade
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 12 H <sub>2</sub> O	2,65
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	0,357
NaCl	8,182
Água destilada	qsp 100mL

Para o uso deve-se diluir 100mL da solução acima em qsp 1000mL de água destilada.

### 3.4.Manutenção das cepas em meio LIT

Após o isolamento da cepa foram feitos repiques sucessivos para se obter ótimo crescimento, visto que as fezes dos triatomíneos possuem bactérias as quais em contato com um meio de cultura rico em nutrientes podem impedir o crescimento de *T. cruzi*. Portanto, feito o isolamento e a correta limpeza do meio, se torna necessário fazer repiques a cada 30 dias para que a cepa não entre em fase de declínio.

### **3.5.Fixação, Coloração e Mensuração de Formas Epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***

Em uma lâmina desengordurada foi aplicado 5µL da cepa desejada do meio LIT. Em seguida, após seco o material, foi realizado uma fixação química com álcool metílico e após 2 minutos corado pelo método de Giemsa.

Para a captura das imagens, foi utilizado microscópio Leica Leitz DMRXE acoplado a câmara filmadora Leica DC100 e foram mensuradas no programa Motic Advanced 3.2 plus. Nesse programa utilizou-se o ajuste de zoom e para mensurar o comprimento total, largura do corpo, distância posterior ao núcleo e distância anterior ao núcleo utilizou-se a ferramenta poly line e para mensurar a área do núcleo e área do cinetoplasto utilizou-se a ferramenta irregular.

Foram mensuradas imagens de 30 formas de epimastigotas advindas do meio de cultura LIT, levando-se em conta a qualidade das organelas estudadas. Os parâmetros morfológicos definidos por Dias e Freitas Filho (1943) que foram mensurados são comprimento total do corpo (CT), largura do corpo (LC), distância anterior ao núcleo (DAN), distância posterior ao núcleo (DPN), área do cinetoplasto (AC), área do núcleo (AN) e índice nuclear ( $IN=DPN/DAN$ ). Cada parâmetro morfológico foi mensurado em triplicata, dessa forma foram mensuradas 30 formas de epimastigotas e cada forma foi mensurada em triplicata para cada parâmetro.

Para a definição das formas epimastigotas de *T. cruzi* foram utilizados os parâmetros definidos por Rossi (2007), mostrados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Parâmetros morfométricos para a caracterização de formas epimastigotas.

Parâmetros Morfométricos - Valores ( $\mu\text{m}$ )			
Largura	Fina	Intermediária	Larga
	1,1 - 1,7	1,8 - 2,8	2,9 - 5,0
Comprimento	Curto	Intermediário	Longo
	13,0 - 23,2	23,3 - 31,3	31,4 - 43,7
Área do Núcleo*	Pequeno	Intermediário	Grande
	0,9 - 1,6	1,7 - 2,9	3,0 - 6,8
Área do Cinetoplasto*	Pequeno	Intermediário	Grande
	0,3 - 0,5	0,6 - 0,9	1,0 - 1,7
Índice Nuclear	Baixo	Intermediário	Alto
	0,1 - 0,3	0,4 - 0,8	0,9 - 2,2

\* $\mu\text{m}^2$

### 3.6. Estudo das formas epimastigotas por meio da cinética de crescimento em meio de cultura

#### LIT

O estudo da cinética de crescimento foi realizado a partir da contagem em triplicata das formas observadas durante dez dias consecutivos em câmara de Neubauer no microscópio óptico. Para isso, foi necessário um inóculo inicial de  $5 \cdot 10^6$  parasitos/mL que se conseguiu por uma mistura da cepa com um meio limpo sabendo-se as concentrações e os volumes necessários de cada.

Esse estudo é importante para definir a fase logarítmica de crescimento de cada cepa de *T. cruzi* em meio de cultura, de modo a estabelecer a melhor data para extrair o DNA genômico do parasito e realizar o inóculo em animais laboratoriais.

### **3.7. Estudo molecular das cepas de *Trypanosoma cruzi* por meio do posicionamento da região V7V8 do gene SSU rRNA**

O estudo molecular das cepas utilizadas foi definido segundo a metodologia de Lima, 2011.

Para realizar a extração do DNA dos parasitos foi necessário coletá-los em meio de cultura LIT em fase log em uma concentração de no mínimo  $1.10^9$  parasitos/mL. Foram lavados três vezes em Tampão PBS e centrifugados a 5000rpm por 10 minutos. Feito isso, o sobrenadante foi retirado e o “*pellet*” armazenado no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou ressuspenso.

Para ressuspender os “*pelletes*”, esses foram mantidos em gelo e adicionou-se SE (Solução Salina Tris EDTA), pronase (20ng/mL), RNase (20ng/mL) e 100 $\mu\text{L}$  de sarkosil. Foi homogeneizado e incubado em banho maria entre  $55 - 60^{\circ}\text{C}$  por mais ou menos uma ou duas horas. Feita a incubação, foi extraído uma vez com Fenol:Tris 1:1, duas vezes Fenol:Clorofórmio 1:1, duas vezes Clorofórmio:Álcool isoamílico 24:1 e uma vez Clorofórmio.

Após a extração foi feita a precipitação do DNA pela adição de acetato de sódio 3M pH 7,0 e 2,5 volumes de etanol 100% gelado e centrifugado por 2 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi retirado e o DNA lavado com 400 $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado. Após isso, secou-se o “*pellet*” a  $37^{\circ}\text{C}$  e ressuspendeu-o com 30 a 100 $\mu\text{L}$  de TE (Tampão Tris-EDTA) e quantificou-se o DNA no espectofotômetro.

Para realizar a PCR (Polymerase Chain Reaction) foi utilizada uma mistura de 2 $\mu\text{L}$  de DNA, 20 $\mu\text{L}$  de dNTP, 10 $\mu\text{L}$  de Tampão Buffer, 12 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 2 $\mu\text{L}$  de cada primer, 1 $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase e 51  $\mu\text{L}$  de água bidestilada, totalizando 100 $\mu\text{L}$  de volume total de amostra.

As condições para a amplificação foram:

94°C por 3 min; → 1 ciclo  
 94°C por 1 min; }  
 48°C por 1 min; } 39 ciclos  
 72°C por 1 min;  
 72°C por 10 min. → 1 ciclo

Os primers utilizados no sequenciamento foram:

SSU rDNA (V7-V8)

609F – 5' CAC CCG CGG TAA TTC CAG C 3'

706R – 5' TTG AGG TTA CAG TCT CAG 3'

Após a amplificação, foram acrescentadas nas amostras tampão de carregamento (50% de glicerol; 0,4% de azul de bromofenol; 0,4% de xilenocianol) e submetidas à eletroforese em gel de agarose (2,0%) corado com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain em tampão TAE (40mM de Tris-acetato; 2mM de EDTA, pH 8,0) a 50 V.

Os fragmentos separados por eletroforese foram cortados e purificados em coluna Spin X (Costar®). E os produtos obtidos foram submetidos à reação de seqüência utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer) em seqüenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) e ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) submetendo as reações a:

96°C por 1 min }  
 96°C por 15 seg } 30 ciclos  
 50°C por 15 seg }  
 60°C por 4 min

E os oligonucleotídeos utilizados foram:

1156F – 5' CGT ACT GGT GCG TCA AGA GG 3'

1156R – 5' CCT CTG ACG CAC CAG TAC G 3'

Os cromatogramas das sequências foram analisados no programa Sqman do pacote de programas DNASTar (Nicholas et al., 1997) e as sequências de nucleotídeos alinhadas pelo programa BioEdit. Por meio desse alinhamento foi determinada uma matriz de similaridade e a partir dessa, elaborada uma árvore filogenética por determinação *Neighbor-Joining* pelo programa MEGA 5.1.

### **3.8. Genotipagem das cepas de *Trypanosoma cruzi* pelos genes 24Sa rRNA, HSP60 e GPI**

Para realizar essa análise, primeiramente, foi realizada a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer a fim de se obter uma concentração de  $1.10^6$  parasitos/mL. Todo o procedimento foi descrito por Lewis, 2009.

#### **– Extração do DNA genômico**

Para extrair o DNA genômico de *T. cruzi* 1mL do meio de cultura foi centrifugado a 3000g por 1 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e ao *pellet* foi adicionado 800µL de Tryps Wash Buffer (100mM de NaCl, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 20mM de Tris-HCl pH 7,5). O material foi centrifugado novamente e o sobrenadante descartado. A seguir o *pellet* foi ressuspensão em 250µL de TELT Buffer (50nM de Tris-HCl pH8,0; 62,5mM de EDTA; 2,5mM de EDTA e 4% de Triton X-100). Após essa adição foi adicionado 250µL de fenol/clorofórmio e centrifugado novamente a 16000g por 2 minutos em temperatura ambiente.

O sobrenadante foi transferido a outro tubo e adicionado a ele 250 $\mu$ L de clorofórmio e centrifugado a 16000g por 2 minutos. O sobrenadante foi novamente ao outro tubo e o DNA foi precipitado com 750 $\mu$ L de etanol 100% e 25 $\mu$ L de acetato de sódio 3M pH7,0 e novamente centrifugado a 16000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material ressuspenso em 30 $\mu$ L de água Mili-Q autoclavada.

– Amplificação dos genes 24S $\alpha$  rRNA, HSP60 e GPI

Para realizar a análise do gene 24S $\alpha$  rRNA foi necessário utilizar os seguintes primers:

F: D71 5' – AAGGTGCGTCGACAGTGTGG – 3'

R: D72 5' – TTTTCAGAATGGCCGAACAGT – 3'

Para a reação de PCR foi adicionado os seguintes componentes:

- 100g de DNA genômico;
- 0,2mmol/L para cada dNTP;
- 1 pmol/ $\mu$  de cada primer;
- 1,5mmol/L de MgCl<sub>2</sub>
- 1 unidade de *Taq* DNA polimerase
- Tampão 10X

As condições para amplificação do gene 24S $\alpha$  rRNA foram:

- 94°C por 5 min
  - 94°C por 30 seg
  - 55°C por 30 seg
  - 72°C por 30 seg
  - 72°C por 7 min
- } 30 vezes

O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta.

Já para a reação de PCR dos genes HSP60 e GPI utilizou-se os seguintes primers:

F: HSP60 5' – GTGGTATGGGTGACATGTAC – 3'

R: HSP60 5' – CGAGCAGCAGAGCGAAACAT – 3'

F: GPI 5' - GGCATGTGAAGCTTTGAGGCCTTTTTTCAG - 3'

R: GPI 5' - TGTAAGGGCCCAGTGAGAGCGTTCGTTGAATAGC – 3'

Para a reação de PCR dos genes HSP60 e GPI adicionou-se os seguintes componentes:

- 100g de DNA
- 0,2mmol/L de cada dNTP
- 1pmol/ $\mu$ L de cada primer
- 1,5mmol/L de MgCl<sub>2</sub>
- 1 unidade de *Taq* DNA polimerase
- Tampão 10X

As condições para amplificação dos genes HSP60 e GPI foram:

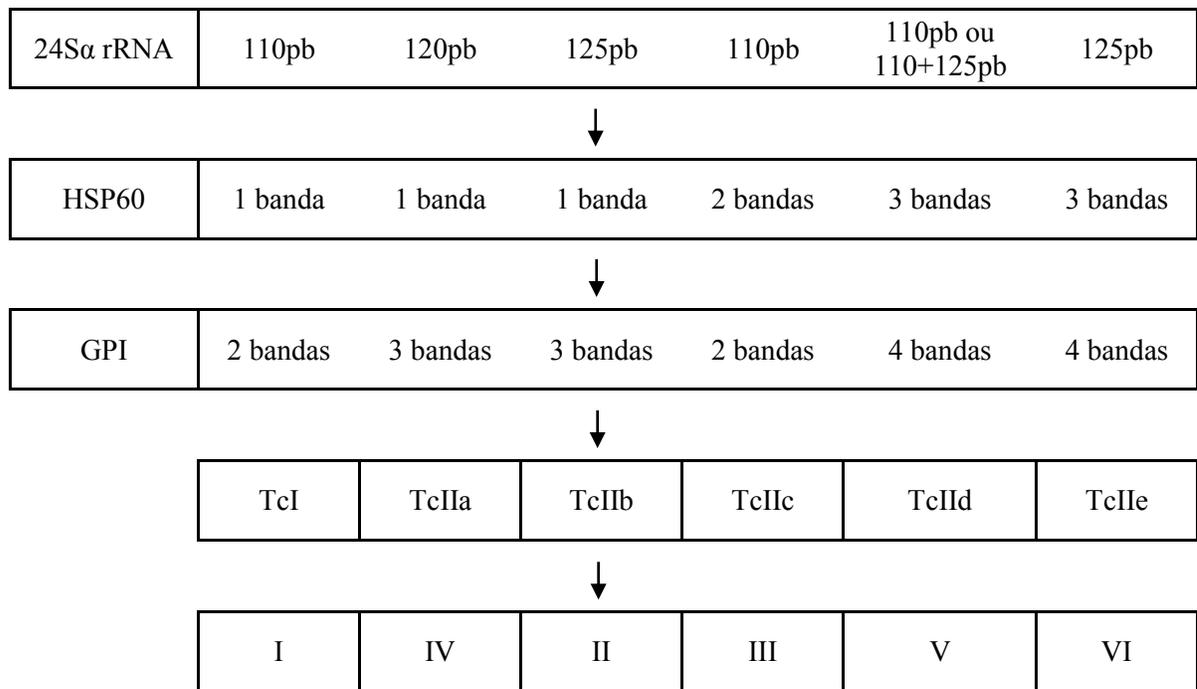
- 94°C por 3 min
  - 94°C por 30 seg
  - 64°C por 30 seg
  - 72°C por 1 min
- } 4 vezes

- 94°C por 30 seg
  - 60°C por 30 seg
  - 72°C por 1 min
  - 72°C por 10 min
- } 28 vezes

Os produtos obtidos dos genes HSP60 e GPI foram digeridos com as enzimas *EcoRV* e *HhaI*, respectivamente. As condições para a reação foram:

- 10µL do produto da PCR do gene HSP60 ou do gene GPI
- 2µL de tampão NEB 3 ou NEB 4
- 0,2µL BSA 100X
- 0,5µL de *EcoRV* 10U/µL e *HhaI* 10U/µL
- 7,3µL de água

Após a reação de digestão enzimática que foi realizada por 4 horas a 37°C, aplicou-se 5µL do produto em gel de agarose a 3%. Os fragmentos obtidos foram comparados segundo Lewis et al., 2009 de acordo com a Figura 3:



**Figura 3.** Método para determinar as DTUs de *T. cruzi*. (Modificado de Lewis, 2009).

### 3.9. Infecção de macrófagos da linhagem J774

Para a realização desse experimento foi necessário utilizar duas placas de 24 poços, uma para um tempo de 24 horas e outra para 72 horas (Figura 4).



