

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GABRIELA ELOISA MAANA WOLLMANN

ESTUDO GENOTÍPICO DE SEIS CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
(KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE) ISOLADAS DE EXEMPLARES DE
RHODNIUS MONTENEGRENSIS, *TRITOMA RUBROVARIA* E *TRITOMA*
SORDIDA (HEMIPTERA, REDUVIIDAE)

ARARAQUARA

2015

GABRIELA ELOISA MAANA WOLLMANN

Estudo genotípico de seis cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas de exemplares de *Rhodnius montenegrensis*, *Triatoma rubrovaria* e *Triatoma sordida* (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.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Parasitologia

Orientador: Prof Dr João Aristeu da Rosa

Co-Orientadora: Dr^a Aline Rimoldi Ribeiro

ARARAQUARA

2015

Dedico este trabalho ao meu avô Chakib que assiste a realização deste sonho de um lugar muito especial e estará sempre presente em meus pensamentos.

Te amo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara pela disponibilidade de recursos e de estrutura laboratorial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, um exemplo de profissional e ser humano. Obrigada pela atenção, carinho, pelas maravilhosas aulas e cuidado especial com a minha Iniciação Científica. Agradeço por ter me concedido esse espaço em seu laboratório e pelos conselhos científicos, textuais e pessoais. Obrigada por dividir as suas histórias e lições de vida comigo.

À minha co-orientadora Dra. Aline Rimoldi Ribeiro, um exemplo de mulher com garra, perseverança e que, apesar de todos os obstáculos, sempre priorizou a sua formação profissional. Muito estudiosa e dedicada ao seu trabalho. Sem você, nada que realizei no laboratório seria possível. Este trabalho é uma pequena parcela de toda homenagem que você merece. Obrigada por toda ajuda.

Agradeço a todos os professores e alunos do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas pelas risadas nos cafezinhos da tarde e por toda ajuda.

À Prof^a Dra. Mara Cristina Pinto pelas aulas inesquecíveis da disciplina de Parasitologia. Obrigada pela atenção e cuidado especial com os discentes. Os seus conselhos para melhorar a nossa graduação foram essenciais.

Aos professores do curso de Farmácia-Bioquímica que contribuíram para o meu crescimento científico e pessoal.

Ao Centro Acadêmico de Ciências Farmacêuticas – CACIF – que sempre se fez presente durante toda a minha graduação e que foi primordial para o meu crescimento pessoal e formação do meu senso crítico. Em especial, à Gestão SuperNova, a qual tive honra de ser presidente. Obrigada a todos que fizeram parte desse momento único da minha vida. À Maria Júlia Martins de Souza, minha vice, que foi meu braço direito em todas as decisões.

Agradeço aos meus pais Celsio e Janaina que fizeram o possível e o impossível para realizar o meu sonho de ser uma profissional da saúde. À minha mãe, em especial, que mesmo de longe se fez presente em todos os momentos da minha graduação, com sua atenção e amor incondicional. À minha avó Alice, minha segunda mãe e madrinha. Ao meu tio Chakib, pelas brincadeiras e conselhos. À minha tia Juliana, que me mostrou o caminho para a área da saúde e que me aconselhou a fazer o curso de Farmácia.

Às amigas e irmãs da República Lolitas, que tive o prazer de morar e conviver durante toda a minha graduação. Ver o que essa república se tornou hoje me enche de orgulho. Obrigada por todos os momentos de amizade, descontração, alguns desentendimento que me fizeram crescer de uma maneira inexplicável. A minha graduação não teria sido o que foi se vocês não tivessem feito parte dela. Uma vez Lolita, sempre Lolita!

Às minhas amigas Mariana, Thais e Thauana que, mesmo não tendo mais o convívio diário, sempre se fizeram presente em minha vida. Obrigada por todo o carinho e pelas broncas que me ajudaram a continuar forte em minha graduação.

A Bateria Bateria que tenho orgulho em dizer que ajudei a crescer e se tornar o que é hoje. Desde 2011, presente na minha vida e pra sempre meu coração.

À todos os amigos da Turma 82 do curso de Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêutica da UNESP. Em especial a Thais Campos Taira, minha amiga companheira desde o primeiro dia que cheguei a Araraquara.

Muito obrigada a todos!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL - microlitros

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

DTU – *Discret Typing Unity* (Unidades Discretas de Tipagem)

EDTA – *Ethylene Diamine Tetracetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

g - grama

gDNA – Ácido desoxirribonucleico genômico

GPI – Glicose 6-Fosfato Isomerase

H₂O – Água

HSP60 – *Heat Shock Proteins* (Proteína de choque térmico)

Kb – Kilobase (1000 pares de bases)

KCl – Cloreto de potássio

LiCl – Cloreto de lítio

LIT – *Liver Infusion Tryptose*

M – Molar

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mmol - milimol

Na₂HPO₄ – Fosfato dissódico

NaCl – Cloreto de sódio

ng - nanograma

pb – Pares de bases

PBS – Tampão Fostato-salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pmol - Picomol

q.s.p. – Quantidade Suficiente Para

rDNA – Ácido desoxirribonucleico ribossômico

RFLP – *Restriction Fragment Lenght Polymorphism*

rpm – Rotações Por Minuto

Taq DNA polimerase – *High Fidelity PCR Enzyme Mix*

Tc – *Trypanosoma cruzi*

Tris-HCL – Tris-Ácido clorídrico

UV – Luz ultravioleta

V - Volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Município de Quaraí – RS, município de Monte Negro – RO, distrito de Santo Inácio – BA.

Figura 2. Tripé de classificação dos isolados de *Trypanosoma cruzi* em seus respectivos DTU(s).

Figura 3: Curva de crescimento em meio LIT das seis cepas de *T. cruzi* realizada durante dez dias consecutivos.

Figura 4. Análise da extração do DNA genômico de *T. cruzi*.

Figura 5. Análise do dimorfismo genético da fração 24S α do rDNA de *T. cruzi* por PCR e eletroforese em gel de agarose 3%.

Figura 6. Análise do dimorfismo genético do gene HSP60 de *T. cruzi* por PCR e eletroforese em gel de agarose 3%.

Figura 7. Análise do dimorfismo genético do gene GPI de *T. cruzi* por PCR e eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Figura 8. Modelo “*Two-Hybridization*” que evidencia as trocas genéticas durante a evolução de *T. cruzi*.

Figura 9. Distribuição aproximada dos DTUs de *T. cruzi* no ciclo doméstico e silvestre.

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Componentes utilizados para o preparo do meio de cultura LIT.

Tabela II: Resultado da curva de crescimento das seis cepas (10^6 parasitos/mL) em meio LIT.

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. A doença de Chagas: aspectos históricos, biológicos e epidemiológicos.....	13
1.2. Patologia e tratamento da doença de Chagas.....	15
1.3. Vetores da Doença.....	16
1.4. <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Meio de Cultura.....	20
3.2. Manutenção das cepas em meio LIT.....	21
3.3. Cinética de crescimento em meio de cultura LIT.....	21
3.4. Genotipagem das cepas de <i>T. cruzi</i>	22
3.4.1. Extração rápida de DNA genômico.....	22
3.4.2. Amplificação do gene 24Sα rDNA – LSU DNA.....	23
3.4.3. RFLP-PCR (Restriction fragment lenght polymorphism) dos genes HSP60 (Proteína de choque térmico) e GPI (Glicose 6-Fosfato Isomerase).....	25
3.4.4. Digestão de HSP60/EcoRV e GPI/HhaI.....	26
3.4.5. Análise para Classificação dos isolados nas respectivas DTUs.....	27
4. RESULTADOS.....	28
5. DISCUSSÃO.....	32
5.1. Estudo da cinética de crescimento em meio LIT de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
5.2. Análise dos resultados obtidos em relação a hibridização das linhas de <i>T. cruzi</i>	35
5.3. Eco-epidemiologia dos DTUs.....	35
6. CONCLUSÃO.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, foi descrita pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas em 1909. É transmitida ao homem por insetos hemípteros conhecidos como “barbeiros” dos quais os gêneros mais importantes são *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. Essa zoonose representa um risco para aproximadamente 20 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina. Para tentar explicar as diferentes manifestações observadas na doença de Chagas, vários estudos foram realizados com intuito de averiguar as possíveis correlações entre as formas clínicas com a variabilidade genética do parasito. Algumas hipóteses estão relacionadas provavelmente ao fato de a doença ser um processo multifatorial, em que tanto aspectos do parasito como do hospedeiro estão inter-relacionados ou ainda a escolha inadequada de alvos como marcadores de patogenicidade na tentativa de estabelecer a correlação entre as formas clínicas e a variabilidade genética do parasito. Com o intuito de contribuir para ampliar o conhecimento sobre as populações de *T. cruzi*, foi realizada a cinética de crescimento em meio LIT e o estudo genotípico de seis cepas de *T. cruzi* isoladas de exemplares de *R. montenegrensis*, *T. rubrovaria* e *T. sordida* por meio de marcadores genotípicos utilizando as sequências dos genes 24Sα do DNA ribossomal, HSP60 e GPI.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença de Chagas: aspectos históricos, biológicos e epidemiológicos.