**Figura 4.** Placa de 24 poços utilizada para infecção de macrófagos da linhagem J774.

Foi utilizada cultura de macrófagos da linhagem J774 que se encontrava em uma garrafa. Para obtê-los foi necessário raspar o conteúdo da garrafa com um rodinho e verter o conteúdo em um tubo falcon de 15mL, centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido em 2 mL de meio RPMI.

Vinte microlitros desta solução foram transferidos para um eppendorf e adicionados 180 $\mu$ L de meio RPMI. Para que se diferenciasssem células viáveis das não viáveis foi necessário colocar uma solução de azul de Tripán 1% e, então, pegar 100 $\mu$ L em uma câmara de Neubauer e contar os quatro quadrantes externos. Após a contagem, é necessário realizar uma diluição para que a cultura de macrófagos esteja em uma concentração de  $1.10^5$  macrófagos/mL.

Feita a concentração requerida de macrófagos foi necessário plaqueá-los em uma placa de 24 poços, com uma lamínula em cada poço, e aguardar de 3 a 4 horas para que as células fiquem aderidas à lamínula. Durante esse período a placa deverá permanecer sempre em uma estufa de CO<sub>2</sub>.

A concentração de *T. cruzi* necessária para a infecção foi  $1.10^6$  parasitos/mL. Para obtermos essa concentração foi necessário contar os parasitos em uma câmara de Neubauer em uma diluição de 1:10 e, então, diluir a cultura até que chegue a concentração de parasitos requerida.

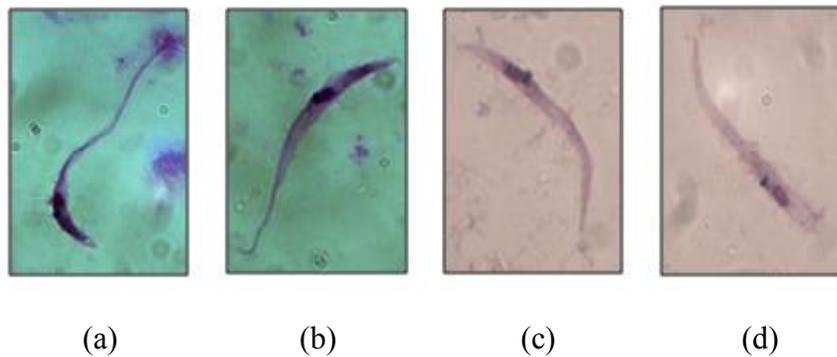
Após o tempo necessário para a adesão das células nas lamínulas foi adicionada à placa os parasitos na concentração necessária e uma delas foi deixada na estufa de CO<sub>2</sub> por um período de 24, e a outra por 72 horas.

Após o tempo desejado retirou-se o meio e lavou-se 3 vezes com PBS. Fixou-se 2 minutos com metanol e as lamínulas foram coradas com reagente de Giemsa por 8 minutos e coladas em outra lâmina para poder realizar a contagem de amastigotas em microscópio em aumento de 1000x.

### 3. Resultados

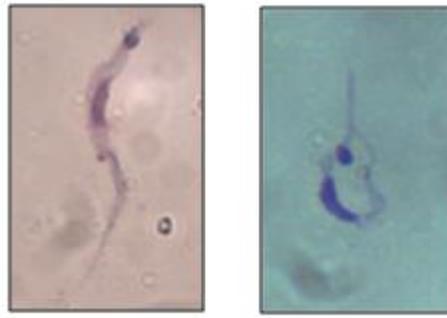
#### 4.1. Mensuração de Formas Epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A captura das imagens das formas epimastigotas permitiu demonstrar que o cinetoplasto ocupa posições distintas quando obtidos em meio de cultura, como mostra a Figura 5a em que o cinetoplasto está na posição posterior ao núcleo, Figura 5b em que o cinetoplasto ocupa posição anterior ao núcleo, Figura 5c em que o cinetoplasto está na posição anterior e perto do núcleo e Figura 5d em que o cinetoplasto está na posição anterior e longe do núcleo. Essas observações estão de acordo com Brumpt, 1912 e Camargo, 1964 que sugerem que a posição do cinetoplasto pode ser uma transformação de formas epimastigotas para tripomastigotas.



**Figura 5.** Diversidade morfológica em formas epimastigotas das cepas SI7 e QMM12.

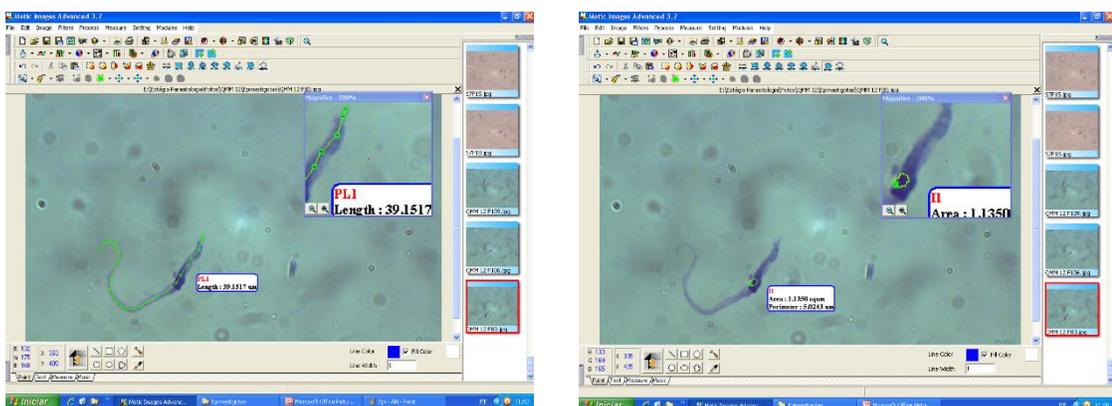
Mesmo em meio de cultura onde há predominância de formas epimastigotas, é possível encontrar formas tripomastigotas, porém em quantidade menor como demonstra a Figura 6.



**Figure 6.** Ocorrência de formas tripomastigotas das cepas SI7 e QMM12 em meio de cultura LIT.

Feito a captura de imagens, conforme descrito em materiais e métodos fez-se a mensuração de 30 formas epimastigotas de cada uma das cepas SI<sub>7</sub> e QMM<sub>12</sub>.

Para a mensuração das imagens capturadas foi utilizado o programa Motic Advanced 3.2 plus. Conforme descrito em Materiais e Métodos, utilizou-se o ajuste de zoom e para mensurar o comprimento total, largura do corpo, distância posterior ao núcleo e distância anterior ao núcleo utilizou-se a ferramenta poly line (Figura 7a) e para mensurar a área do núcleo e área do cinetoplasto utilizou-se a ferramenta irregular (Figura 7b).



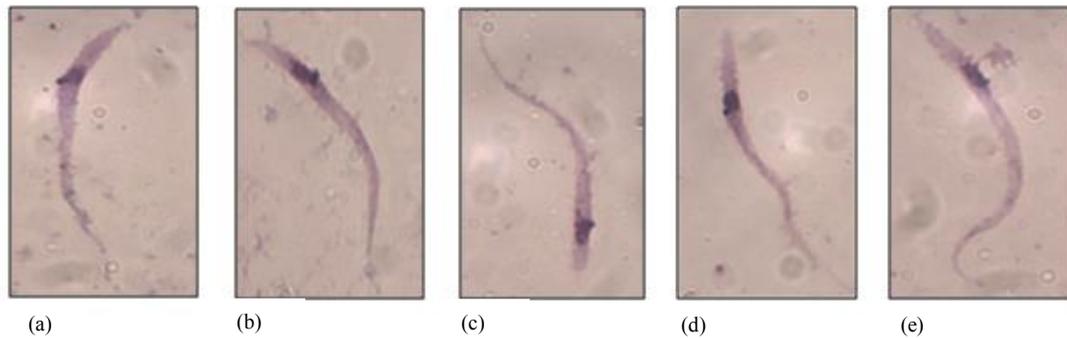
(a)

(b)

**Figura 7.** Programa utilizado para mensuração de imagens. Ferramenta poly line (a) e irregular (b).

– Cepa SI<sub>7</sub>

Algumas das fotomicrografias obtidas da cepa SI<sub>7</sub> encontram-se abaixo (Figura 8):



**Figura 8.** Fotomicrografias das formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa SI<sub>7</sub> mensuradas em aumento de 1000X.

Os valores encontrados da mensuração das formas epimastigotas da cepa SI<sub>7</sub> encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5.** Resultados obtidos da mensuração de formas epimastigotas da cepa SI<sub>7</sub> de *T. cruzi*.

Mensurações (µm) da cepa SI <sub>7</sub>							
Imagem	CT	LC	AC*	AN*	DNA	DNP	IN
SI <sub>7</sub> 01	23,190	1,697	0,760	1,950	16,589	6,054	0,365
	23,626	1,556	0,675	1,960	16,650	5,909	0,355
	23,155	1,556	0,745	2,050	16,950	5,794	0,342
SI <sub>7</sub> 02	24,726	2,280	0,700	2,125	15,863	8,941	0,564
	25,539	2,280	0,690	2,305	15,626	9,018	0,577
	24,867	2,052	0,695	2,135	15,635	8,687	0,556
SI <sub>7</sub> 03	20,706	1,913	0,565	2,710	15,206	6,230	0,410
	19,972	2,000	0,565	2,640	15,577	6,294	0,404
	20,279	1,942	0,505	2,700	15,115	6,391	0,423
SI <sub>7</sub> 04	22,969	1,803	0,345	2,860	18,544	4,717	0,254
	23,368	1,972	0,360	3,035	18,919	4,977	0,263
	23,162	1,860	0,350	2,900	18,435	4,810	0,261

<b>Mensurações (µm) da cepa SI7</b>							
<b>Imagem</b>	<b>CT</b>	<b>LC</b>	<b>AC*</b>	<b>AN*</b>	<b>DNA</b>	<b>DNP</b>	<b>IN</b>
<b>SI7 05</b>	21,517	1,664	0,425	1,865	16,907	4,743	0,281
	21,286	1,526	0,455	1,975	16,365	4,640	0,284
	23,659	1,526	0,435	1,990	16,772	4,357	0,260
<b>SI7 06</b>	19,184	1,720	0,465	1,980	14,600	5,070	0,347
	19,128	1,836	0,480	1,755	14,360	4,736	0,330
	19,163	1,664	0,450	1,945	14,596	4,761	0,326
<b>SI7 07</b>	20,591	1,703	0,515	2,470	15,283	5,157	0,337
	20,284	1,603	0,520	2,590	15,327	5,282	0,345
	20,345	1,703	0,505	2,515	15,344	5,029	0,328
<b>SI7 08</b>	20,304	2,012	0,595	1,960	16,153	4,388	0,272
	20,583	2,102	0,560	1,990	16,175	4,518	0,279
	20,375	1,980	0,545	1,995	16,167	4,528	0,280
<b>SI7 09</b>	25,856	2,302	0,600	3,015	18,622	7,076	0,380
	25,875	2,304	0,655	3,100	18,854	6,958	0,369
	25,942	2,200	0,635	3,065	18,959	7,287	0,384
<b>SI7 10</b>	23,473	1,706	0,495	1,455	19,775	4,313	0,218
	23,627	1,600	0,450	1,365	19,641	4,235	0,216
	23,280	1,606	0,480	1,410	19,651	4,346	0,221
<b>SI7 11</b>	14,112	2,460	0,400	2,210	9,100	4,770	0,524
	14,339	2,452	0,405	2,365	8,872	4,777	0,538
	14,012	2,430	0,385	2,245	8,942	4,893	0,547
<b>SI7 12</b>	24,928	1,719	0,445	1,175	18,825	5,580	0,296
	24,588	1,805	0,480	1,180	18,607	5,569	0,299
	24,992	1,843	0,475	1,210	18,895	5,631	0,298
<b>SI7 13</b>	26,024	1,712	0,500	2,385	19,788	6,113	0,309
	26,147	1,608	0,525	2,260	19,618	6,409	0,327
	26,542	1,628	0,450	2,315	19,430	6,107	0,314
<b>SI7 14</b>	22,917	2,017	0,510	1,510	16,195	5,860	0,362
	23,050	2,021	0,500	1,425	16,222	5,918	0,365
	22,964	2,026	0,540	1,595	16,265	5,949	0,366
<b>SI7 15</b>	12,025	1,118	0,520	1,780	7,682	4,270	0,556
	12,105	1,740	0,545	1,650	7,229	4,323	0,598
	12,108	1,713	0,540	1,625	7,540	4,867	0,645
<b>SI7 16</b>	20,752	2,110	0,445	1,740	14,861	5,880	0,396
	20,718	2,151	0,405	1,665	14,896	5,879	0,395
	20,671	2,052	0,430	1,825	14,904	5,880	0,395

<b>Mensurações (<math>\mu\text{m}</math>) da cepa SI7</b>							
<b>Imagem</b>	<b>CT</b>	<b>LC</b>	<b>AC*</b>	<b>AN*</b>	<b>DNA</b>	<b>DNP</b>	<b>IN</b>
	26,973	1,805	0,425	2,315	19,479	7,304	0,375
<b>SI7 17</b>	27,135	1,708	0,380	2,425	19,520	7,227	0,370
	26,924	1,712	0,365	2,615	19,714	7,150	0,363
	27,807	1,392	0,495	1,605	22,095	5,460	0,247
<b>SI7 18</b>	27,562	1,562	0,475	1,450	22,032	5,760	0,261
	27,794	1,587	0,490	1,520	22,120	5,601	0,253
	32,575	1,731	0,680	1,795	25,123	6,431	0,256
<b>SI7 19</b>	32,502	1,701	0,710	1,830	25,067	6,705	0,267
	32,250	1,695	0,785	1,820	25,186	6,595	0,262
	29,233	2,209	0,745	1,680	23,171	6,702	0,289
<b>SI7 20</b>	29,529	2,315	0,770	1,635	22,990	6,849	0,298
	29,220	2,234	0,700	1,640	22,689	6,931	0,305
	29,080	1,685	0,700	1,460	22,997	6,865	0,299
<b>SI7 21</b>	29,012	1,691	0,730	1,565	22,953	6,614	0,288
	29,372	1,652	0,645	1,530	23,019	6,636	0,288
	24,677	1,952	0,575	2,135	19,477	4,975	0,255
<b>SI7 22</b>	24,515	1,925	0,515	2,135	19,640	4,857	0,247
	24,436	2,093	0,550	2,135	19,225	4,945	0,257
	37,086	1,709	0,315	0,830	26,323	10,288	0,391
<b>SI7 23</b>	37,087	1,713	0,320	0,820	26,524	10,276	0,387
	36,854	1,715	0,335	0,825	26,431	10,303	0,390
	29,847	2,032	0,455	1,775	22,905	7,244	0,316
<b>SI7 24</b>	29,954	2,049	0,415	1,630	22,976	7,365	0,321
	29,624	2,000	0,465	1,735	23,166	7,234	0,312
	26,958	1,754	0,480	1,560	19,894	6,982	0,351
<b>SI7 25</b>	27,054	1,811	0,475	1,665	19,639	7,066	0,360
	27,142	1,850	0,500	1,575	19,987	6,817	0,341
	32,884	1,705	0,315	2,090	23,938	9,339	0,390
<b>SI7 26</b>	32,981	1,830	0,315	1,925	23,856	9,461	0,397
	32,674	1,700	0,270	1,940	23,744	9,431	0,397
	26,981	1,200	0,505	1,620	22,190	4,379	0,197
<b>SI7 27</b>	26,990	1,200	0,495	1,550	22,175	4,338	0,196
	27,097	1,200	0,440	1,620	22,180	4,251	0,192
	24,448	1,946	0,650	2,830	19,365	5,602	0,289
<b>SI7 28</b>	24,570	1,837	0,620	2,960	19,286	5,468	0,284
	24,475	1,724	0,615	3,005	19,154	5,467	0,285

Mensurações ( $\mu\text{m}$ ) da cepa SI <sub>7</sub>							
Imagem	CT	LC	AC*	AN*	DNA	DNP	IN
SI7 29	18,871	2,123	0,540	1,850	22,640	6,613	0,292
	18,826	2,100	0,570	1,795	22,891	6,622	0,289
	18,592	2,103	0,520	1,765	22,844	6,736	0,295
SI7 30	29,781	1,408	0,225	2,120	13,609	5,045	0,371
	29,442	1,506	0,245	2,050	13,818	5,045	0,365
	29,667	1,500	0,280	2,205	13,868	5,189	0,374

\* ( $\mu\text{m}^2$ )

Em que,

CT: Comprimento total do corpo;

LC: Largura do corpo;

AC: Área do cinetoplasto;

AN: Área do núcleo;

DNA: Distância anterior ao núcleo;

DNP: Distância posterior ao núcleo;

IN: Índice nuclear ( $\text{IN} = \text{DNP}/\text{DNA}$ ).

As médias encontradas a partir dos valores obtidos da mensuração de formas epimastigotas da cepa SI<sub>7</sub> estão representadas na Tabela 6. As definições das formas a partir dos parâmetros de Rossi, 2007 estão representadas na Tabela 7.

**Tabela 6.** Média dos resultados das mensurações de formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa SI<sub>7</sub>.

Resultados Finais ( $\mu\text{m}$ ) - Cepa SI <sub>7</sub>							
	CT	LC	AC*	AN*	DNA	DNP	IN
<b>Média Total</b>	24,709	1,829	0,509	1,967	18,560	6,090	0,341
<b>Desvio Padrão</b>	5,324	0,276	0,127	0,521	4,380	1,499	0,094
<b>Máximo</b>	37,009	2,447	0,738	3,060	26,426	10,289	0,600
<b>Mínimo</b>	12,079	1,200	0,250	0,825	7,484	4,298	0,195

\* ( $\mu\text{m}^2$ )

Em que,

CT: Comprimento total do corpo;

LC: Largura do corpo;

AC: Área do cinetoplasto;

AN: Área do núcleo;

DNA: Distância anterior ao núcleo;

DNP: Distância posterior ao núcleo;

IN: Índice nuclear ( $IN = DPN/DAN$ ).

**Tabela 7.** Resultados obtidos a partir da mensuração de formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa SI7.

Definições Obtidas - Cepa SI7				
CT	LC	AC	AN	IN
Intermediário	Intermediária	Pequeno	Intermediário	Baixo

– Cepa QMM<sub>12</sub>

Algumas das fotomicrografias obtidas da cepa QMM<sub>12</sub> encontram-se abaixo (Figura 7):



Figure 9. Fotomicrografias das formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa QMM12 mensuradas em aumento de 1000X.

Os valores encontrados da mensuração das formas epimastigotas da cepa QMM<sub>12</sub> encontram-se na Tabela 8.

**Tabela 8.** Resultados das mensurações de formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa QMM<sub>12</sub>.

Mensurações (µm) da cepa QMM <sub>12</sub>							
Imagem	CT	LC	AC*	AN*	DNA	DNP	IN
QMM <sub>12</sub> 01	38,033	1,329	0,530	1,550	27,152	11,554	0,426
	38,157	1,259	0,590	1,490	27,289	11,352	0,416
	38,141	1,145	0,665	1,535	27,240	11,393	0,418
QMM <sub>12</sub> 02	34,397	1,900	0,840	1,795	24,132	10,208	0,423
	34,367	2,010	0,820	1,585	23,967	10,517	0,439
	33,904	1,908	0,880	1,550	24,089	10,429	0,433
QMM <sub>12</sub> 03	40,227	1,425	0,700	1,805	29,628	10,665	0,360
	39,962	1,562	0,625	1,880	29,692	10,499	0,354
	40,498	1,487	0,620	1,780	29,912	10,538	0,352
QMM <sub>12</sub> 04	30,252	1,632	0,480	1,650	23,537	6,520	0,277
	29,955	1,754	0,395	1,860	23,681	6,402	0,270
	30,069	1,531	0,455	1,580	23,626	6,392	0,271
QMM <sub>12</sub> 05	31,678	1,643	0,545	2,005	24,051	8,137	0,338
	31,719	1,803	0,560	1,800	23,851	7,990	0,335
	31,731	1,803	0,525	1,890	23,815	7,932	0,333
QMM <sub>12</sub> 06	42,521	2,453	1,030	2,425	31,529	11,580	0,367
	42,710	2,405	1,010	2,515	31,247	10,931	0,350
	42,674	2,614	1,065	2,300	31,139	11,234	0,361
QMM <sub>12</sub> 07	42,420	2,684	0,685	1,760	31,500	11,801	0,375
	42,806	2,462	0,600	1,450	31,169	11,451	0,367
	42,493	2,418	0,670	1,425	31,588	11,647	0,369
QMM <sub>12</sub> 08	30,493	2,164	0,775	1,850	20,979	8,770	0,418
	30,163	2,029	0,745	1,770	21,510	9,001	0,418
	30,386	2,109	0,775	1,950	21,486	9,253	0,431
QMM <sub>12</sub> 09	30,020	1,931	0,605	1,755	22,512	7,169	0,318
	30,096	2,106	0,635	1,630	22,620	7,337	0,324
	29,630	2,026	0,680	1,685	22,557	7,273	0,322
QMM <sub>12</sub> 10	34,289	2,139	0,590	2,285	26,219	8,040	0,307
	33,857	2,276	0,630	2,165	26,273	8,059	0,307
	34,090	2,105	0,565	2,295	26,276	8,155	0,310
QMM <sub>12</sub> 11	33,441	1,300	0,390	1,415	22,266	11,280	0,507
	33,956	1,347	0,420	1,470	22,305	11,321	0,508
	34,053	1,425	0,390	1,330	22,122	11,403	0,515

Mensurações ( $\mu\text{m}$ ) da cepa QMM <sub>12</sub>							
Imagem	CT	LC	AC*	AN*	DNA	DNP	IN
QMM <sub>12</sub> 12	38,237	1,782	0,560	1,880	28,790	9,674	0,336
	38,567	1,771	0,530	1,720	28,777	9,607	0,334
	38,481	1,850	0,570	1,865	29,072	9,461	0,325
QMM <sub>12</sub> 13	43,215	1,822	0,770	1,500	33,266	10,789	0,324
	43,552	1,748	0,670	1,565	32,520	10,900	0,335
	43,251	1,827	0,680	1,620	32,942	10,955	0,333
QMM <sub>12</sub> 14	27,150	1,700	0,755	1,270	18,597	8,472	0,456
	16,978	1,656	0,705	1,240	18,758	8,627	0,460
	27,006	1,680	0,760	1,335	18,730	8,216	0,439
QMM <sub>12</sub> 15	24,068	1,656	0,320	1,660	17,352	7,541	0,435
	25,560	1,534	0,300	1,760	17,065	7,781	0,456
	24,657	1,519	0,390	1,760	17,527	7,375	0,421
QMM <sub>12</sub> 16	27,814	1,806	0,485	1,210	16,344	12,094	0,740
	27,652	1,811	0,465	1,390	16,340	11,892	0,728
	27,839	1,910	0,480	1,400	16,095	12,105	0,752
QMM <sub>12</sub> 17	33,799	2,150	0,565	2,490	23,173	11,151	0,481
	34,356	2,316	0,575	2,565	22,708	11,181	0,492
	34,050	2,014	0,535	2,495	23,184	11,220	0,484
QMM <sub>12</sub> 18	34,682	1,800	0,250	1,030	23,891	10,855	0,454
	35,008	1,811	0,330	1,050	24,235	11,420	0,471
	34,286	1,700	0,330	1,085	23,517	11,118	0,473
QMM <sub>12</sub> 19	34,872	1,877	0,685	1,245	24,751	9,809	0,396
	35,193	1,994	0,695	1,265	25,072	9,417	0,376
	35,112	1,777	0,760	1,425	25,403	9,782	0,385
QMM <sub>12</sub> 20	40,050	1,754	0,645	1,015	29,497	10,053	0,341
	39,450	1,666	0,695	1,300	30,224	10,056	0,333
	40,257	1,766	0,550	1,205	30,138	10,093	0,335
QMM <sub>12</sub> 21	32,656	1,925	0,375	1,590	24,777	7,806	0,315
	32,153	1,966	0,330	1,450	24,477	7,728	0,316
	33,419	1,866	0,310	1,635	24,080	7,821	0,325
QMM <sub>12</sub> 22	28,311	1,555	0,595	1,340	23,785	4,680	0,197
	28,464	1,562	0,610	1,560	23,375	4,783	0,205
	27,757	1,588	0,630	1,510	23,847	4,611	0,193
QMM <sub>12</sub> 23	30,046	1,722	0,415	1,120	23,673	6,708	0,283
	30,289	1,607	0,415	1,225	23,751	6,558	0,276
	30,420	1,624	0,480	1,345	23,421	6,756	0,288