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, foi descrita pelo pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909, enquanto trabalhava na campanha anti-malária no município de Lassance – MG, durante a construção da estrada de ferro Central do Brasil. Carlos Chagas não só decifrou o ciclo biológico do parasito, revelando seus hospedeiros vertebrados e invertebrados, mas também a epidemiologia e parte da patologia da doença.

A área de abrangência da doença de Chagas é ampla e representa um risco para 20 milhões de pessoas desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina, sendo uma causa importante das mortes na América Latina, afetando cerca de 6 a 7 milhões de pessoas (WHO, 2015).

No entanto, nas últimas décadas, tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos, Canadá, muitos países da Europa Ocidental e alguns do Pacífico, devido à mobilidade da população entre a América Latina e o resto do mundo (WHO, 2015).

A principal via de transmissão de *T. cruzi* ao hospedeiro vertebrado é a vetorial. No intestino médio do triatomíneo, as formas epimastigotas do parasito multiplicam-se por divisão binária e, na região posterior, diferenciam-se em formas infectantes denominadas tripomastigotas metacíclicas (Chagas, 1909). A transmissão de *T. cruzi* ao homem ocorre durante o repasto sanguíneo pela deposição das fezes e ou urina do inseto vetor contendo a forma infectante sobre a pele com ferimentos ou sobre a mucosa (Dias, 1934; Brener, 1972; Brener, 1976). Além da via vetorial, o parasito pode ser também transmitido por transfusão

sanguínea (Dias e Brener, 1984), pela via congênita (Chagas, 1911), transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e consumo de alimentos contaminados (WHO, 2015).

Para tentar explicar as diferentes manifestações observadas na doença de Chagas, vários estudos foram realizados com intuito de averiguar as possíveis correlações entre as formas clínicas com a variabilidade genética do parasito. Contudo, até o momento os resultados são bastante incipientes e controversos (Brenière et al., 1985; Apt et al., 1987; Brenière et al., 1989; Vago et al., 2000; Lages-Silva, 2001; Lages-Silva et al., 2006; D'Avila et al., 2006; D'Avila et al., 2009).

Algumas hipóteses que poderiam estar relacionadas a esse insucesso são, provavelmente, o fato de a doença ser um processo multifatorial, em que tanto aspectos do parasito como do hospedeiro estão inter-relacionados ou ainda a escolha inadequada de alvos no genoma do parasito utilizados como marcadores de patogenicidade na tentativa de estabelecer a tão desejada correlação entre as formas clínicas com a variabilidade genética do parasito. Portanto, ainda são necessários mais estudos nessa área para elucidação dessas lacunas (Oliveira et al., 2012).

Nesse panorama, o parasito, certamente, tem um papel importante no processo, e diferenças na sua distribuição poderiam refletir na prevalência das diferentes formas clínicas. Já está bem estabelecido que propriedades biológicas específicas sejam mais associadas a certos grupos genéticos de *T. cruzi* (Toledo et al., 2004; Toledo et al., 2002; Buscaglia et al., 2006), o que poderia influenciar a resposta ao tratamento etiológico, o curso da infecção e, consequentemente as manifestações clínicas (Macedo et al., 2004).

Portanto, os estudos moleculares contribuem para evidenciar a variabilidade de cepas de *T. cruzi* em determinada área e vem sendo utilizados no intuito de

integrar os aspectos clínicos e epidemiológicos da doença de modo a orientar o prognóstico, diagnóstico ou mesmo o tratamento da doença de Chagas (Oliveira et al., 2012).

1.2. Patologia e tratamento da doença de Chagas

A doença de Chagas apresenta duas fases. A fase inicial, aguda, dura cerca de dois meses após a infecção, na qual um grande número de parasitos circulam no sangue. Na maioria dos casos, os sintomas são ausentes ou leves, mas podem incluir febre, dor de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, palidez, dor muscular, dificuldade em respirar, inchaço abdominal ou dor no peito. Em menos de 50% das pessoas picadas por um triatomíneo, tem como característica inicial, visíveis sinais de lesão na pele ou inchaço arroxeadado em uma das pálpebras dos olhos (Souto et al, 1996).

Na fase crônica, os parasitos estão escondidos, principalmente no coração e músculo digestivo. Até 30% dos pacientes sofrem de doenças cardíacas e até 10% sofrem problemas no trato digestivo (geralmente alargamento do esôfago ou cólon), alterações neurológicas ou ambos. Nos anos seguintes, a infecção pode levar à morte súbita ou insuficiência cardíaca causada pela destruição progressiva do músculo cardíaco (WHO, 2015).

Uma vez que essa doença afeta, em sua maioria, populações pobres, o desenvolvimento de novas soluções terapêuticas não é um negócio atraente para as grandes empresas farmacêuticas, e, atualmente, pode-se dizer que essa iniciativa está sendo extremamente negligenciada, sendo um fato muito preocupante devido às necessidades dessas pessoas. Outra grande dificuldade é que o protozoário é intracelular e, dessa forma, utiliza-se das próprias células do hospedeiro para se

multiplicar, portanto para eliminar o parasito é necessário um fármaco que atravesse a membrana plasmática (Clayton, 2010).

Porém, existem dois medicamentos utilizados, o benzonidazol e o nifurtimox, que só são efetivos na fase aguda. Apresenta cerca de 80% de cura se tomados na dose ideal, no tempo correto e no início da doença. Entretanto, esses medicamentos possuem efeitos adversos severos e podem se tornar resistentes em algumas cepas do parasito, tornando-os mais patogênicos e difíceis de combater (Clayton, 2010).

1.3. Vetores da doença

Os triatomíneos estão distribuídos essencialmente na região Neotropical e contam com 150 espécies (Galvão, 2014). No Brasil são encontradas 52 espécies, mas apenas cinco dessas, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida* possuem maior importância em termos epidemiológicos pelo fato de colonizarem o peri ou intradomicílio. As 47 espécies não domiciliadas promovem a circulação de *T. cruzi* em mamíferos que vivem em ambientes silvestres (Coura e Dias, 2009). Podem ser carregadas passivamente pelos homens para o interior do domicílio por meio da lenha ou, mesmo, por cobertura vegetal de casas e anexos (Dias, 2000).

Com os resultados bastante satisfatórios em relação ao controle de *T. infestans*, outros triatomíneos de importância secundária, coletados no peridomicílio, passaram a assumir maior relevância. Dentre as espécies de triatomíneos descritas, *T. sordida* tem sido encontrada em cidades do Estado de São Paulo (Silva et al., 2003).

A presença de colônias de *T. sordida* no peridomicílio pode sinalizar uma iminente colonização dessa espécie em um futuro próximo, caso as medidas de controle sejam descontinuadas. Certamente a falta de cuidado do morador e a não

notificação da ocorrência desses insetos pela população são fatores que podem contribuir com o aumento desses vetores (Silva et al., 2003).

Buscando racionalizar as operações de controle dos vetores de *T. cruzi*, é fundamental que se conheça a dinâmica populacional de cada uma das espécies envolvidas (Silveira e Costa, 2000). Questões como atividade sazonal, razão sexual, mobilidade, resposta comportamental a inseticidas, tempo de defecação após repasto, em função da fonte alimentar devem ser esclarecidas, visando assim criar condições favoráveis à erradicação dos vetores de uma das moléstias que produz o maior ônus de enfermidade entre as denominadas doenças tropicais (Pelli et al., 2007).