Mensurações ( $\mu\text{m}$ ) da cepa QMM <sub>12</sub>							
Imagem	CT	LC	AC*	AN*	DNA	DNP	IN
QMM <sub>12</sub> 24	30,827	1,421	0,350	1,245	22,339	8,907	0,399
	31,103	1,387	0,390	1,160	22,067	9,000	0,408
QMM <sub>12</sub> 25	30,919	1,422	0,435	1,105	22,122	8,877	0,401
	32,142	1,238	0,595	1,345	25,613	7,111	0,278
	32,600	1,334	0,515	1,355	24,930	7,308	0,293
	32,408	1,224	0,520	1,510	24,541	7,314	0,298
QMM <sub>12</sub> 26	32,449	1,531	0,440	1,670	24,221	7,682	0,317
	32,664	1,583	0,445	1,770	24,196	7,792	0,322
	32,436	1,669	0,520	1,480	24,465	7,720	0,316
QMM <sub>12</sub> 27	27,224	1,974	0,865	2,005	20,457	6,685	0,327
	27,579	2,069	0,835	2,280	20,826	6,565	0,315
	27,196	2,010	0,805	1,915	20,405	6,439	0,316
QMM <sub>12</sub> 28	39,362	1,804	0,825	1,550	31,271	8,852	0,283
	39,787	1,931	0,780	1,585	30,886	8,516	0,276
	39,396	1,924	0,745	1,625	30,898	8,706	0,282
QMM <sub>12</sub> 29	38,865	2,225	0,950	1,050	31,013	7,558	0,244
	37,986	2,245	1,020	1,060	30,748	7,789	0,253
	37,966	2,182	1,065	0,955	30,462	7,480	0,246
QMM <sub>12</sub> 30	31,297	1,440	0,450	1,545	26,161	6,098	0,233
	31,827	1,486	0,425	1,430	25,749	5,947	0,231
	31,773	1,616	0,485	1,590	26,262	5,715	0,218

\* ( $\mu\text{m}^2$ )

Em que,

CT: Comprimento total do corpo;

LC: Largura do corpo;

AC: Área do cinetoplasto;

AN: Área do núcleo;

DNA: Distância anterior ao núcleo;

DNP: Distância posterior ao núcleo;

IN: Índice nuclear (IN=DPN/DAN).

As médias encontradas a partir dos valores obtidos da mensuração de formas epimastigotas da cepa QMM<sub>12</sub> estão representadas na Tabela 9. As definições das formas a partir dos parâmetros de Rossi, 2007 estão representadas na Tabela 10.

**Tabela 9.** Resultados das mensurações de formas epimastigotas da cepa QMM<sub>12</sub> de *T. cruzi*.

<b>Resultados Finais (µm) - Cepa QMM<sub>12</sub></b>							
	<b>CT</b>	<b>LC</b>	<b>AC*</b>	<b>AN*</b>	<b>DNA</b>	<b>DNP</b>	<b>IN</b>
<b>Média Total</b>	33,774	1,800	0,602	1,606	25,042	8,927	0,365
<b>Desvio Padrão</b>	5,215	0,323	0,187	0,368	4,259	1,973	0,104
<b>Máximo</b>	43,339	2,521	1,035	2,517	32,909	12,030	0,740
<b>Mínimo</b>	23,711	1,244	0,303	1,022	16,260	4,691	0,198

\* (µm<sup>2</sup>)

Em que,

CT: Comprimento total do corpo;

LC: Largura do corpo;

AC: Área do cinetoplasto;

AN: Área do núcleo;

DNA: Distância anterior ao núcleo;

DNP: Distância posterior ao núcleo;

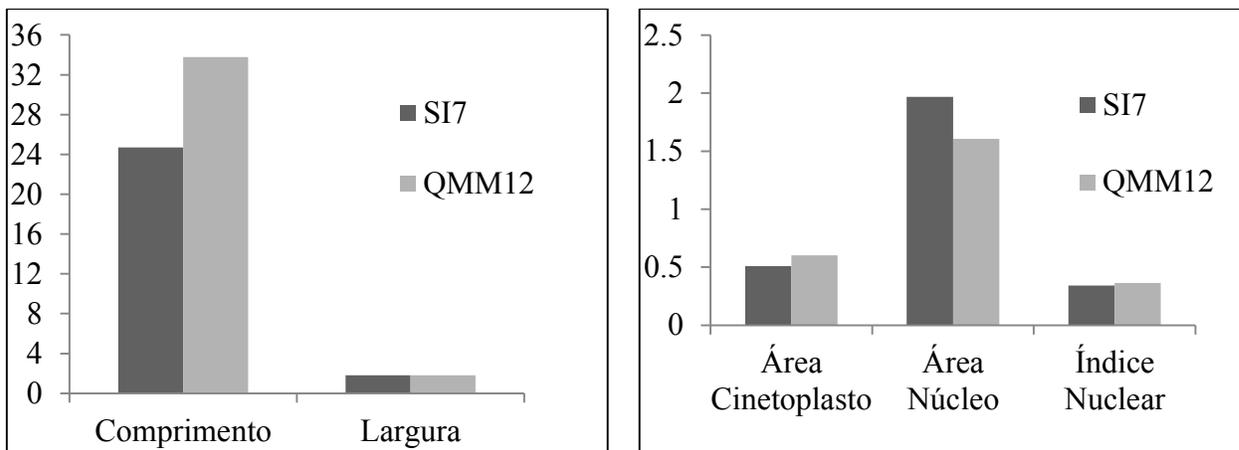
IN: Índice nuclear (IN=DPN/DAN).

**Tabela 10.** Resultados obtidos a partir da mensuração de formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa QMM<sub>12</sub>.

<b>Resultados obtidos - Cepa QMM<sub>12</sub></b>				
<b>CT</b>	<b>LC</b>	<b>AC</b>	<b>AN</b>	<b>IN</b>
Longo	Intermediária	Intermediário	Pequeno	Baixo

– Comparação de formas epimastigotas entre as cepas SI<sub>7</sub> e QMM<sub>12</sub>

A partir dos resultados obtidos foi possível avaliar comparativamente as cepas SI<sub>7</sub> procedente da Bahia e a cepa QMM<sub>12</sub> do Rio Grande do Sul (Figura 10).



**Figura 10.** Resultado da morfometria efetuada com 30 formas epimastigotas de *T. cruzi* para as cepas SI<sub>7</sub> e QMM<sub>12</sub> referente ao comprimento total, largura do corpo, área do cinetoplasto, área do núcleo e índice nuclear.

#### 4.2. Estudo das formas Epimastigotas por meio da cinética de crescimento em meio LIT

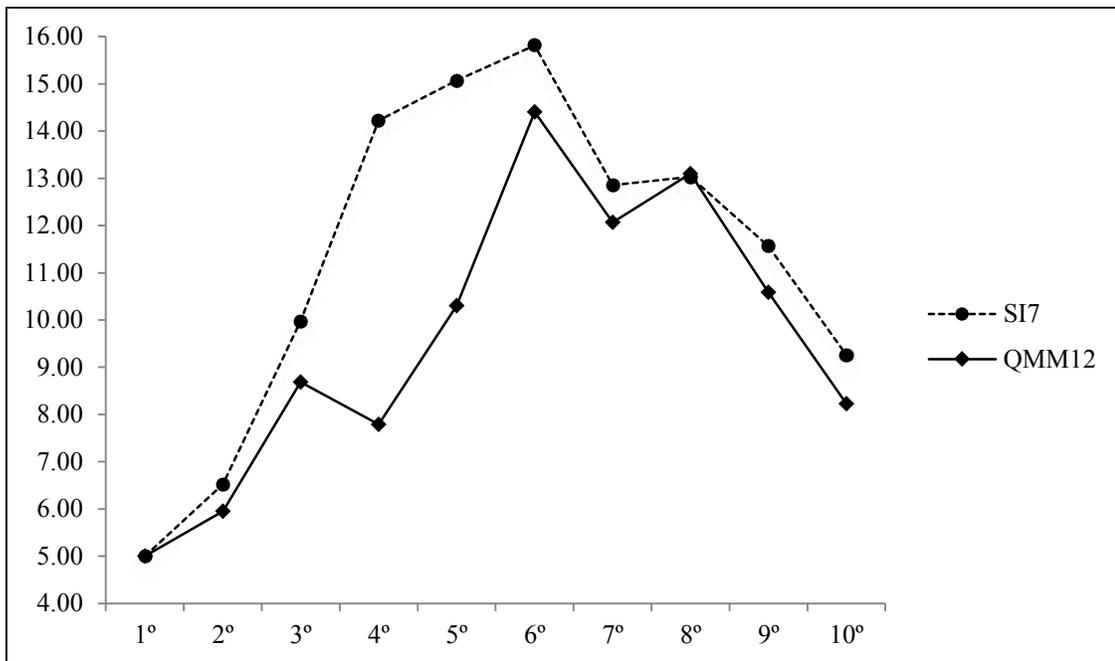
Os resultados obtidos da leitura feita em triplicata das cepas SI<sub>7</sub> e QMM<sub>12</sub> encontram-se na Tabela 11 e 12, respectivamente, assim como na Figura 11.

**Tabela 11.** Resultado da curva de crescimento da cepa SI<sub>7</sub> cultivada em meio LIT.

<b>Cepa SI<sub>7</sub></b>	<b><i>T. cruzi</i> contados - 1<sup>a</sup> curva</b>	<b><i>T. cruzi</i> contados - 2<sup>a</sup> curva</b>	<b><i>T. cruzi</i> contados - 3<sup>a</sup> curva</b>	<b>Média</b>	<b>Parasitas.10<sup>6</sup></b>
1º dia	200	200	200	200	5,00
2º dia	267	266	250	261,00	6,53
3º dia	363	439	396	399,33	9,98
4º dia	541	701	465	569,00	14,23
5º dia	548	586	675	603,00	15,08
6º dia	778	551	569	632,67	15,82
7º dia	613	504	426	514,33	12,86
8º dia	695	477	392	521,33	13,03
9º dia	496	509	383	462,67	11,57
10º dia	353	381	377	370,33	9,26

**Tabela 12.** Resultado da curva de crescimento da cepa QMM12 de *T. cruzi* cultivada em meio LIT.

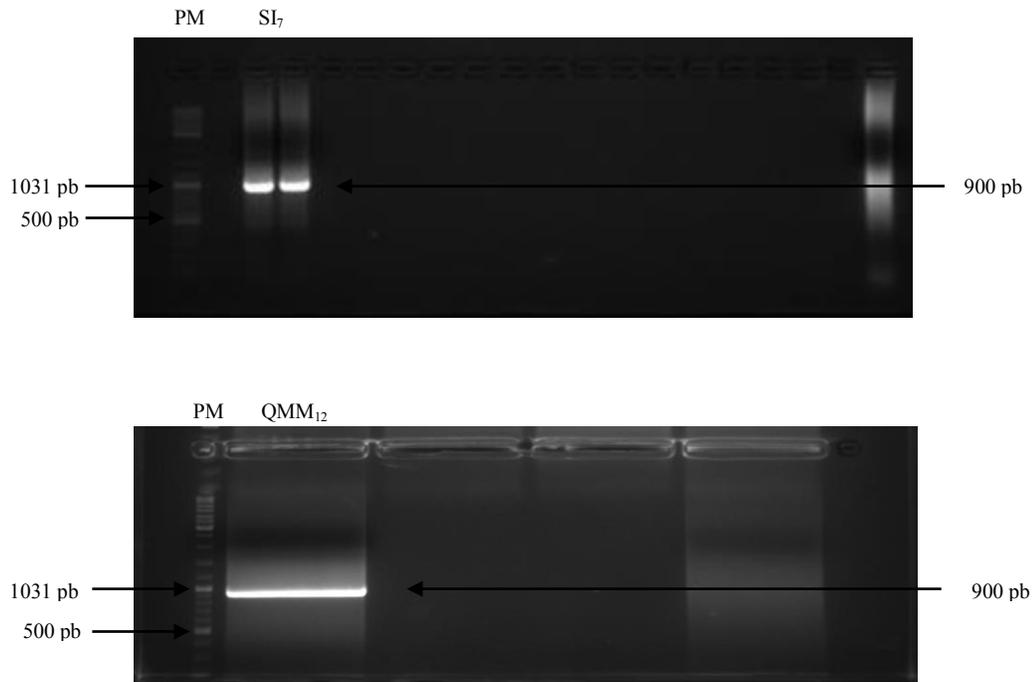
<b>Cepa QMM<sub>12</sub></b>	<b><i>T. cruzi</i> contados - 1<sup>a</sup> curva</b>	<b><i>T. cruzi</i> contados - 2<sup>a</sup> curva</b>	<b><i>T. cruzi</i> contados - 3<sup>a</sup> curva</b>	<b>Média</b>	<b>Parasitas.10<sup>6</sup></b>
1º dia	200	200	200	200	5,00
2º dia	263	223	228	238,00	5,95
3º dia	298	450	294	347,33	8,68
4º dia	309	341	285	311,67	7,79
5º dia	330	583	323	412,00	10,30
6º dia	801	515	413	576,33	14,41
7º dia	487	606	355	482,67	12,07
8º dia	406	687	479	524,00	13,10
9º dia	392	486	392	423,33	10,58
10º dia	312	356	319	329,00	8,23



**Figura 11.** Curva de crescimento em meio LIT das cepas QMM12 e SI7 de *T. cruzi* realizada em triplicata durante dez dias consecutivos.