1.4. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909) é um protozoário hemoflagelado, digenético, pertencente à ordem Kinetoplastida e a família Tripanosomatidae. Diversos trabalhos demonstraram que o *T. cruzi* apresenta-se como uma espécie heterogênea, constituída por várias sub-populações do parasito que circulam, tanto no ambiente doméstico como no silvestre, além de manter um íntimo contato com os seres humanos, animais reservatórios e vetores (Zingales et al., 1998; Macedo e Pena, 1998; Miles et al., 2009; Yeo et al., 2011).

Apresenta um ciclo biológico complexo, que inclui diferentes estágios no vetor invertebrado e no hospedeiro vertebrado. As formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas são encontradas no vetor, enquanto as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares no vertebrado. A transição entre uma forma e outra envolve modificações morfológicas, na expressão gênica e no ciclo celular (Heath et al., 1990).

Devido aos problemas relacionados com a genotipagem de *T. cruzi* alguns

trabalhos foram propostos com a finalidade de se chegar à caracterização rápida e segura dos isolados nas seis DTU(s) (Discrete Typing Units) desse parasito. Devido à natureza híbrida de alguns desses grupos, os protocolos combinam diferentes metodologias. Entre eles, o protocolo proposto por Lewis et al. (2009), que representa, segundo os autores, uma metodologia simples e acurada, capaz de identificar todos os genótipos do parasito, avaliando os resultados do RFLP-PCR de dois genes – HSP60 e GPI (Sturm et al., 2003; Gaunt et al., 2003) juntamente com os padrões do 24Sα rDNA.

Trypanosoma cruzi possui uma estrutura genética que permite a subdivisão intraespecífica em seis grupos genéticos distintos, denominados TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (Zingales et al., 2009) que tem apresentado diferenças frente a distribuição geográfica, propriedades biológicas e susceptibilidade a drogas. É conhecido o predomínio das DTU's TcII e TcVI em diversas regiões brasileiras, associados tanto ao ciclo doméstico como ao silvestre da doença de Chagas, e estando intimamente relacionados com as manifestações clínicas graves em pacientes chagásicos crônicos.

Grandes esforços têm se concentrado com o intuito de correlacionar a variabilidade genética do parasito com suas características biológicas, epidemiológicas e clínicas fundamentais, incluindo ainda a resistência/susceptibilidade ao tratamento etiológico, a fim de delinear perfis cepa-específicos, que poderão orientar as medidas de controle, o manejo do paciente e/ou seu tratamento. Desse modo, é fundamental conhecer a variabilidade genética e a estrutura populacional de qualquer agente patogênico em uma determinada região, sobretudo em estudos epidemiológicos, de evolução do parasito, de diagnóstico da doença e seu prognóstico.

2. OBJETIVOS

- ✓ Comparar a cinética de crescimento em meio de cultura LIT das cepas QMM₆, QMM₇, RON₁, RON₃, SI₅ e SI₉ de *Trypanosoma cruzi*;
- ✓ Caracterização das cepas QMM₆, QMM₇, RON₁, RON₃, SI₅ e SI₉ de *Trypanosoma cruzi* por meio da sequência dos genes 24Sα do DNA ribossomal, HSP60 e GPI.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As cepas QMM₆ e QMM₇ foram isoladas a partir de exemplares de *Triatoma rubrovaria* (Ribeiro et al., 2014) coletados no bairro de Macarrão, município de Quaraí, Rio Grande do Sul por Rosa e colaboradores em 2008 (Figura 1a). As cepas RON₁ e RON₃ foram isoladas em 2007, a partir de exemplares de *Rhodnius montenegrensis* (Rosa et al., 2012) que foram coletados em 100 propriedades no município de Monte Negro, Rondônia (Figura 1b). As cepas SI₅ e SI₉ foram isoladas a partir de exemplares de *Triatoma sordida* (Ribeiro et al., 2014) coletados no peridomicílio do Distrito de Santo Inácio no Estado da Bahia por Rosa et al. em 2004 (Figura 1c). A cepa Y, usada como controle positivo, foi isolada por xenodiagnóstico, de um caso humano (Silva e Nussenzweig, 1953).

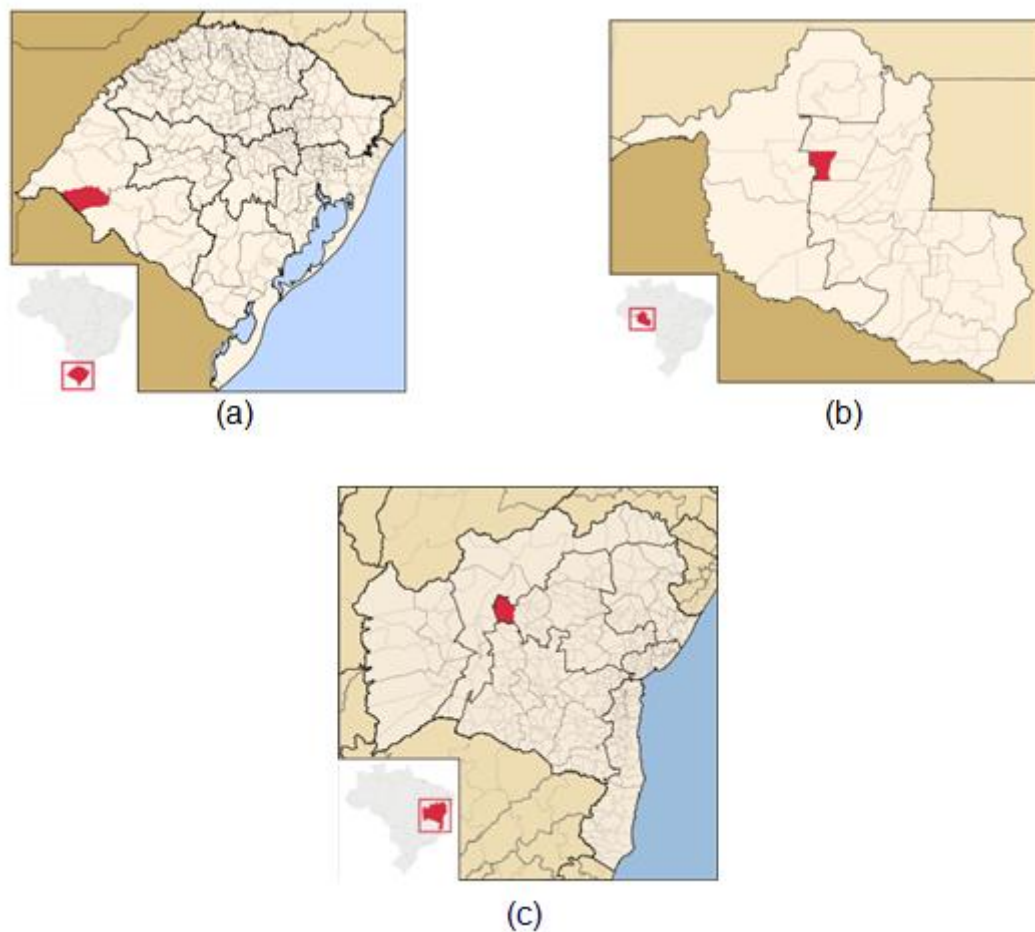


Figura 1. Município de Quarai – RS (a). Município de Monte Negro – RO (b). Distrito de Santo Inácio – BA (c).

O isolamento das cepas 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 e foram mantidas por repiques sucessivos em meio de cultura.

3.1. Meio de Cultura

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 I.

Tabela I: Componentes utilizados para o preparo do meio de cultura LIT.

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

3.2. Manutenção das cepas em meio LIT

Após o isolamento das cepas foram feitos repiques sucessivos para obter ótimo crescimento, visto que as fezes dos triatomíneos possuem bactérias que 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 as cepas não entrem em fase de declínio.

3.3. Cinética de crescimento em meio de cultura LIT

O estudo da cinética de crescimento foi realizado a partir da contagem das formas de *T. cruzi* observadas em câmara de Neubauer durante dez dias consecutivos no microscópio óptico. Para isso, foi necessário um inóculo inicial de 5×10^6 parasitos/mL.

A análise da cinética 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 a extração do DNA genômico do parasito.

3.4. Genotipagem das cepas de *T. cruzi*

Existem diversos marcadores moleculares disponíveis para a caracterização das populações de *T. cruzi* e a escolha de tais marcadores ou alvos ainda não é um consenso, mas, geralmente, a resolução segura dos isolados do parasito em seus seis subgrupos requer a combinação de diferentes metodologias, devido à existência dos grupos híbridos em *T. cruzi* (Zingales et al., 2012). A identificação inicial dos grupos genéticos de *T. cruzi* foi realizada seguindo o tríplice ensaio proposto por Lewis et al.(2009). Essa metodologia explora a análise em conjunto dos perfis de bandas gerados após a amplificação do domínio D7 do 24S α rDNA (Souto et al., 1996) do perfil de corte gerado após a digestão dos produtos amplificados de dois genes com suas respectivas enzimas de restrição (HSP60/ECORV e GPI/HhaI) via RFLP-PCR. Esse método demonstra ser eficiente, rápido e de baixo custo.

As metodologias de genotipagem estão descritas abaixo. Todas as reações foram carreadas empregando controle positivo em todas as etapas.

3.4.1. Extração rápida de DNA genômico

Para extrairmos o DNA dos parasitos foi necessário coletá-los em meio de cultura LIT em fase log (cerca de uma semana de crescimento). Foi centrifugado 1,0mL de cultura a 3000 rpm durante 1 minuto. Retirou-se o sobrenadante que foi lavado com 800 μ L de Tryps Wash Buffer (100mM NaCl, 3mM MgCl₂, 20mM Tris-HCl ph 7,5) para retirar o meio de cultura e foi centrifugado novamente a 3000 rpm durante 1 minuto. Retirou-se o sobrenadante formado e este sofreu uma ressuspensão em 250 μ L TELT Buffer (50mM Tris-HCl pH 8,0, 62,5mM EDTA, 2,5M LiCl, 4% Triton X-100) que foi utilizado para lisar o parasito e uma extração foi

realizada com 250µL fenol/clorofórmio centrifugando a 16000 rpm durante 2 minutos. A parte superior foi transferida para um novo tubo.

Em 250µL de clorofórmio foi realizado uma extração e em sequência foi centrifugado a 16000 rpm durante 2 minutos. Novamente a parte superior foi transferida para um novo tubo.

O DNA foi precipitado com 750µL de Álcool Etílico 100% e 25µL de Ácido acético 3M pH 7,0 através de centrifugação a 16000 rpm durante 2 minutos. Foi necessário lavar com 500µL Álcool Etílico 70% e centrifugar com a mesma rotação anterior durante 5 minutos e deixar secar ao ar livre. Por último, foi realizada uma ressuspensão em 30µL de H₂O.

Para garantir que a extração realizada foi bem sucedida, as amostras foram quantificadas utilizando o aparelho NanoDrop™ Lite Spectrophotometer.

Foi realizada uma eletroforese para a confirmação da extração do DNA genômico. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,0% (50,0mL TAE; 0,5g de agarose) a 70V por 50 minutos em tampão TAE (40mM de Tris-acetato; 2mM de EDTA, pH 8,0). Um processo de pós coloração foi realizado durante 40 minutos em um meio contendo 90,0mL de H₂O MiliQ + 10,0mL NaCl 1M + 30µL GelRed® Nucleic Acid Gel Stain e, posteriormente, visualizado em luz UV.

3.4.2. Amplificação do gene 24Sα rDNA - LSU rDNA

A reação foi processada em um volume final de 50 µL contendo:

- 1,0µL DNA genômico (10 – 100ng);
- 1,0µL dNTP (0,2mmol/L de cada);
- 5,0µL oligonucleotídeo iniciador Forward D71 (1pmol/µL);

- 5,0µL oligonucleotídeo iniciador Reverse D72 (1pmol/µL);
- 3,0µL cloreto de magnésio (1,5mM);
- 0,5µL *Taq* DNA polimerase - *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (2,5U);
- 5,0µL Tampão PCR 10x;
- H₂O MiliQ q.s.p 50µl

A amplificação do domínio divergente do gene 24 Sα rDNA foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores (Souto e Zingales, 1993):

- Forward: D71 5' - AAGGTGCGTCGACAGTGTGG - 3'
- Reverse: D72 5' - TTTTCAGAATGGCCGAACAGT - 3'

A reação de PCR para o gene LSU rDNA (24Sα rDNA) foi realizada em um termociclador Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems™ sob as seguintes condições :

94°C por 3 min; → 1 ciclo

94°C por 1 min;	}	27 ciclos
60°C por 1 min;		
72°C por 1 min;		

72°C por 5 min. → 1 ciclo

Após a amplificação, foi acrescentado nas amostras o tampão de carregamento (50% de glicerol; 0,4% de azul de bromofenol; 0,4% de xilenocianol) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 3,0% (50,0mL TAE; 1,5g de agarose) a 70V por 50 minutos em tampão TAE (40mM de Tris-acetato; 2mM de EDTA, pH 8,0). Um processo de pós coloração semelhante ao anterior foi realizado e o gel foi, posteriormente, visualizado em luz UV.

3.4.3. RFLP–PCR (Restriction fragment length polymorphism) dos genes HSP60 (Proteína do choque térmico) e GPI (Glicose 6-Fosfato Isomerase)

O polimorfismo dos genes HSP60 (Proteína do choque térmico) e GPI (Glicose 6-fosfato Isomerase) para as populações de *T. cruzi* foi avaliado segundo o protocolo de Lewis et al. (2009).

A reação de PCR para os genes HSP60 e GPI foi realizada em um termociclador Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems™, com um volume final de 50µL com os seguintes componentes:

- 1,0µL DNA genômico (10 – 100ng);
- 1,0µL dNTP (0,2mmol/L de cada);
- 5,0µL oligonucleotídeo iniciador Forward (1pmol/ µL);
- 5,0µL oligonucleotídeo iniciador Reverse (1pmol/µL);
- 4,0µL cloreto de magnésio (2,0mM);
- 0,5µL *Taq* DNA polimerase - *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (2,5U);
- 5,0µL Tampão PCR 10x;
- H₂O MiliQ q.s.p 50µl

As sequências dos iniciadores empregados nas amplificações foram:

a) HSP60, descritos por Lewis et al., (2009):

- Forward 5' - GTGGTATGGGTGACATGTAC - 3'
- Reverse 5' – CGAGCAGCAGAGCGAAACAT - 3'

b) GPI, descritos por Lewis et al., (2009):

- Forward: 5' – GGCATGTGAAGCTTTGAGGCCTTTTTCAG - 3'

➤ Reverse: 5' – TGTAAGGGCCCAGTGAGAGCGTTCGTTGAATAGC - 3'

As condições para amplificação dos genes foram:

94°C por 3 min; —→ 1 ciclo

94°C por 30 seg;	}	4 ciclos
64°C por 30 seg;		
72°C por 1 min;		

94°C por 30 seg;	}	28 ciclos
60°C por 30 seg;		
72°C por 1 min;		

72°C por 10 min. —→ 1 ciclo

Após a amplificação, foi acrescentado nas amostras o tampão de carregamento (50% de glicerol; 0,4% de azul de bromofenol; 0,4% de xilenocianol) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 3,0% (50,0mL TAE; 1,5g de agarose) para o gene HSP60 e em gel de agarose a 1,5% (50,0mL TAE; 0,75g de agarose) a 70V por 50 minutos em tampão TAE (40mM de Tris-acetato; 2mM de EDTA, pH 8,0). Um processo de pós coloração semelhante ao anterior foi realizado e o gel foi, posteriormente, visualizado em luz UV.

3.4.4. Digestão de HSP60/EcoRV e GPI/HhaI

Os produtos obtidos dos genes HSP60 e GPI foram digeridos com as enzimas EcoRV e HhaI, respectivamente. A reação de digestão com as enzimas de restrição foram realizadas em um volume final de 20µL empregando:

- 10,0µL dos produtos amplificados de cada gene;
- 0,5µL EcoRV (0,25U/µL);

- 0,5µL HhaI (0,25U/µL);
- 2,0µl de tampão NEB 3 e NEB 4 1X;
- 0,2µl de BSA (100ng/µL);
- H₂O mili Q q.s.p. 20µL.