#### 4.3. Estudo molecular das cepas de *Trypanosoma cruzi* por meio do posicionamento da região V7V8 do gene SSU rRNA

Após a extração de DNA genômico foi feita a amplificação da região V7V8 do gene SSU rRNA por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) e, posterior, eletroforese em gel de agarose. A amplificação do fragmento de DNA correspondente à região V7-V8 do gene SSU rDNA foi feita utilizando primers descritos por Maia da Silva et al., 2004b, o que gerou um fragmento de aproximadamente 900 pb. A Figura 12 demonstra que a região de interesse foi amplificada com sucesso. Dessa forma, foi possível dar seguimento aos próximos experimentos com êxito.

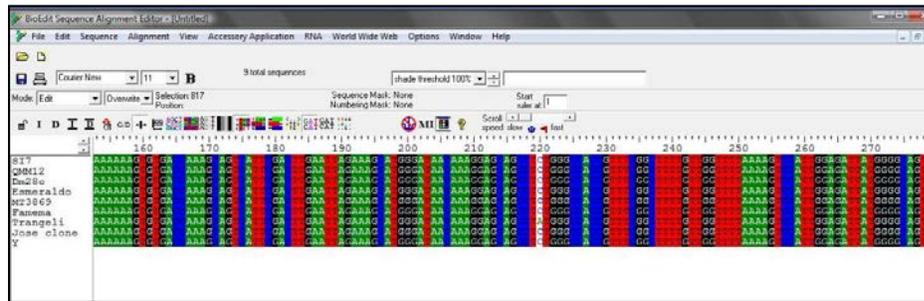


**Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) para visualização da banda com aproximadamente 900 pb referente a cepa SI7.

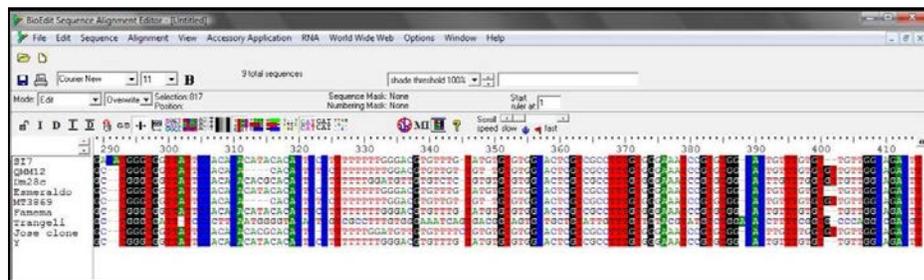
Após a amplificação, a região desejada foi cortada do gel e o DNA extraído da agarose em coluna Spin X (Costar®). Os produtos purificados foram submetidos ao sequenciamento.

As sequências foram analisadas no programa Seqman do programa DNASTar (Nicholas et al., 1997). Outras sequências foram obtidas do GeneBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e, então, alinhou-se essas sequências a partir do programa BioEdit (Figura 13) e a árvore filogenética do tipo *Neighbor-Joining* feita a partir do programa MEGA 5.1 (Figura 14).

As cepas utilizadas e os seus respectivos números de acesso encontram-se na Tabela 13.

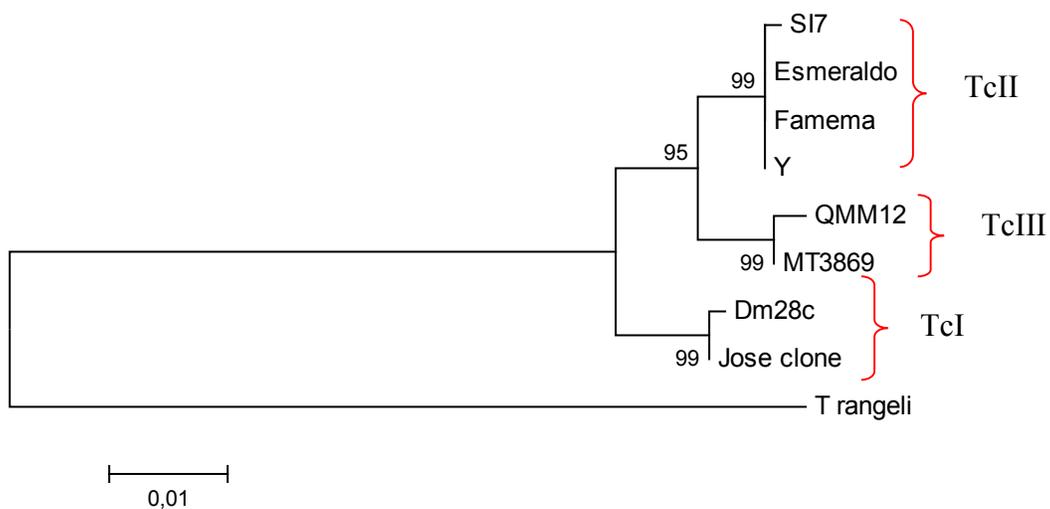


(a)



(b)

**Figura 13.** Alinhamento das sequências de nucleotídeos no programa BioEdit. Região não variável (a) e região variável (b).



**Figura 14.** Árvore filogenética do tipo Neighbor-Joining usada para expressar o alinhamento das sequências do gene SSU rRNA de oito cepas de *T. cruzi* e uma cepa que encontra-se em grupo externo, *Trypanosoma rangeli*. Os números correspondem a 10000 réplicas no índice de *bootstrap*.

**Tabela 13.** Isolados de tripanossomatídeos e seus respectivos números de acesso do GenBank.

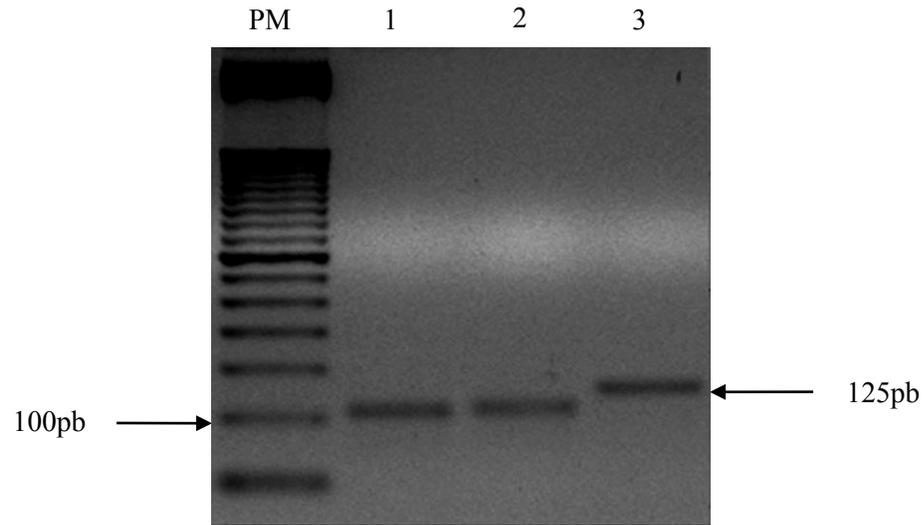
<b>Isolados</b>	<b>DTUs</b>	<b>Número de Acesso no <i>GenBank</i></b>
Jose Clone	TcI	AY785573.1
Dm28c	TcI	AF245382.1
Famema	TcII	AY785584.1
Esmeraldo	TcII	AY785564.1
Y	TcII	AF301912.1
SI7	TcII	-
QMM12	TcIII	-
MT3869	TcIII	AF303660.1
<i>T rangeli</i>	-	AJ012417.1

#### **4.4. Genotipagem das cepas de *Trypanosoma cruzi* pelos genes 24S $\alpha$ rRNA, HSP60 e GPI**

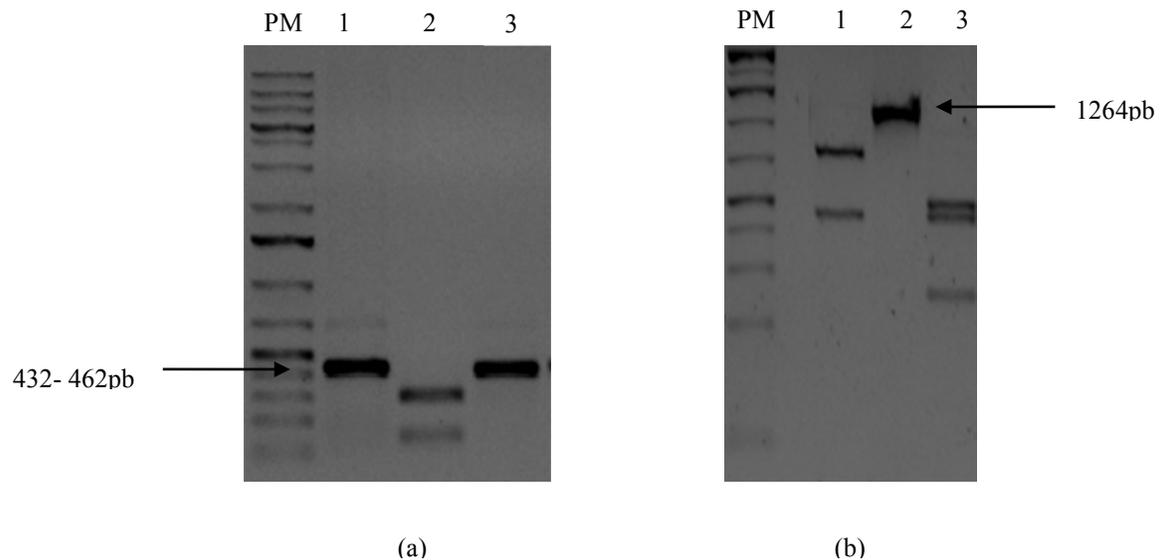
A amplificação dos genes 24S $\alpha$  rRNA, HSP60 e GPI por meio da técnica de PCR-RFLP resulta em produtos de 110-125pb, 432-462pb e 1264pb, respectivamente (Lewis et al, 2009; Zingales et al, 2009).

– Cepa SI7

Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 15 e 16 (a,b).



**Figura 15.** Análise da genotipagem da fração do gene 24S $\alpha$  rRNA da cepa SI7 de *T.cruzi*. A cepa SI7 é representada pela coluna 3.



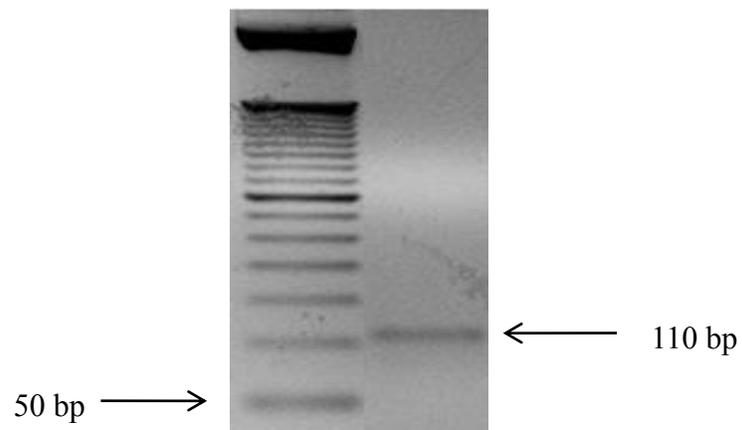
**Figura 16.** Análise da digestão da fração do gene HSP60 (a) e GPI (b) da cepa SI7 de *T.cruzi*. A cepa SI7 é representada pela coluna 3.