Foi necessário incubar o produto da digestão enzimática por 4 horas, a 37°C e após esse período foi aplicado 5,0µL do produto dos genes HSP60 e GPI, em gel de agarose a 3,0% e a 1,5%, respectivamente.

3.4.5. Análise para Classificação dos isolados nas respectivas DTU(s)

A classificação dos isolados em suas respectivas DTU(s) foi realizada seguindo o tripé de análise proposto por Lewis et al. (2009), que combina os resultados encontrados na avaliação do polimorfismo do gene 24Sα rDNA juntamente com os produtos de corte do RFLP-PCR dos genes da HSP60 e da GPI, conforme indicado no esquema abaixo:

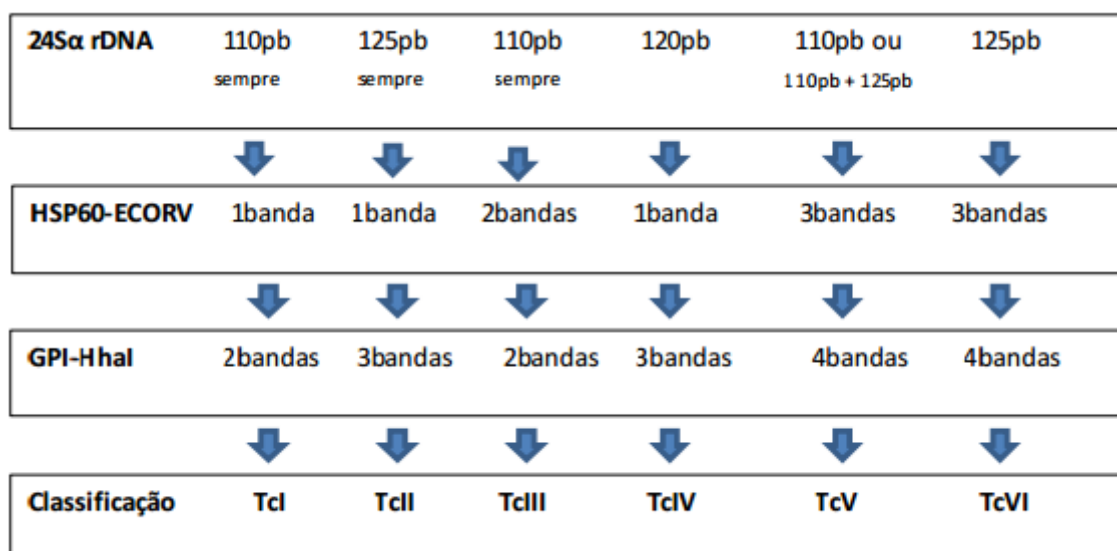


Figura 2: Tripé de classificação dos isolados de *Trypanosoma cruzi* em seus respectivos DTU(s) proposto por Lewis et al. (2009).

Sendo assim, foi analisado o número de pares de bases obtidas através da amplificação da fração 24Sα do rDNA e o número de bandas obtidas pela digestão

dos genes HSP60 e GPI e concluído em qual grupo se classificam as seis cepas estudadas, segundo a subdivisão intraespecífica de *T. cruzi*.

4. RESULTADOS

Foi observada a cinética de crescimento das cepas QMM₆, QMM₇, RON₁, RON₃, SI₅ e SI₉ de *T. cruzi*. Evidenciou-se a variação no crescimento das diferentes cepas durante a multiplicação do parasito em meio de cultura LIT, conforme resultados apresentados na Tabela II, assim como na Figura 3.

Tabela II: Resultado da curva de crescimento das seis cepas (10⁶ parasitos/mL) em meio LIT.

Leitura	QMM ₆	QMM ₇	RON ₁	RON ₃	SI ₅	SI ₉
1º dia	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
2º dia	4,97	5,27	3,45	12,1	4,5	6,55
3º dia	6,95	7,02	4,97	17,5	8,30	11,5
4º dia	4,62	8,62	5,40	24,4	5,9	11,0
5º dia	8,02	9,77	4,22	24,3	9,75	11,6
6º dia	11,4	8,12	5,50	31,4	13,9	17,9
7º dia	13,9	17,6	7,12	34,6	17,2	24,1
8º dia	11,7	17,7	8,72	33,5	17,3	22,3
9º dia	13,3	13,4	7,77	30,3	16,3	20,8
10º dia	12,3	1,40	8,70	28,6	15,5	15,0

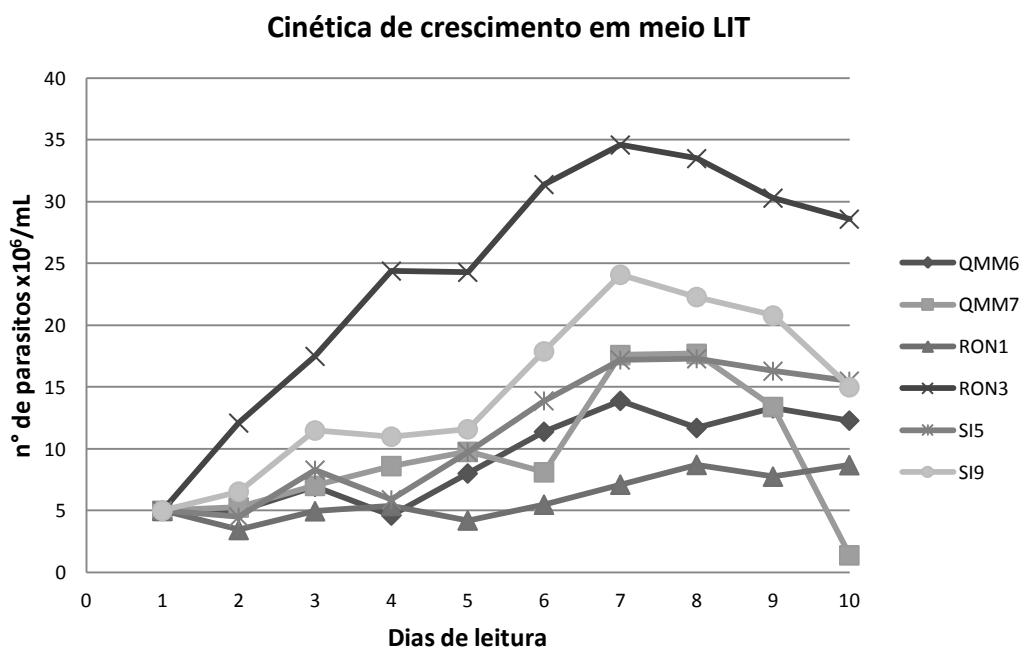


Figura 3: Curva de crescimento em meio LIT das seis cepas de *T. cruzi* realizada durante dez dias consecutivos

O DNA genômico foi extraído seguindo o protocolo descrito por Lewis et al. (2009 L) e a quantificação da extração resultou 35,4ng/μL de DNA genômico para a cepa Y, seguido de 109,5ng/μL, 90,7ng/μL, 64,7ng/μL, 81,3ng/μL, 163,1ng/μL, 70,2ng/μL para as cepas SI₅, SI₉ QMM₆, QMM₇, RON₁ e RON₃, respectivamente. Foi realizada a confirmação da extração em gel de agarose 1,0% (Figura 4), demonstrando que a extração foi realizada corretamente, sendo assim, as análises seguintes poderiam ser realizadas.

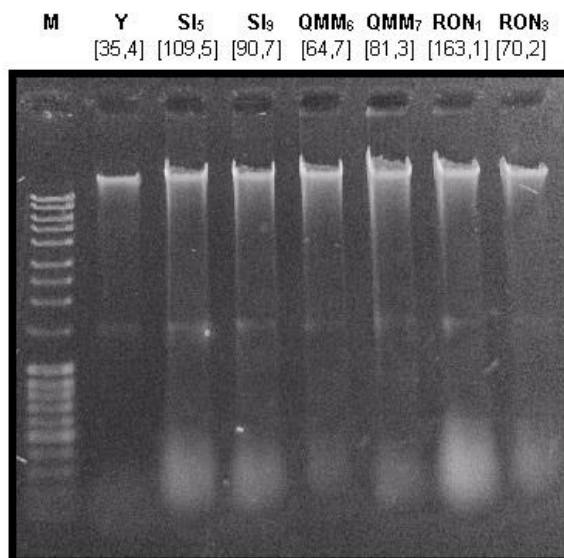


Figura 4: Análise da extração do DNA genômico de *T. cruzi* segundo o protocolo descrito por Lewis et al., 2009. Confirmação da extração através de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado por pós coloração com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain. A primeira coluna (M) corresponde ao peso molecular 1kb Plus. A segunda coluna corresponde a cepa Y, utilizada como controle positivo. As bandas seguintes correspondem as cepas SI₅, SI₉, QMM₆, QMM₇, RON₁ e RON₃, respectivamente. As concentrações mostradas apresentam unidade de medida em ng/μL de DNA genômico.

A amplificação do domínio divergente 24Sα rDNA, HSP60 e GPI por meio da técnica tripla de PCR, resulta em produtos de 110 – 125pb, uma, duas ou três bandas e de duas a quatro bandas, respectivamente. Essa técnica é utilizada para a caracterização de cepas isoladas de humanos, triatomíneos e animais reservatórios, e indica a existência de heterogeneidade entre isolados de *T. cruzi* (Lewis et al., 2009; Zingales et al., 2009).

A análise de heterogeneidade genética da fração 24Sα do rDNA (LSU – rDNA) demonstrou que as cepas QMM₆, QMM₇, RON₁ e RON₃ amplificaram DNA de 110pb e as cepas SI₅ e SI₉ amplificaram DNA de 125pb (Figura 5). O produto do gene HSP60 amplificado apresentou uma banda no gel de agarose 3,0% (Figura 6) para as cepas RON₁, RON₃, SI₅ e SI₉, e apresentou duas bandas para as cepas QMM₆ e QMM₇. Para o gene GPI, observou-se a presença de duas bandas no gel

de agarose 1,5% para as cepas QMM₆, QMM₇, RON₁ e RON₃ e três bandas para as cepas SI₅ e SI₉ (Figura 7).

Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura (Lewis et al., 2009; Zingales et al., 2009) e classificam as cepas QMM₆ e QMM₇ como pertencentes ao grupo TcIII, as cepas RON₁ e RON₃ como pertencentes ao grupo TcI e as cepas SI₅ e SI₉ como pertencentes ao grupo TcII. Os resultados dos produtos da amplificação pela técnica de PCR são mostrados nas Figuras 5, 6 e 7.

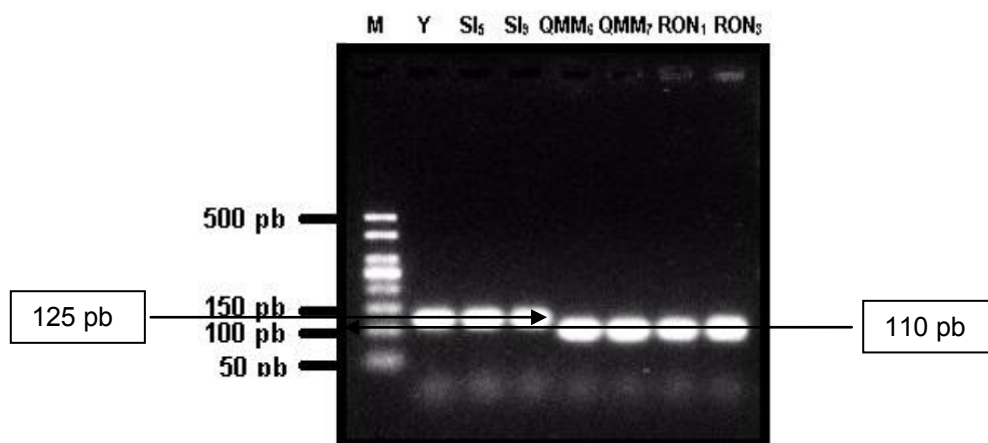


Figura 5: Análise do dimorfismo genético da fração 24Sα do rDNA de *T. cruzi* por PCR e eletroforese em gel de agarose 3% corado por pós coloração com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain. A primeira coluna (M) corresponde ao peso molecular 50pb DNA Ladder. A segunda coluna corresponde a cepa Y, utilizada como controle positivo, apresentando 125 pb. As cepas QMM₆, QMM₇, RON₁ e RON₃ amplificaram DNA de 110 pb e as cepas SI₅ e SI₉ amplificaram DNA de 125 pb.

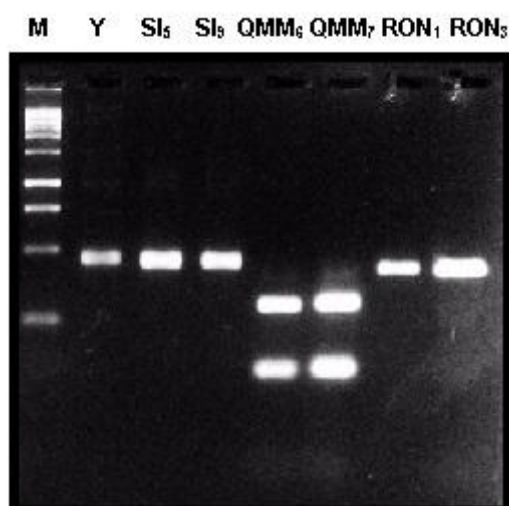


Figura 6: Análise do dimorfismo genético do gene HSP60 de *T. cruzi* por PCR e eletroforese em gel de agarose 3% corado por pós coloração com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain. A primeira coluna (M) corresponde ao peso molecular 1kb Plus. A segunda coluna corresponde a cepa Y, utilizada como controle positivo, apresentando uma banda. As cepas QMM₆ e QMM₇ apresentaram duas bandas e as cepas RON₁, RON₃, SI₅ e SI₉ apresentaram uma banda.

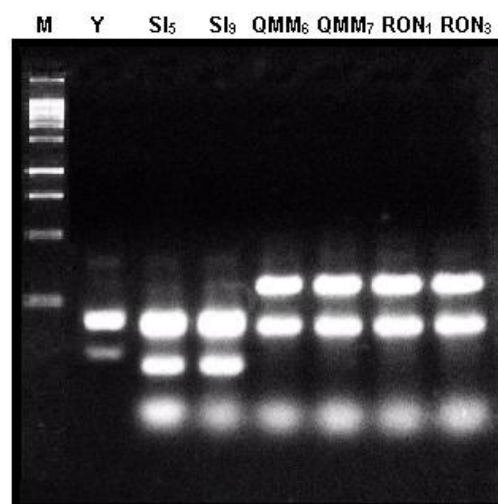


Figura 7: Análise do dimorfismo genético do gene GPI de *T. cruzi* por PCR e eletroforese em gel de agarose 1,5% corado por pós coloração com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain. A primeira coluna (M) corresponde ao peso molecular 1kb Plus. A segunda coluna corresponde a cepa Y, utilizada como controle positivo, apresentando três bandas. As cepas QMM₆, QMM₇, RON₁ e RON₃ apresentaram duas bandas e as cepas, SI₅ e SI₉ apresentaram três bandas.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estudo da cinética de crescimento em meio LIT de *T. cruzi*

A variação na cinética de crescimento foi observada por Rimoldi et al. em 2014, através da observação de onze cepas de *T. cruzi*. Três cepas foram utilizadas como referência, Bolívia (isolada de fezes de *Triatoma infestans*, proveniente de Vitichi por Funayama e Prado Júnior, 1974); Famema (cepa genuinamente mariliense isolada em 1997, por meio de xenodiagnóstico artificial por Martins et al., 2003) e Y (cepa isolada de um caso humano por Silva e Nussenzweig em 1953). As cepas QMM3, QMM5, SI5, SI8, TI e Tm foram isoladas a partir de formas flageladas do parasito no intestino posterior de triatomíneos (Ribeiro et al., 2014). As cepas SC90 e SC96 oriundas de reservatório silvestre e humano, respectivamente, foram isoladas por Steindel et al., 2008 no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Rimoldi, 2014 et al. mostraram que as cepas apresentaram pico de crescimento que variaram do 7º ao 10º dia.