Os resultados obtidos mostraram que a PCR do gene 24S $\alpha$  rRNA resultou em um produto de 125pb. A digestão do gene HSP60 resultou em uma banda, e a digestão do gene GPI em três

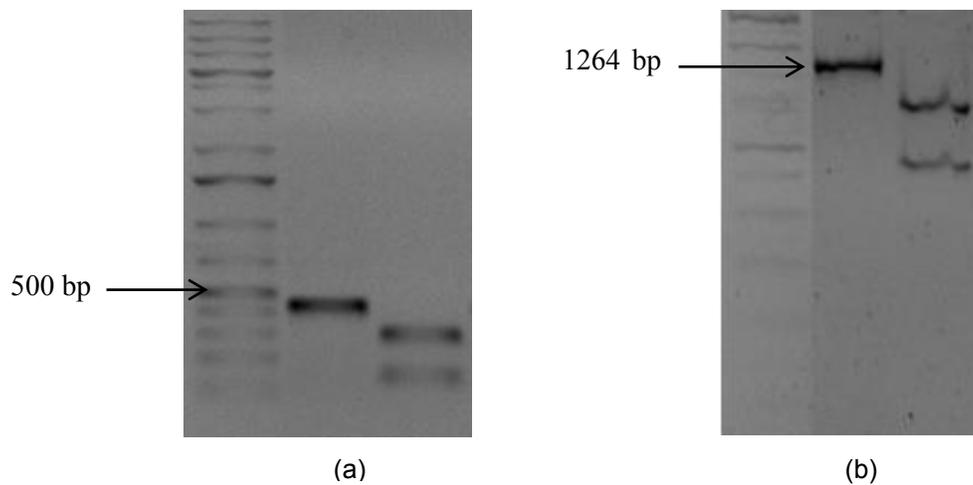
bandas. Assim, pela análise da Figura 3 descrita por Lewis, 2009 pode-se concluir que a cepa SI7 pertence à DTU TcII.

– Cepa QMM12

Os resultados obtidos encontram-se na Figura 17 e 18 (a,b).



**Figura 17.** Análise da genotipagem da fração do gene 24S $\alpha$  rRNA da cepa QMM12 de *T.cruzi*.



**Figura 18.** Análise da digestão da fração do gene HSP60 (a) e GPI (b) da cepa QMM12 de *T.cruzi*.

Pelos resultados obtidos percebe-se que a PCR do gene 24S $\alpha$  rRNA resultou em um produto de 110pb. A digestão do gene HSP60 resultou em duas bandas, e a digestão do gene GPI resultou também em duas bandas. Assim, pela análise da Figura 3 descrita por Lewis, 2009 pode-se concluir que a cepa QMM12 pertence à DTU TcIII.

#### **4.5. Infecção de macrófagos da linhagem J774**

Foi realizada a contagem de 200 macrófagos e as formas amastigotas interiorizadas tanto no tempo de 24 horas quanto no de 72 horas. A partir desses resultados foi possível determinar o tempo de duplicação de cada cepa a partir da fórmula descrita por Jawetz et al., 1991 (Tabela 6).

$$T_d = \frac{\ln 2 \cdot (t_1 - t_0)}{2,3 \log (N_1 - N_0)}$$

Em que,

T<sub>d</sub> = tempo de duplicação

t<sub>1</sub> = tempo final de observação

t<sub>0</sub> = tempo inicial de observação

N<sub>1</sub> = número de amastigotas por celular após 72 horas

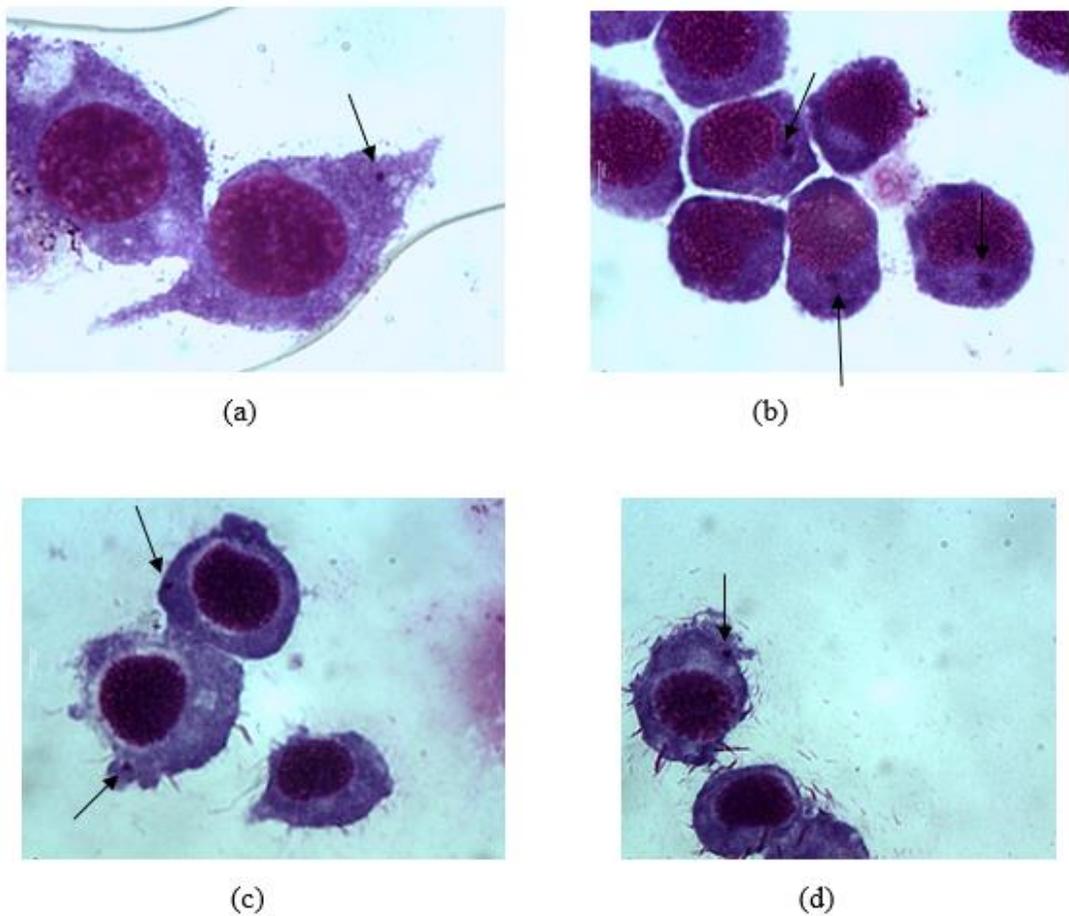
N<sub>0</sub> = número de amastigotas por célula após 24 horas

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 14.

**Tabela 14.** Número de amastigotas contados em 24 horas e 72 horas, taxa de multiplicação de amastigotas/macrófagos e o tempo de duplicação em dias.

	24h	72h	Taxa de multiplicação (amastigotas/macrófagos)	Tempo de duplicação (dias)
SI <sub>7</sub>	204	232	1,14	10,79
QMM <sub>12</sub>	220	348	1,58	3,03

As fotomicrografias obtidas das formas amastigotas das cepas QMM12 e SI7 encontradas em macrófagos da linhagem J774 encontram-se na Figura 19.



**Figura 19.** Fotomicrografias de formas amastigotas das cepas QMM12 (a, b) e SI7 de *T. cruzi* (c, d) interiorizadas em macrófagos da linhagem J774. As setas indicam as formas amastigotas.

Pode-se perceber que a cepa SI7 demanda mais tempo para se multiplicar em macrófagos da linhagem J774 do que a cepa QMM12.

## 4. Discussão

### 5.1. Estudo Morfológico de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Um estudo biométrico realizado por Rossi, 2008<sup>7</sup> de formas epimastigotas de *T. cruzi* e seus resultados foram utilizados neste trabalho como padrão numérico. Desta forma, foi utilizado como parâmetro a largura, comprimento total, área do núcleo, área do cinetoplasto e índice nuclear. As cepas SI<sub>7</sub> e QMM<sub>12</sub> mensuradas mostraram respectivamente formas intermediária/longa para comprimento total, intermediária/intermediária para largura, pequeno/intermediário para área do cinetoplasto, intermediário/pequeno para área do núcleo e baixo/baixo para índice nuclear.

Ao mensurar formas epimastigotas de duas cepas (SI<sub>5</sub> e SI<sub>8</sub>) isoladas de *Triatoma sordida* coletados no município de Santo Inácio, Bahia por João Aristeu da Rosa, 2004 e uma cepa (SIGR<sub>3</sub>) isolada por xenodiagnóstico de um gato também no município de Santo Inácio, Bahia por João Aristeu da Rosa, 2007 (comunicação pessoal), Rimoldi et al. (2011) perceberam que as três cepas apresentaram índice nuclear baixo; SI<sub>5</sub> e SI<sub>8</sub> largura intermediária e SIGR<sub>3</sub> largura larga; e SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> comprimento curto e SI<sub>5</sub> comprimento intermediário.

A partir dos dados obtidos neste trabalho e os dados observados por Rimoldi et al. em 2011, é possível perceber que mesmo em cepas isoladas da mesma área endêmica (Santo Inácio, Bahia) ocorre polimorfismo entre as cepas. Assim como Silva em 1959 já havia demonstrado que em todas as fases evolutivas da infecção experimental, existe a predominância de uma das diferentes formas descritas para *T. cruzi*, embora apresentem dimorfismo, em maior ou menor grau. Porém não se sabe se esse polimorfismo expressa o comportamento biológico da cepa ou se reflete a existência de um “complexo” morfológico como ocorre com outros tripanossomas (Brenner e Chiari, 1963).

## 5.2. Estudo biológico da curva de crescimento em meio LIT de *Trypanosoma cruzi*

Em 1965, Brener e Chiari mostraram diferenças no comportamento em meio LIT de quatro cepas isoladas de casos humanos e três de *Triatoma infestans*. Diferenças na curva de crescimento também foram demonstradas em 1990 por Barr após a análise de amostras isoladas de cão, gambá e tatu silvestres.

Em 2011, Rimoldi et al. demonstraram essas diferenças ao estudar quatro cepas. Duas isoladas de *Triatoma sordida* (SI<sub>5</sub> e SI<sub>8</sub>) coletados no município de Santo Inácio; uma cepa (SIGR<sub>3</sub>) isolada por xenodiagnóstico de um gato também no município de Santo Inácio, isoladas na Bahia por Rosa, 2007 e a cepa Y isolada de um caso humano por Silva & Nussenzweig em 1953. Rimoldi, 2011 et al. mostraram que as cepas SI<sub>5</sub> e SIGR<sub>3</sub> apresentaram pico de crescimento no 8º dia e as cepas SI<sub>8</sub> e Y apresentaram pico de crescimento no 7º dia.

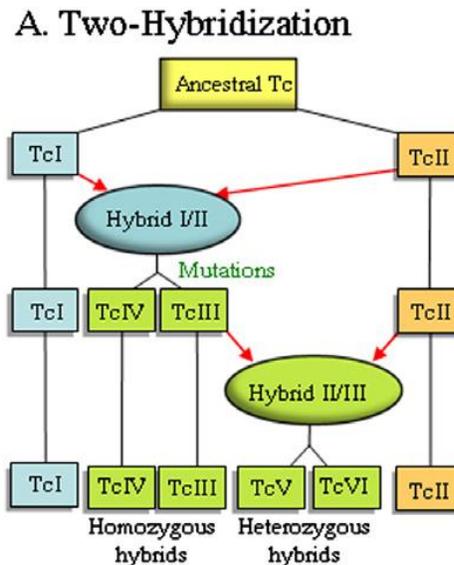
Os dados obtidos pelos autores acima suportam os resultados encontrados neste trabalho no qual ambas as cepas SI<sub>7</sub> e QMM<sub>12</sub> apresentaram pico de crescimento no 6º dia com 15,82.10<sup>6</sup> parasitos/mL e 14,41.10<sup>6</sup> parasitos/mL, respectivamente. Demonstrando, assim que realmente há uma diferença entre o crescimento em meio de cultura em diferentes cepas.

## 5.3. Estudo molecular das cepas de *Trypanosoma cruzi* por meio do posicionamento da região V7V8 do gene SSU rRNA

### – Análise dos resultados obtidos em relação à hibridização das linhagens de *T. cruzi*

Sabe-se que *T. cruzi* é predominantemente diplóide e se divide por fissão binária (El-Sayed et al., 2005), entretanto há evidências da heterogenicidade do parasito por meio do estudo de genes separados (Chapman et al., 1984; Bogliolo et al., 1996; Carrasco et al., 1996; Souto et al., 1996; Brisse et al., 1998).

Há um modelo chamado ‘Two-Hybridization’ (Westenberger et al., 2005) que defende a ideia de que ocorreu uma hibridização entre TcI e TcII a fim de produzir TcIII e TcIV, seguido de uma segunda hibridização entre TcII e TcIII para a produção de TcV e TcVI, como é mostrado na Figura 20.