Os dados obtidos pelos autores acima suportam os resultados encontrados neste trabalho no qual as cepas QMM₆, RON₃ e SI₉ possuem perfil de crescimento semelhante com pico no 7º dia com $13,9 \times 10^6$ parasitos/mL, $34,6 \times 10^6$ parasitos/mL e $24,1 \times 10^6$ parasitos/mL, respectivamente, e as cepas QMM₇, RON₁ e SI₅ possuem mesmo perfil de crescimento com pico no 8º dia com $17,7 \times 10^6$ parasitos/mL, $8,72 \times 10^6$ parasitos/mL e $17,3 \times 10^6$ parasitos/mL, respectivamente. Demonstrando assim a variabilidade biológica das diferentes cepas durante a multiplicação do parasito em meio de cultura.

5.2. Análise dos resultados obtidos em relação à hibridização das linhas de *T. cruzi*

Sabe-se que *T. cruzi* é predominantemente diplóide e se divide por fissão binária (El-Sayed et al., 2005), entretanto a heterogeneidade de subpopulações que constituem as cepas de *T. cruzi* vem sendo avaliada frente a diversos parâmetros

como a cinética de crescimento de epimastigotas, comportamento no vetor, análises de esquizodemas, zimodemas e DNA, composição antigênica, comportamento em animais isogênicos e infectividade para células de cultura (Dvorak et al., 1980; Garcia., Dvorak, 1980; Morel et al., 1980; Dvorak et al., 1982; Brongertz., Dvorak, 1983; Postan et al., 1983).

Existe um modelo chamado 'Two-Hybridization' (Westenberger et al., 2005) que defende a ideia de uma hibridização entre os grupos de *T. cruzi* TcI e TcII, resultando nos grupos TcIII e TcIV, seguido de uma segunda hibridização entre TcII e TcIII para a produção de TcV e TcVI, como mostrado na Figura 8.

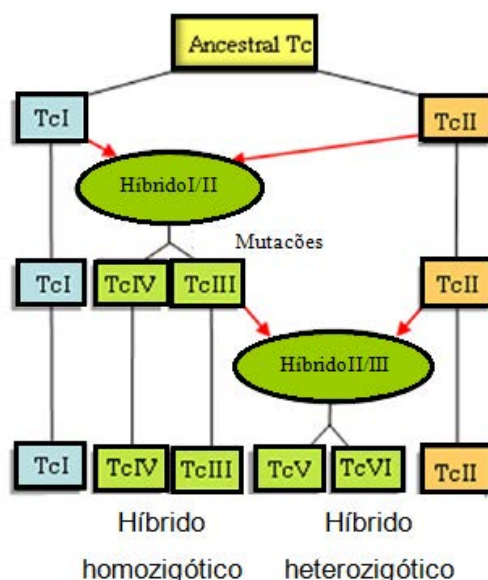


Figura 8. Modelo “Two-Hybridization” que evidencia as trocas genéticas durante a evolução de *T. cruzi*. Os retângulos indicam os diferentes “DTUs” e as caixas ovais indicam as fusões entre duas células e a troca de material genético. As linhagens mitocondriais são evidenciadas pelas diferentes cores (Modificado de Zingales, B. et al., 2012).

Recentemente, com base na análise das porções que codificam os genes 24Sα rDNA, GPI e HSP60 por meio da reação de PCR as cepas de *T. cruzi* foram divididas em seis grupos (Lewis et al. 2009; Zingales et al. 2009). As análises do DNA das cepas coletadas em Quaraí - RS as enquadram no grupo III. As cepas coletadas em Monte Negro - RO as enquadram no grupo I e as cepas coletadas em

Santo Inácio - BA as enquadraram no grupo II, o mesmo grupo da cepa Y, utilizada como controle positivo.

5.3. Eco-epidemiologia dos DTUs

As associações entre vetor, ecótopo e hospedeiro e os seis tipos de DTUs foi discutida por Zingales, B. et al. 2012. Demonstraram que há uma relevância na compreensão entre os diferentes DTUs e a eco-epidemiologia da doença de Chagas, como mostra a Figura 9.

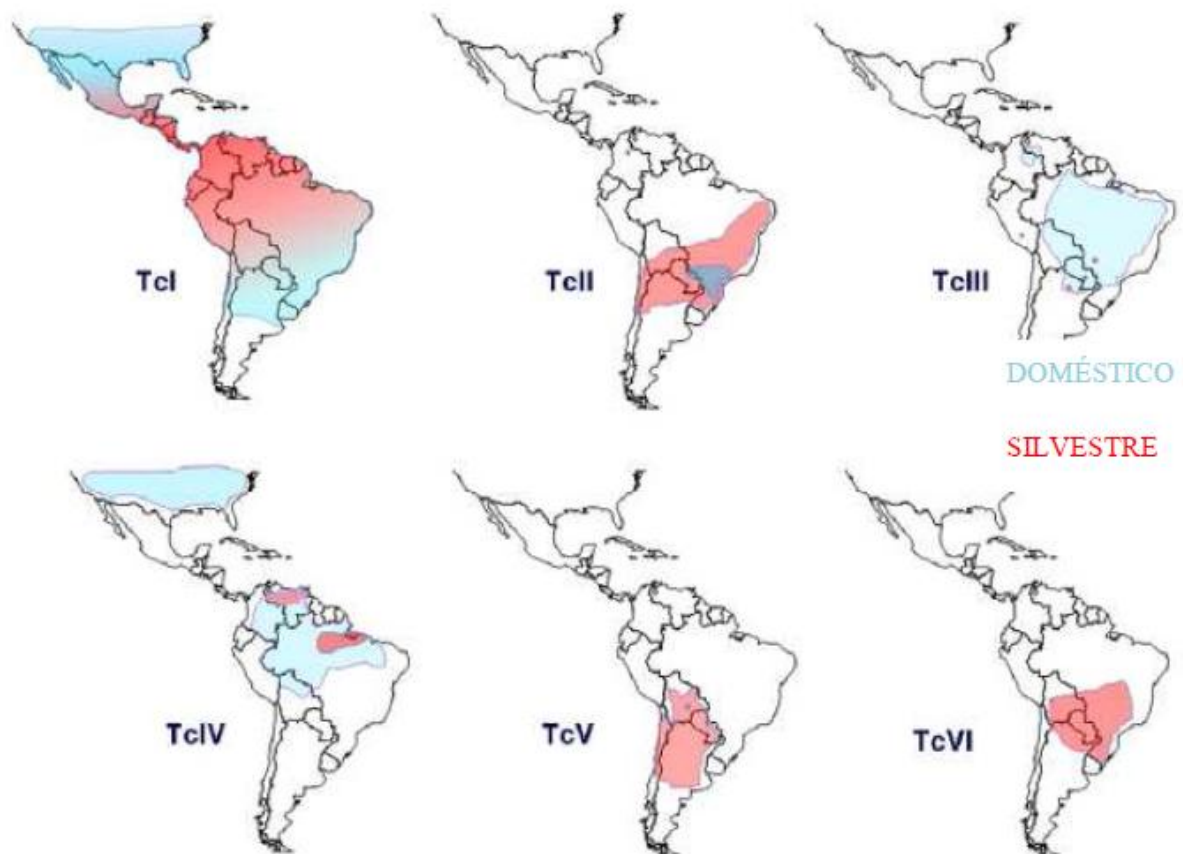


Figura 9. Distribuição aproximada dos DTUs de *T. cruzi* no ciclo doméstico e silvestre. (Modificado de Zingales, B. et al., 2012).

As cepas RON₁ e RON₃ isoladas de *Rhodnius montenegrensis* coletados no município de Monte Negro - RO foram identificadas como pertencentes à linhagem TcI, estando de acordo com Zingales, B. et al., 2012 em que refere TcI como sendo

encontrada no sul da América do Norte, América Central e a grande maioria da América do Sul, abrangendo todo o território brasileiro.

As cepas SI₅ e SI₉ isoladas de *Triatoma sordida* coletados no município de Santo Inácio - BA foram identificadas como pertencentes à linhagem TcII, estando também de acordo com Zingales, et al., 2012 em que refere TcII como sendo encontrada na região central da América do Sul e parte da região Nordeste do Brasil.