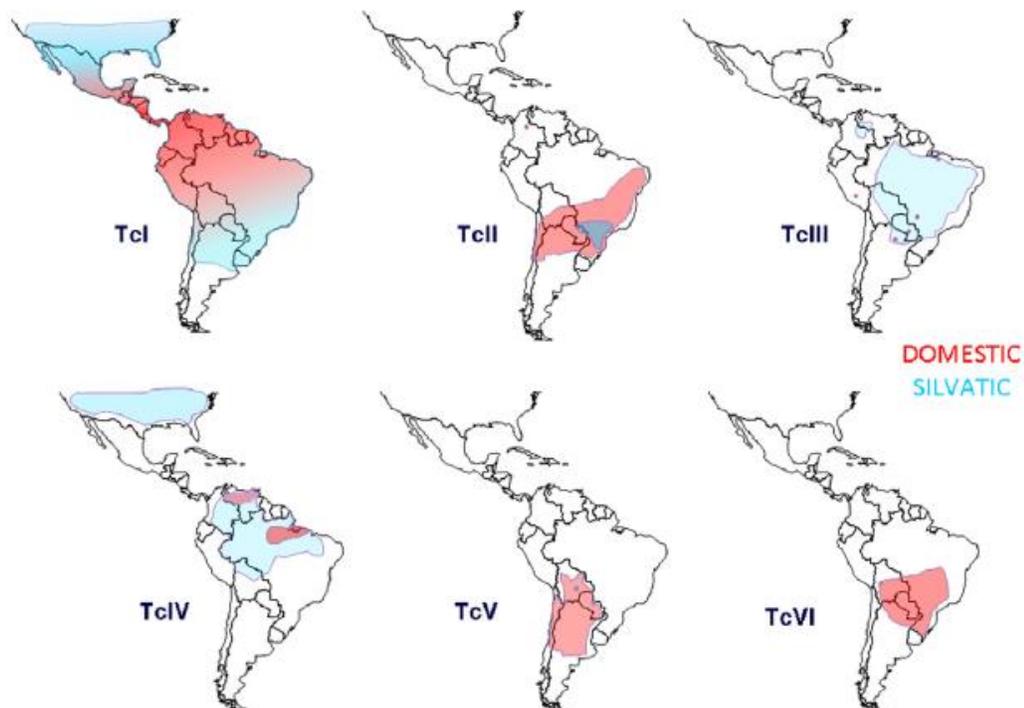
**Figura 20.** Modelo “Two-Hybridization” que evidencia as trocas genéticas durante a evolução de *T. cruzi*. Os retângulos indicam os diferentes “DTUs”. As fusões entre duas células e a troca de material genético é indicado pelas caixas ovais. As linhagens mitocondriais são evidenciadas pelas diferentes cores (Zingales, B. et al., 2012).

A partir da análise da árvore filogenética é possível concluir que assim como as cepas Esmeraldo, Famema e Y, a cepa SI<sub>7</sub> é pertencente à linhagem TcII. Enquanto que a cepa QMM<sub>12</sub> é pertencente à linhagem TcIII, assim como a a cepa MT3869.

A análise da árvore também permite corroborar o modelo “Two-Hybridization”, visto que entre TcI e TcII ocorreu uma ramificação, identificando, dessa forma, a hibridização entre TcI e TcII que deu origem a TcIII. Ou seja, TcII é provavelmente mais próximo filogeneticamente de TcIII do que de TcI.

– Eco-epidemiologia dos DTUs

Zingales, B. et al., 2012 discutiu associações entre vetor, ecótopo e hospedeiro e os seis tipos de “DTUs”. Dessa forma, demonstrou que há uma relevância na compreensão entre os diferentes DTUs e a eco-epidemiologia da doença de Chagas, como mostra a Figura 21. Porém, não é possível discernir totalmente a história ecológica e os DTUs devido ao grande número de amostras.



**Figura 21.** Distribuição aproximada dos DTUs de *T. cruzi* no ciclo doméstico e silvestre. (Zingales, B. et al., 2012).

A cepa SI<sub>7</sub> isolada de *Triatoma sordida* coletado no município de Santo Inácio - BA foi identificada como pertencente à linhagem TcII, estando de acordo com Zingales, B. et al., 2012 em que refere TcII como sendo encontrada nas regiões sul e central da América do Sul, porém sua extensão ainda não está bem definida.

Zingales, B. et al., 2012 também admitem que TcIII encontra-se na América do Sul, porém não abrange a região do Rio Grande do Sul. Porém, a cepa QMM<sub>12</sub> de *T. cruzi* isolada de *T. rubrovaria* coletado no município de Quaraí – RS foi identificada como pertencente à linhagem TcIII, fato que não está presente no trabalho de Zingales et al., 2012.

Portanto, como foi demonstrado no trabalho realizado não é possível discernir totalmente a história ecológica e os DTUs de *T. cruzi* devido ao grande número de amostras e sua complexidade biológica e molecular (Zingales, B. et al., 2012).

– Relação entre DTUs e patologia da doença de Chagas

Além da análise ecológica entre as diferentes linhagens de *T. cruzi*, a análise dos DTUs de *T. cruzi* e a patologia da doença de Chagas são de grande importância, pois alguns autores defendem a ideia de que há uma associação entre a diversidade genética do parasito e suas propriedades biológicas, incluindo comportamento “*in vitro*” e “*in vivo*”, sensibilidade à fármacos, transmissão por meio de vetor, patogenicidade (habilidade de produzir lesões no tecido e a ter respostas imunológicas) e virulência (capacidade de multiplicação do parasito) (Revollo et al., 1998).

Em áreas endêmicas, a principal causa de mortalidade é a cardiomiopatia crônica que afeta aproximadamente 30% dos pacientes e, aproximadamente, 3% desenvolverão alterações no trato gastrointestinal (Dias, 2006) o que consiste em um progressivo alargamento do esôfago ou do cólon causado por uma inflamação crônica. Assim, a grande variedade das manifestações da doença é atribuída ao conjunto de interações complexas acerca da genética do parasito, da resposta imunológica do hospedeiro e de fatores ambientais (Macedo et al., 2004).

Portanto, uma possibilidade para identificar as distintas linhagens de *T. cruzi* seria tentar estabelecer a correlação entre as apresentações clínicas da doença e os diferentes DTUs (*Discrete Typing Units*). Porém, ainda não há nenhuma associação comprovada até o presente momento (Zingales, B. et al., 2012).

Alguns autores citam que as cepas TcI de *T. cruzi* inclui cardiomiopatia chagásica e em hospedeiros imunodeprimidos pode levar à meningoencefalite (Zingales, B. et al., 2012). Outros mencionam que TcIII está ausente na infecção crônica, entretanto pode ser encontrada em cães domésticos no Paraguai e Brasil e no peridomicílio em *Triatoma rubrofasciata* no Rio Grande do Sul, Brasil (Yeo et al., 2005; Miles et al., 2009; Câmara et al., 2010).

O mapeamento filogenético de expressão gênica (diversidade proteômica) entre os seis DTUs de *T. cruzi* também é importante, como mostraram Telleria et al., 2010. Os autores identificaram diversas proteínas com DTUs específicas. Porém, estes estudos indicam extensa diversidade fenotípica entre eles, dificultando a identificação de determinantes genéticos de patogenicidade e virulência, exigindo, assim, mais pesquisas acerca dos diferentes tipos de DTUs e suas correlações.

Dessa forma, se faz necessário posteriores experimentos com as cepas SI<sub>7</sub> e QMM<sub>12</sub> de modo a estabelecer uma correlação entre os diferentes DTUs e as apresentações clínicas da doença de Chagas.

#### **5.4. Genotipagem das cepas de *Trypanosoma cruzi* pelos genes 24S $\alpha$ rRNA, HSP60 e GPI**

Neste trabalho foi estudado também as diferentes DTUs (*Discrete Typing of Unit*) por meio do método de Lewis, 2009 e pode-se perceber que a cepa QMM12 pertence a TcIII e a cepa SI7 pertence a TcII.

A fim de avaliar os resultados obtidos, compara-se com o experimento em que foi determinada as DTUs das cepas QMM12 e SI7 pelo posicionamento da região V7V8 do gene SSU rRNA, conforme metodologia de Lima, 2011. A partir da análise dessa sequência também foi possível observar que a cepa QMM12 pertence a TcIII e a cepa SI7 a TcII.

Desse modo, a análise de ambas as metodologias utilizadas forneceu o mesmo resultado quanto à genotipagem das cepas QMM12 e SI7 que foram objeto de estudo. Entretanto sabe-se que o sequenciamento de um gene é mais confiável que a expressão dos genes e sua digestão, já que em todas as cepas de *T. cruzi* podem ocorrer pequenas regiões variáveis, mas que podem ser diferenciadas por meio das DTUs, como ocorreu com TcIII, TcIV, TcV e TcVI, que são consideradas cepas híbridas (Zingales, 2012).

Rimoldi et al., 2011 ao estudarem as cepas SI8 e SIGR3 de *T. cruzi* percebeu que pertencem a TcII. Essas cepas também foram isoladas da mesma região de Santo Inácio – BA, mas ao comparar os dados obtidos por Rimoldi et al., 2011 e os dados obtidos para a cepa SI7 é possível afirmar que apesar de pertencerem à mesma DTU apresentam grande diferença em seu comportamento biológico. Zingales, et al., 2012 discutiram associações entre vetor, hospedeiro e os seis tipos de “DTUs” e afirmaram que é relevante estabelecer a relação entre os diferentes DTUs e a eco-epidemiologia da doença de Chagas. Entretanto, ainda não é possível discernir totalmente a história ecológica e as DTUs devido ao grande número de amostras existentes.

A análise do comportamento biológico das diferentes linhagens de *T. cruzi*, a análise dos DTUs de *T. cruzi* e a patologia da doença de Chagas são de grande importância, pois alguns autores defendem a ideia de que há uma associação entre a diversidade genética do parasito e suas propriedades biológicas, incluindo comportamento “*in vitro*” e “*in vivo*”, sensibilidade a fármacos, transmissão por meio de vetor, patogenicidade (habilidade de produzir lesões no tecido e respostas imunológicas) e virulência (capacidade de multiplicação do parasito) (Revollo et al., 1998).

### 5.5. Infecção de macrófagos da linhagem J774

Outro fato importante observado neste trabalho é a taxa de infecção em macrófagos. Percebeu-se que a cepa QMM12 possui uma taxa de infecção de 3,03 dias, enquanto a cepa SI7 possui taxa de infecção de 10,79 dias. Dessa maneira, concluiu-se que a cepa SI7 apesar de apresentar baixa quantidade de formas tripomastigotas sanguíneas em camundongos possui capacidade de infectar células. Percebe-se também que a cepa QMM12 possui virulência e patogenicidade maior que a cepa SI7, ao mostrar maior taxa de duplicação em macrófagos, taxa de infecção em camundongos e a morte da maioria deles.

Albuquerque, 2001 observou que quando se isola uma nova cepa de *T. cruzi* ocorre uma variação no comportamento, visto que cada cepa estabelece diferente relação com o hospedeiro vertebrado. Assim, algumas cepas possuem maior virulência e patogenicidade enquanto outras são destituídas de agressividade (Andrade, 1974).

A partir dos dados apresentados, sugere-se que ao longo dos anos as características da cepa isolada podem se modificar, devido à interação entre as subpopulações, beneficiando-se assim de condições do meio de cultura. Há também o fato de que podem ocorrer transformações no comportamento biológico da cepa após repiques sucessivos, em que as condições laboratoriais atuam como meio selecionador (Araújo e Chiari, 1988). Dessa forma, quando se isolam cepas de *T. cruzi* a partir de triatomíneos de uma mesma localidade podem-se obter várias subpopulações e as condições laboratoriais selecionam uma determinada subpopulação. Essa consideração pode justificar o fato da cepa SI7 apresentar comportamento diferente quando comparada às cepas SI8 e SIGR3, estudadas por Rimoldi et al., 2011.

Portanto, este trabalho ao determinar parâmetros biológicos e as DTUs das cepas QMM12 e SI7 de *T. cruzi* contribuiu para o entendimento dos caracteres das distintas cepas de *T. cruzi*.

## 5. Conclusões

- ✓ As formas epimastigotas das cepas SI<sub>7</sub> e QMM<sub>12</sub> apresentaram, respectivamente, comprimento intermediário/longo, largura intermediária/intermediária, área do cinetoplasto pequeno/intermediário, área do núcleo intermediário/pequeno e índice nuclear baixo/baixo. Dessa forma, ao comparar as duas cepas pode-se perceber que os parâmetros obtidos mostraram diferenças no comprimento, área do cinetoplasto e área do núcleo. Enquanto que a largura e o índice nuclear demonstraram parâmetros semelhantes.
- ✓ O estudo da cinética de crescimento demonstrou que ambas as cepas possuem mesmo perfil de crescimento com pico no 6º dia.
- ✓ A caracterização molecular tanto por meio do posicionamento da região V7V8 do gene SSU rRNA quanto pelo estudo dos genes 24S $\alpha$  rRNA, HSP60 e GPI demonstrou que a cepa SI7 pertence ao grupo TcII e a cepa QMM12 pertence ao grupo TcIII.
- ✓ A infecção de *T. cruzi* em macrófagos da linhagem J774 demonstrou que a cepa SI7 possui um tempo de multiplicação de 10,79 dias e a cepa QMM12 de 3,03 dias.
- ✓ A determinação dos parâmetros biológicos de duas cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas dos estados da Bahia e Rio Grande do Sul e a sua comparação com os parâmetros moleculares contribuem para o melhor entendimento dos caracteres do parasito. Esses caracteres podem, no futuro, ter uma relação mais concisa com a infecção no hospedeiro.