Já as cepas QMM₆ e QMM₇ de *T. cruzi* isoladas de *Triatoma rubrovaria* coletados no município de Quaraí – RS, objeto deste estudo, foram identificadas como pertencentes à linhagem TcIII. Zingales, et al., 2012, admitem que TcIII encontra-se na América do Sul, porém não abrange a região do Rio Grande do Sul. Sendo assim, ainda não é possível distinguir totalmente a história ecológica e os DTUs de *T. cruzi* devido ao grande número de amostras e sua complexidade biológica e molecular (Zingales, et al., 2012).

6. CONCLUSÃO

- ✓ O estudo da cinética de crescimento mostrou que as cepas QMM₆, RON₃ e SI₉ possuem mesmo perfil de crescimento com pico no 7º dia, e as cepas QMM₇, RON₁ e SI₅ possuem perfil de crescimento com pico no 8º dia.
- ✓ Por meio da caracterização molecular observou-se que as cepas RON₁ e RON₃ pertencem ao grupo TcI, as cepas SI₅ e SI₉ pertencem ao grupo TcII enquanto que as cepas QMM₆ e QMM₇ pertencem ao grupo TcIII.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apt W, Aguilera X, Arribada A, Gomez L, Miles MA, Widmer G. Epidemiology of Chagas disease in northern Chile: isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* from domestic and sylvatic transmission cycles and their association with cardiopathy. Am J Trop Med Hyg. 1987, Sep; 37(2):302-7.

Brener, Z., 1972. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with

Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 4:380-396.

Brener, Z. and Krettli, A. U. 1976. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. J. Immunol. 116:755-760.

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

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.

Breniere SF, Carrasco R, Antezana G, Desjeux P & Tibayrenc M (1989) Association between *Trypanosoma cruzi* zymodemes and specific humoral depression in chronic Chagasic patients. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 83: 517.

Breniere SF, Tibayrenc M, Antezana G, Pabon J, Carrasco R, Selaes H & Desjeux P (1985) Preliminary results in favor of a weak or non-existent relationship between the clinical forms of Chagas disease and *Trypanosoma cruzi* isozymic strains. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Series III. 300: 555-557.

Buscaglia, C.A., Campo, V.A., Frasch, A.C., Di Noia, J.M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. Nat Rev Microbiol. 2006 Mar;4(3):229-36.

Camargo, E. P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosoma in liquid media. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 6, 93–100.

Chagas, C. (1909). Nova tripanozomase humana. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1, 159–218.

Chagas, C. (1911). Moléstia de Carlos Chagas. II Conferência realizada na Academia Nacional de Medicina (1911). In: Carlos Chagas. Coletânea de Trabalhos Científicos (A. R. Prata, org.), pp. 167-192, Brasília: Editora Universidade de Brasília.

Coura, J.R. and Pinto Dias, J.C. (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. Mem. I. Oswaldo Cruz 104, 31–40.

Clayton, J. Chagas disease 101. Outlook, 2010.

D'ávila, D. A.; Gontijo, E. D.; Lages-Silva, E.; Meira, W. S. F.; Chiari, E.; Galvão, L. M. C. Random amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* isolates from chagasic patients with different clinical forms. *Parasitology Research*, v. 98, p. 455-461, 2006.

D'ávila, D. A.; Macedo, A. M., Valadares, H. M. S., Gontijo, E. D., De Castro, A. M., Machado, C. R., Chiari, E. and Galvão, L. M. C. Probing Population Dynamics of *Trypanosoma cruzi* during Progression of the Chronic Phase in Chagasic Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2009, p. 1718–1725.

Dias, E. 1934. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 28: 1-110.

Dias J.C.P. (2000). Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad. Saúde Publica* 16 Suppl 2, 43-59.

Dias, J.C.P.; Brener, Z. & Macedo, MA. 1984. Quimioprofilaxia da doença de Chagas em transplante renal com doador infectado. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 17 (Suplemento) :32.

Galvão, C., Justi, S. A., Russo C. A. M., Mallet J. R. S. and Obara, M. T. 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasites & Vectors* 2014, 7:149.

Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GAJ, Acosta N, de Arias AR, Miles MA, 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421: 936–939.

Heath S.; Hieny S.; Sher, A. A cyclic AMP inducible gene expressed during development of infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 43, p. 133 - 142, 1990.

Lages-Silva, E.; Crema, E.; Ramirez, L. E.; Macedo, A. M.; Pena, S. D.; Chiari, E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasio megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.65 (5), p.435-441, 2001.

Lages-Silva, E.; Ramírez, L. E.; Pedrosa, A. L.; Crema, E.; Galvão, L. M. C.; Pena, S. D. J. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J. Clinical Microbiology*, v. 44 (6), p. 2167-2171, 2006.

Lewis, M. D., Ma, Jonathan, Yeo, M., Carrasco, J. H., Llewellyn, S. M. and Miles, A. M. (2009). 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, 104–1049.

Macedo A.M., Machado C.R., Oliveira R.P. & Pena S.D. (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 99, 1-12.

Macedo A.M. e Pena S.D.J. (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today* 14, 119-123.

Martinez, I. Caracterização de duas cepas de *Trypanosoma cruzi*, Chagas, 1909 (Kinetoplasridae) 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 MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*. 2009 Oct; 136(12):1509-28.

Oliveira, M. T.; Lana, M. e Martins, H. R. Genotipagem de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos de dois municípios da região do Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, 2012.

Pelli, A. et al. Parametros populacionais para *Triatoma sordida* Stal, 1859, o vetor mais frequente da doença de Chagas no Triangulo Mineiro (Heteroptera, Triatominae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.4, n.1, p. 25 - 28, 2007.

Ribeiro, A. R. et. al. *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 48(2): 295-302, 2014.

Ribeiro, A. R. et al. Caracterização biológica e molecular de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas da Bahia, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2014.

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.

Rosa, J. A. da. et. al. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa*, 3478: 62-76, 2012.

Silva, L. H. P.; Nussenzweig, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clínica et Biologica*, v.20, p.191-208, 1953.

Silva, R. A., Rodrigues, V. L. C. C., Carvalho, M. E. and Pauliquévis, C. (2003). Programa de controle da doença de chagas no Estado de São Paulo: persistência de alta infestação por triatomíneos em localidades na década de 1990. *Caderno de Saúde Pública* 19, 965–971.

Silveira, A. C.; Costa, J. R. Doença de Chagas e controle do vetor: desafios atuais, habitacionais e ambientais. *Revista de Patologia Tropical*, v. 29, p. 199 - 212, 2000.

Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A. and Zingales, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 83, 141–152.

Sturm, N. R., Vargas, N. S., Westenberger, S. J., Zingales, B. and Campbell, D. A. (2003). Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology* 33, 269–279.

Toledo MJ, Bahia MT, Veloso VM, Carneiro CM, Machado-Coelho GL, Alves CF, Martins HR, Cruz RE, Tafuri WL, Lana M. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Jun;53(6):1045-53. Epub 2004 Apr 21.

Toledo M. J., DE L.M., Carneiro, C.M., Bahia M.T., Machado-Coelho G.L., Veloso V.M., Barnabe C., Tibayrenc M. & Tafuril W.L. (2002). Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp.Parasitol.* 100, 161-172.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, D'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 2000 May;156(5):1805-9.

Westenberger S. J., Barnabè C., Campbell D. A., Sturm N. R., (2005). Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*. 171, 527-543.

World Health Organization (2015). Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet N° 340 (updated march 2015).

Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Acosta N, Bhattacharyya T, Diosque P, Carrasco HJ and Miles MA. Multilocus Sequence Typing (MLST) for Lineage Assignment and High Resolution Diversity Studies in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. June 2011; 5(6): e1049.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. S., Campbell, D. A., Chiari, E. and Fernandes, O. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054.

Zingales, B.; Miles, M. A.; Campbell, D. A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A. M.; Teixeira, M. M. G.; Schijman, A. G.; Llewellyn, M. S.; Lages-Silva, E.; Machado, C. R.; Andrade, S. G.; Sturm, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological, relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v.12, p.240 - 253, 2012.

Zingales B., Souto R.P., Mangia R.H., Lisboa C.V., Campbell D.A., Coura J.R., Jansen A. & Fernandes O. (1998). Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int.J.Parasitol.* 28, 105-112.

Araraquara, 18 de dezembro de 2015.

Gabriela Eloisa Maana Wollmann

De acordo,

João Aristeu da Rosa
orientador