## 6. Referências Bibliográficas

ALBUQUERQUE, S.; Considerações relativas ao comportamento biológico de amostras de uma cepa de *Trypanosoma cruzi* obtidas por centrifugação diferencial. **Tese livre-docente**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto, 2001.

ALVES, A. M. B.; ALMEIDA, D. F.; VON GRUGER, W. M. A. Changes in *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA minicircles induced by environmental conditions and subcloning. **J Euk Microbiol**, 41: 415-419, 1994.

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

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlation with clinical data and experimental pathology. **Rev Soc Bras Med Trop**, 30: 27-35, 1997.

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

ANDRADE, Z. A. Patologia da Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, 2000. M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.177-2000.

ANONYMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90<sup>th</sup> anniversary of the discovery of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 94: 429-432, 1999.

ARAÚJO, S. M.; CHIARI, E. Caracterização biológica de clones de cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 83(2):175-181, 1988.

BARR, S. C.; DENNIS, V. A.; KLEI, T. R. Growth characteristic in axenic and cell cultures, protein profiles, and zymodeme typing of three *Trypanosoma cruzi* isolates from Louisiana mammals. **J. Parasitol**, v. 76, p. 631-638, 1990.

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

BOGLIOLO, A. R.; LAURIA-PIRES, L.; GIBSON, W. C.; Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi* evidence of genetic recombination. **Acta Tropica**. 61,31-40, 1996.

BRENER, Z. Comparative studies of *Trypanosoma cruzi*. **Ann Trop Med Parasit Liverpool**, v.59, n.1, p. 19-25, 1965.

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

BRENER, Z.; The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in blood stream of normal and imune mice. **Ann Tro Med Parasitol**, 63: 215-220, 1969.

BRISSE, S.; BARNABE, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal for Parasitology**, 30: 35-44, 2000.

BRISSE. S.; BARNABÉ, C. BAÑULS, A. L.; SIDIBE, I.; NOEL, S.; TYBAYRENC, M. A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Mol. Biochem. Parasitol.** 92, 253–263, 1998.

BRUMPT, E. *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lecticularis*, *Cimez boueti* et *Ornithodoros moubata*. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**. v. 5, p, 360-367, 1912.

CÂMARA, A.C.J., VARELA-FREIRE, A.A., VALADARES, H.M.S., MACEDO, A.M., D'AVILA, D.A., MACHADO, C.R., et al. Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. **Acta Trop.** 115, 205–211. 2010.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Instituto de Medicina Tropical**, 4: 93-100, 1964.

CARNEIRO, H.; ROMANHA, A. J.; CHIARI, E. Biological characterizations of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 86: 387-393, 1991.

CARNEIRO, M.; CHIARI, E.; GONÇALVES, A. M.; DA SILVA, A. A.; PEREIRA, C. M.; MOREL, C. M.; ROMANHA, A. J. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. **Acta Tropica**, 47: 35-45, 1990.

CARRASCO, H. J.; FRAME, I. A.; VALENTE, S. A.; MILES, M. A. Genetic Exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 54, 418 – 424, 1996.

CDC (Centers for Disease Control & Prevention). Division of Parasitic. Laboratory identification of Parasites of Public Health Concern. National Center for infectious Diseases, DPDx Identification and Diagnosis of Parasites of Public Health Concern. Disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>. Acesso em 09/09/2011.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1: 159-218, 1909.

CHAPMAN, M. D.; BAGGALEY, R. C.; GODFREYFAUSSET, P. F.; MALPAS, T. J.; WHITE, G.; CANESE, J.; MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco – isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. **J. Protozool.** 31, 482-486, 1984.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Outlook**, 2010.

CORTEZ, A. P.; VENTURA, R. M.; RODRIGUES, A. C.; BATISTA, J. S.; PAIVA, F.; ANEZ, N. et al. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitol**, 133(Pt2): 159-1669, 2006.

DE SOUZA, A. P. et al. Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benznidazole chemotherapy. **Parasitology**, v.86, n.10, p. 800-808, 2000.

DEANE, M. P.; JANSEN, A. M.; MANGIA, R. H. R.; GONÇALVES, A. M.; MOREL, C. M. Are our laboratory "strain" representative sample of *Trypanosoma cruzi* population that circulate in nature? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 79 (Suppl.): 19-24, 1984a.

DEANE, M. P.; MANGIA, R. H. R.; PEREIRA, N. M.; GONÇALVES, A. M.; MOMEN, H.; MOREL, C. M. *Trypanosoma cruzi*: strain selection by different schedules of mouse passage of initial mixed infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 79: 495-497, 1984b.

DIAS, E. e FREITAS FILHO, L. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum*. **Mem do Inst Oswaldo Cruz**, v.38, n.3, 1943.

DIAS, J.C.P. The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). **Ann. Int. Med.** 144, 772–774, 2006.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N. , et al., The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**. 309, 409-415, 2005.

FERNANDES, O.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; PEREIRA, J. B.; FERNANDES, N. C.; JUNQUEIRA, A. C.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. B.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence. **Am J Trop Med Hyg**, 58: 807-811, 1998.

FERREIRA, R. C.; CAMPANER, M.; VIOLA, L. B.; TAKATA, C. S.; TAKEDA, G. F.; TEIXEIRA, M. M. G.; Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. **Parasitol**, 134: 1623-1638, 2007.

FERREIRA, R. C.; DE SOUZA, A. A.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S.; BARRET, T. V.; SHAW, J. J.; TEIXEIRA, M. M. G.; A Phylogenetic Lineage of Closely Related Trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of Anurans and Sand Flies (Psychodidae, Diptera) Sharing the Same Ecotopes in Brazilian Amazonia. **J Eukaryot Microbiol**, 55: 427-435, 2008.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Fisiologia dos Triatomíneos. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed.; Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.41-47, 2000.

GOMES, M. L.; ROMANHA, A. L.; GONÇALVES, A. M.; CHIARI, E. Stability of isoenzyme and kinetoplast DNA (k-DNA) patterns in successively cloned *Trypanosoma cruzi* populations. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 86: 379-385, 1991.

GONÇALVES, A.; NEHME, N. S.; MOREL, C.; Tripanosomatid characterization by schisodeme analysis. In C Morel, **Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual**, 2ª ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 95-109, 1984.

HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular phylogenetics and evolution**, 44(1): 15-25, 2007.

HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R.; GAUNT, M. W.; GIDLEY, J.; GIBSON, C. W. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small ribosomal RNA. **Int J Parasitol**, 34: 1393-1404, 2004.

HERNÁNDEZ, R.; RIOS, P. VALDÉS, A. M.; PIÑERO, D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. **Mol Biochem Parasitol**, 41(2): 207-212, 1990.

HOARE, C. A. E.; BROOM, J. C.; Morphological and taxonomic study on mammalian trypanosomes. IV. Biometrical study of the relationship between *Trypanosoma* e *T. vivax*. **Trans. Royal Soc. Trp. Med. Hyg**, v.31, n.5, p.517-534; 1938.

JAWETZ, E., MELNICK, J.L., ADELBERG, E.A., BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., ORNSTON, L.N. O crescimento, a sobrevivência e a morte de microorganismos. Microbiologia médica. 18ª Edição Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

LEWIS, M. D.; MA, J.; YEO, M.; CARRASCO, J. H.; LLEWELLYN, S. M.; MILES, A.M. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 81, 104-109, 2009.

LIMA, L. Diversidade morfológica, biológica e genética e relações filogenéticas de tripanossomas de morcegos do Brasil e Moçambique (África). **Tese de Doutorado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)**, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2011.

LUQUETTI, A. O. et al. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 80: 462-470, 1986.

MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 99: 1-12, 2004.

MACEDO, A. M.; PIMENTA, J.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. I. R.; CHIARI, E.; ZINGALES, B.; PENA, S. D. J.; OLIVEIRA, R. P. Usefulness of microsatellites typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 96: 407-413, 2001.

MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R.; ANEZ, N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammal from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitol**, 129(5): 549-561, 2004b.

MARTINEZ, I. Caracterização de duas cepas de *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909 (KINETOPLASTIDAE) isoladas de exemplares de *Triatoma rubrovaria* (BLANCHARD, 1843) (HEMIPTERA, REDUVIIDAE) coletadas em ambiente silvestre. 2004. 85f. **Tese de Doutorado em Análises Clínicas**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

MILES, M. A.; LANHAN, S. M.; DE SOUZA, A. A.; POVOA, D. G. Further enzymatic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 74: 221-242, 1980.

MILES, M. A.; SOUZA, A. 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**, 272: 819-821, 1978.

MILES, M. A.; TOYE, P. J.; OSWALF, S. C.; GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 71: 217-225, 1977.

MILES, M.A., LLEWELLYN, M.S., LEWIS, M.D., YEO, M., BALEELA, R., FITZPATRICK, S., et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. **Parasitology** 136, 1509–1528, 2009.

MOREL, C. M.; 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**, 77: 6810-6814, 1980.

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

NETO, V. A. Chagas disease centenary. **Revista Saúde Pública**, 43(2): 381-2, 2009.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. J; DEERFIELD, D. W. Gene DOC: Analysis and visualization of genetic variation. **EMBNEW News**, 4:14, 1997.

OLIVEIRA, R. P.; BROUDE, N. E.; MACEDO, A. M. CANTOR, C. R.; SMITH, C. L. PENA, S. D. J. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proc Natl Acad Sci, USA**, 95: 3776-3780, 1998.

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**, 64(Suppl.I): 65-70, 1999.

PEARSON, K. On the probability that two independent distributions of frequency are really samples of the same population, with special reference to recent work on the identity of trypanosome strains. **Biometrika**, v.10, p.85-143, 1914.

PINTO, C. *Tripanosomiasis Cruzi* (Doença de Carlos Chagas) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, Rio de Janeiro, v.37, n.4, p.443-537, 1942.

REVOLLO, S.; OURY, B.; LAURENT, J.P.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; CARRIERE, V.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. **Exp. Parasitol.** 89, 30–39, 1998.

RIMOLDI, A. et al. Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sordida* (Stal), 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat. **Parasitology**, v.138, p. 1 – 8, 2011.

RODRIGUES, A. C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; TEIXEIRA, M. G. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, 132: 215-224, 2006.

ROSA, J. A. da. et al. Isolation of *Trypanosoma cruzi* strains from *Triatoma sordida* collected in peridomestic environment in Santo Inácio, Bahia. In: **Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology**, Caxambú, MG, p. 156-156, 2004.

ROSSI, L. R. L. Estudo biométrico de formas epimastigotas e tripomastigotas de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi*, CHAGAS 1909 (KINETOPLASTIDAE, TRYPANOSOMATIDAE) **Dissertação de Mestrado em Análises Clínicas**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp, Araraquara, 2007.

SILVA, L. H. P. da. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, 1: 99-118, 1959.

SILVA, L. H. P. da; NUSSEINZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clínica et Biológica**, v. 20, n. 3, p. 191-208, 1953.

SILVEIRA, C. A. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 16 (Sup. 2): 35-42, 2000.

SOGIN, M. L.; ELWOOD, H. J.; GUNDERSON, J. H.; Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, 83(5):1383-1387, 1986.

SOUTO, R. P.; et al. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 83: 141-152, 1996.

STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; SCHOFIELD, C. J.; GIBSON, W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Adv Parasitol**, 48: 1-56, 2001.

TELLERIA, J., BIRON, D.G., BRIZARD, J.P., DEMETTRE, E., SEVENO, M., BARNABÉ, C., AYALA, F.J., TIBAYRENC, M.. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 107, 20411–20416, 2010.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal Parasitology**, v.1, p. 472-481, 2001.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 16 (Sup.2): 7-12, 2000.

VIOLA, L. B.; ALMEIDA, R. S.; FERREIRA, R. C.; TAKATA, C. S.; RODRIGUES, A. C.; PAIVA, F.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by ophylogenetic analyses using SSU rRNA and gGAPDH genes. **Parasitology**, 136: 55-65, 2009b.

VIOLA, L. B.; ATTIAS, M.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultra structural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. From *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. **J Eukaryot Microbiol**, 56(6): 594-602, 2009a.

VIOLA, L. B.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S.; FERREIRA, R. C.; FREITAS, R. A.; DUARTE, M. R.; GREGO, K. F.; BARRET, T. V.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G.

Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. **Parasitology**, 135: 595-605, 2008.

WESTENBERGER, S.J.; BARNABÉ, C.; CAMPBELL, D.A.; STURM, N.R.; Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics** 171, 527–543, 2005.

WHO, 2011 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acesso em [09/09/2011](#).

YEO, M., ACOSTA, N., LLEWELLYN, M., SANCHEZ, H., ADAMSON, S., MILES, G.A.J., et al. Origins of Chagas disease: didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **Int. J.Parasitol.** 35, 225–233, 2005.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, n.7, p.1051 - 1054, 2009.

ZINGALES, B.; et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect. Genet. Evol**, doi:10.1016/j.meegid.2011.12.009. 2012.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of r RNA and mini-exon gene sequences. **Int J Parasitol**, 28: 105-112, 1998.

Araraquara, 17 de dezembro de 2015.

---

Larissa Aguiar de Almeida

De acordo,

---

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa