

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

IMPACTO DE INFECÇÕES MISTAS POR CLONES DE
Trypanosoma cruzi PERTENCENTES AOS GRUPOS GENÉTICOS
PRINCIPAIS SOBRE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO
PARASITO EM CAMUNDONGOS BALB/c.

Autora: *Helen Rodrigues Martins*

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

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Mara Macedo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Imunobiologia de Protozoários.

Ouro Preto, MG

2005

M386i Martins, Helen Rodrigues.

Impacto de infecções mistas por clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos grupos genéticos principais sobre propriedades biológicas do parasito em camundongos BALB/c[manuscrito]. / Helen Rodrigues Martins. – 2005.

xvi, 101f.: il., color; graf., tabs.

Orientador: Dr^a. Marta de Lana.

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Andréa Mara Macedo.

Área de concentração: Imunobiologia de protozoários.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

1. Biologia - Teses. 2. – *Trypanosoma cruzi*. – Teses. 3. Infecção mista Teses. 4. Parasitologia – Teses. 5. Divergência Filogenética – Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. II. Título.

CDU: 616.937

*“As coisas que realizamos,
nunca são tão belas quanto às que sonhamos.
Mas às vezes nos acontecem coisas tão belas,
que nunca pensamos em sonhá-las “.*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Marta de Lana, que durante todos esses anos de convivência, jamais poupou estímulos, me incentivando a trilhar o intrigante mundo da Ciência, com senso crítico, ética e entusiasmo.

À Prof. Andréa Macedo pelas importantes contribuições e atenciosa co-orientação desse trabalho.

Ao Prof. Max Jean, que acompanhou os meus primeiros passos pelo caminho da Ciência, sempre paciente, comprometido e dedicado à investigação.

À Prof. Cláudia Carneiro, pelo carinho, companheirismo, boa vontade em auxiliar sempre e contribuir com idéias práticas nos momentos de confusão e euforia.

À Prof. Maria Terezinha Bahia pelas sugestões e boas idéias que muito contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

À Vanja Maria Veloso, pela amizade, diligência em ensinar, colaboração irrestrita em tudo que foi necessário para a realização desse trabalho, pela perseverança e otimismo a procura dos “tripos” para infectar os animais, dia após dia, horas sem fim.

Ao Prof. Alexandre B. Reis, pela amizade, disposição em ajudar nas horas difíceis, na correria em busca dos camundongos para montar esses experimentos que pareciam impossíveis de serem realizados e pelos diálogos valiosos.

Ao Prof. George L. L. Machado Coelho pela paciente colaboração na análise estatística.

Ao Dr. Michel Tibayrenc pela concessão dos clones utilizados nesse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos alunos de iniciação científica Lorena, Ricardo, Fábio, Jaqueline, LÍlian, Rodrigo, Daniela, Bruna, Reinaldo, Marina, Ivo, Sérgio e Stêfany pela agradável convivência e importante contribuição para a realização desse trabalho, sem a qual a concretização desse projeto não seria possível.

À querida Daniela Maria, pela cumplicidade e preciosa ajuda no Natal e ano novo, quando tudo parecia impossível...

Ao Prof. Elío Hideo Babá pela gentil convivência, paciência em contornar os transtornos advindos do transporte de camundongos da UFMG para Ouro Preto e por disponibilizar equipamentos e reagentes sempre que necessários.

Aos Profs. Ieso Miranda, Luís Carlos Crocco, Milton Hércules e Renata Guerra que sempre foram muito atenciosos em esclarecer dúvidas, oferecer sugestões e disponibilizar seus laboratórios para realização de várias etapas desse projeto.

A todos os professores do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas pelos conhecimentos ministrados e cordial convivência.

Aos técnicos administrativos, Maria Chaves, Ramiro e Ana que sempre me apoiaram fornecendo todos os materiais necessários à realização desse trabalho.

À Cida, querida amiga, sempre solícita a nos entender e apaziguar as horas difíceis.

Aos bioteristas João Henrique, Cláudio, Marcos, Rosália, Selma e em especial a Cristina pela manutenção e cuidado com os animais.

AGRADECIMENTOS

Ao Gilmar, do CEBIO-UFMG, que sempre foi muito prestativo em atender nossas emergências.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Bioquímica da UFMG, pela acolhida calorosa e em especial ao Helder e Jorge, sempre muito atenciosos em me introduzir nos ensinamentos de microssatélites.

Aos meus colegas de Pós-graduação pelo aprazível e alegre convívio.

Às amigas Elaine Amaral Leite e Ruth Elizabeth Cruz pela amizade e por tornarem minha estada em Ouro Preto mais agradável e saudosa.

À minha querida família, Mamãe, Elbert, Elaine e Samira, por me apoiar, compreender minha ausência proveniente da dedicação exigida por esse trabalho. O amparo, a atenção e o amor de vocês são o fundamento que me incentivam nessa caminhada.

Em especial, ao Marcelo, pelo carinho, compreensão e amor ao longo do caminho. Vencemos juntos mais essa etapa para buscarmos novos caminhos.

*À Deus, fiel e benevolente,
que maravilhas tem operado em minha vida.*

RESUMO

Oito estoques clonais de *Trypanosoma cruzi*, dois de cada um dos genótipos principais 19 e 20 (*T. cruzi* I), 39 (híbrido) e 32 (*T. cruzi* II) foram combinados em 24 infecções mistas diferentes e estudadas em camundongos BALB/c. Em cada uma das infecções mistas, os animais foram inoculados com 5.000 tripomastigotas sanguíneos de cada clone por animal e comparados com a correspondente infecção monoclonal cujo inóculo foi de 10.000 tripomastigotas do clone por animal. Foram analisados oito parâmetros: percentual de infectividade, percentual de mortalidade e percentual de positividade da hemocultura, período pré-patente, período patente, pico máximo de parasitemia, dia do pico máximo de parasitemia e parasitemia. Três comparações foram realizadas: (a) infecção monoclonal x infecção mista baseada nos valores esperados (b) infecção monoclonal x infecção mista baseada nos valores observados (c) valores esperados x valores observados para as infecções mistas. Ocorreram diferenças significativas na maioria dos parâmetros estudados, tendo sido observadas diferentes percentagens de alterações, variando de 4,2 a 79,2%. A parasitemia foi o parâmetro que apresentou maior percentagem de alteração ocorrendo em praticamente todas as combinações genotípicas de *T. cruzi*. Foi observado aumento significativo em oito misturas e diminuição em 11, representando alterações em 19 das 24 combinações. Em um dos casos, foi observado efeito inibitório recíproco completo de um clone sobre o outro. A análise dos outros quatro parâmetros associados a parasitemia também demonstraram diferenças significativas entre os valores observados e esperados nas infecções duplas em diferentes proporções: 45.83% para PPP, 62.5% para PP, 66.6% para PMP e 33.3% para DPMP. Quando esses parâmetros foram considerados em conjunto, 11, 14, 11, 11, 15 e seis diferenças entre os valores observados e esperados foram detectadas nas combinações genotípicas 19+20, 19+39, 19+32, 20+39, 39+32 e 20+32, respectivamente. O menor número de diferenças significativas ocorreu exatamente na mistura 20+32, com clones filogeneticamente mais distantes e biologicamente mais distintos. Esses resultados enfatizam a importância de se considerar a possibilidade de ocorrência de infecções mistas e suas consequências para o hospedeiro, na patogênese e na evolução da doença de Chagas.

ABSTRACT

Eight *Trypanosoma cruzi* clonal stocks, two of each principal *T. cruzi* genotypes 19 and 20 (*T. cruzi* I) and 39 (hybrid) and 32 (*T. cruzi* II) were combined in 24 different double infections and studied in BALB/c mice. For the mixed infections, animals were inoculated with 5.000 blood trypomastigotes of each clone and compared with the correspondent monoclonal infection whose animals were inoculated with 10.000 blood trypomastigotes of the clone. Eight parameters were analyzed: percentage of infectivity, percentage of mortality, percentage of positive hemoculture, pre-patent period, patent period, maximum of parasitemia, day of maximum of parasitemia and parasitemia. Three comparisons were considered: (a) monoclonal infection x mixed infection based on expected values; (b) monoclonal infection x mixed infection based on observed values and (c) expected x observed values for mixed infections. Significant differences occurred in the majority of the studied parameters. It was observed different percentages of alterations with rates that varied from 4,2% to 79,2%, except for infectividade and mortality. Differences of parasitemia occurred in almost all *T. cruzi* genotypes combinations. Significant increase (eight mixtures) and decrease (11 mixtures) of parasitemia occurred in 19 out of 24 combinations. In one case, it was observed a complete and reciprocal inhibitory effect of one clone to another. The analysis of others four parameters associated with parasitemia also showed significant differences between the expected and observed values in double-infections in different proportions: 45.83% for PPP, 62.5% for PP, 66.6% for MP and 33.3% for DMP. When all parameters were considered together, 12, 14, 11, 11, 15 and six significant differences between the expected and observed values were detected in the genotypes combinations 19+20, 19+39, 19+32, 20+39, 39+32 and 20+32 respectively. The lowest number of significant differences occurred exactly in the mixture 20+32, with clones more phylogenetically distant and biologically different. These results emphasize the importance of to consider the possibility of occurrence of mixed infections and their consequences to the host, on the pathology and on Chagas disease evolution.

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Hospedeiros e origem geográfica dos oito clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais 19, 20, 39 e 32.....**27**

Tabela II: Combinação dos clones representativos dos grupos genéticos 19, 20, 39 e 32 de *Trypanosoma cruzi* utilizados em infecções mistas de camundongos BALB/c.....**29**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Dendograma mostrando a divergência filogenética entre os oito clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais em estudo, construído pela UPGMA, usando a matriz de distância genética de Jaccard (1908), obtida pela análise isoenzimática de 22 locos genéticos e RAPD.....28
- Figura 2:** A - Curvas de parasitemia do clone A para o inóculo de 5.000 tripomastigotas sanguíneos por animal (A), 10.000 TS/animal (2A) e a média teórica de 2A (AT) B - Curvas de parasitemia média das infecções monoclonais pelos clones A e B e a infecção mista teórica A+B.....36
- Figura 3:** Percentagem de diferenças significativas entre os valores esperados e observados nos parâmetros avaliados em infecções mistas por estoques clonais de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais.....37
- Figura 4:** Número de diferenças significativas entre os valores esperados e observados nas infecções mistas por estoques clonais de *Trypanosoma cruzi* nas combinações genotípicas estudadas.....38
- Figura 5:** Taxas de infectividade avaliadas em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e mistas por clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais.....39
- Figura 6:** Taxas mortalidade avaliadas em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e mistas por clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais.....40
- Figura 7:** Taxas de positividade da hemocultura avaliadas em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e mistas por clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais.....41
- Figura 8:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 20 representados por Gamba cl1 (+ virulento) e P209 cl1 (+ virulento).....45
- Figura 9:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 20 representados por OPS21 cl11 (- virulento) e Cuica cl1 (- virulento).....46
- Figura 10:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 20 representados por Gamba cl1 (+ virulento) e Cuica cl1 (- virulento).....47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 11:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 20 representados por OPS21 cl11 (- virulento) e P209 cl1 (+ virulento).....**48**
- Figura 12:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 39 representados por Gamba cl1 (+ virulento) e Bug2148 cl1 (+ virulento).....**49**
- Figura 13:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 39 representados por OPS21 cl11 (- virulento) e SO3 cl5 (- virulento).....**50**
- Figura 14:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 39 representados por Gamba cl1 (+ virulento) e SO3 cl5 (- virulento).....**51**
- Figura 15:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 39 representados por OPS21 cl11 (- virulento) e Bug2148 cl1 (+ virulento).....**52**
- Figura 16:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 32 representados por Gamba cl1 (+ virulento) e IVV cl4 (+ virulento).....**53**
- Figura 17:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 32 representados por OPS21 cl11 (- virulento) e MAS cl1 (- virulento).....**54**
- Figura 18:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 32 representados por Gamba cl1 (+ virulento) e MAS cl1 (- virulento).....**55**
- Figura 19:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 32 representados por OPS21 cl11 (- virulento) e IVV cl4 (+ virulento).....**56**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 20:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 39 representados por P209 c11 (+ virulento) e Bug2148 c11 (+ virulento).....**57**
- Figura 21:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 39 representados por Cuica c11 (- virulento) e SO3 c15 (- virulento).....**58**
- Figura 22:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 39 representados por P209 c11 (+ virulento) e SO3 c15 (- virulento).....**59**
- Figura 23:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 39 representados por Cuica c11 (- virulento) e Bug2148 c11 (+ virulento).....**60**
- Figura 24:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 32 representados por P209 c11 (+ virulento) e IVV c14 (+ virulento).....**61**
- Figura 25:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 32 representados por Cuica c11 (- virulento) e MAS c11 (- virulento).....**62**
- Figura 26:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 32 representados por P209 c11 (+ virulento) e MAS c11 (- virulento).....**63**
- Figura 27:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 32 representados por Cuica c11 (- virulento) e IVV c14 (+ virulento).....**64**
- Figura 28:** Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 39 e 32 representados por Bug2148 c11 (+ virulento) e IVV c14 (+ virulento).....**65**

LISTA DE FIGURAS

Figura 29: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 39 e 32 representados por SO3 c15 (- virulento) e MAS c1 (- virulento).....**66**

Figura 30: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 39 e 32 representados por Bug2148 c11 (+ virulento) e MAS c11 (- virulento).....**67**

Figura 31: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 39 e 32 representados por SO3 c15 (- virulento) e IVV c14 (+ virulento).....**68**

LISTA DE ABREVIATURAS

BZ	Benznidazol
CEBIO	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas
DPM	Dia do pico máximo de parasitemia
DTU	Discrete Typing Unit
EUA	Estados Unidos da América
INF	Infectividade
KS	Teste de Kolmogorov-Sminorv
LIT	Liver Infusion Triptose
LSSP-PCR	Low-Stringency Single specific Primer PCR
MN	Teste de Mann-Whitney
MOR	Mortalidade
P	Nível P de significância
PAR	Parasitemia
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Pulsed FieldGgel Electrophoresis
PPP	Período Pré-Patente
PMP	Pico Máximo de Parasitemia
PP	Período Patente
RAPD	Randomly Amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RJ	Rio de Janeiro

LISTA DE ABREVIATURAS

RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SL	Splice Leader
SSR-PCR	Single Sequence Repeat anchored primer PCR
TS	Tripomastigotas sangüíneos
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPGMA	Média aritmética não ponderada
WHO	World Health Organization
%	Porcentagem
HEM+	Positividade de hemocultura
χ^2	Teste do qui-quadrado
Z	Zimodema

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da Doença de Chagas	2
1.2	<i>O Trypanosoma cruzi</i>	4
1.2.1	Variabilidade Biológica	5
1.2.2	Variabilidade Molecular	6
1.3	Estrutura Populacional do <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.4	Impacto da Variabilidade Genética do Parasito sobre suas Propriedades Biológicas e Clínicas.....	16
1.5	Infecções Mistas	22
1.6	Justificativa.....	23
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	Estoques Clonais de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
3.2	Infecções Experimentais.....	28
3.3	Avaliações Parasitológicas	30
3.3.1	Exame a Fresco	30
3.3.2	Hemocultura.....	30
3.4	Parâmetros Avaliados.....	30
3.4.1	Infectividade (INF)	30
3.4.2	Mortalidade (MOR)	30
3.4.3	Taxa de Positividade da Hemocultura (+HEM)	31
3.4.4	Período Pré-patente (PPP)	31
3.4.5	Período Patente (PP)	31
3.4.6	Pico Máximo de Parasitemia (PMP).....	31
3.4.7	Dia do Pico Máximo (DPMP)	31
3.4.8	Parasitemia (PAR)	32
3.5	Análise de Dados	32

4	RESULTADOS	34
4.1	Análise Global dos parâmetros por Combinação Genotípica	37
4.2	Infectividade	38
4.3	Mortalidade	39
4.4	Taxa de Positividade da Hemocultura	40
4.5	Período Pré-patente	41
4.6	Período Patente	42
4.7	Pico Máximo de Parasitemia	42
4.8	Dia do Pico Máximo de Parasitemia	42
4.9	Parasitemia	43
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÕES	80
7	PERPECTIVAS	82
7.1	Identificação dos clones isolados de infecções mistas não tratadas por hemocultura.....	83
7.2	Identificação dos clones isolados de infecções mistas não tratadas em eluato de sangue.....	83
7.3	Identificação dos clones presentes nos tecidos do hospedeiro.....	83
7.4	Tratamento de infecções mistas.....	84
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é um parasito intracelular obrigatório amplamente distribuído no continente americano, abrangendo regiões desde o norte dos Estados Unidos até o sul da Argentina (WHO, 1991). O ciclo desse parasito é primitivamente enzoótico, com diversas espécies de mamíferos silvestres e de triatomíneos albergando o parasito em uma inter-relação harmônica e equilibrada, estabelecida após anos de evolução (Barretto, 1979; Forantini, 1980; Dias, 1993; Fernandes *et al.*, 1998a). A interferência da ação humana em ambientes primitivos, através de intensa dispersão populacional e mudanças ecológicas drásticas, propiciou o contato de agentes vetores com hospedeiros susceptíveis em amplas áreas da América Latina, resultando no surgimento dessa enfermidade como zoonose. Isso perturbou fortemente a ecologia dos vetores e conduziu a uma reestruturação de focos naturais da doença com seu deslocamento para o ambiente doméstico. A doença de Chagas é um exemplo típico de uma moléstia que se estabeleceu como fruto da ação humana no ambiente e das desigualdades sociais, uma vez que a má qualidade das habitações facilitou a domiciliação dos vetores (Dias, 1992; Dias, 1993; Dias *et al.*, 2002; Walter, 2003). Em regiões onde a ocupação de ecótopos primitivos não possibilitou o contato íntimo do vetor com o homem, seja pelas melhores condições de moradia ou pela menor capacidade de domiciliação do vetor, não se observou estabelecimento da doença (Dias, 2000a).

O advento da urbanização faz surgir um novo panorama, demonstrando ser a transfusão sangüínea uma importante via de transmissão da doença de Chagas, devido ao grande contingente de indivíduos chagásicos que migraram de regiões rurais endêmicas para as zonas urbanas em expansão (WHO, 1991; Dias, 1992). A transmissão congênita constitui o terceiro mais importante mecanismo de transmissão da doença de Chagas, com risco variando entre 0,5 a 10% em diferentes regiões geográficas (Dias, 2000a; Bittencourt, 2000).

Estima-se que 13 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* na América Latina e que 100 milhões estão em risco de contrair a infecção. A taxa de incidência é de 200.000 novos casos por ano e a taxa anual de morte, devido à forma cardíaca da doença, é aproximadamente de 21.000 casos (WHO, 2003). A iniciativa de Controle da

Doença de Chagas pelos países do Cone Sul e posteriormente por outras organizações reduziu substancialmente a incidência da infecção na América Latina (Moncayo, 2003). Contudo, a doença permanece como um sério problema de saúde pública, tanto pela falta de sustentabilidade das medidas de controle pelos órgãos governamentais, quanto pelo grande número de pessoas infectadas não diagnosticadas precocemente. Tais indivíduos podem desenvolver uma doença silenciosa, debilitante, com quadros clínicos complexos e diversos (Dias, 1992; Macedo, 1997), refratária ao tratamento específico, extremamente onerosa ao sistema de saúde e muitas vezes fatal.

Em 2000, oito estados brasileiros receberam certificado de interrupção da transmissão vetorial do *T. cruzi*, concedido pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000). Entretanto, por ser um país em desenvolvimento, sujeito a intensas transformações ambientais e albergando diversas espécies vetoras, o Brasil deve ser cauteloso e manter uma vigilância constante adaptada às condições epidemiológicas. No estado do Amazonas, que até recentemente era considerado livre da doença de Chagas, foram registrados 38 casos de 1969 a 1972 e 167 nos últimos oito anos (Coura *et al.*, 2002). Triatomíneos infectados têm sido encontrados no ambiente silvestre e no peridomicílio. Nesse estado, a infecção pelo *T. cruzi* é enzoótica e envolve uma variedade de mamíferos e pelo menos 10 a 16 espécies de triatomíneos silvestres. O intenso desflorestamento e as migrações humanas aumentam o risco de domiciliação de espécies vetoras e estabelecimento de novos focos de transmissão doméstica nessa região. Fernandes *et al.* (1999a) demonstraram em regiões próximas a grandes centros urbanos, na ilha de Jaguanum (RJ), que 90% dos marsupiais estão infectados pelo *T. cruzi*; segundo Lisboa *et al.* (2000) diversos espécimes de mico-leões dourados estão infectados pelo *T. cruzi* na Reserva de Poços das Antas, Rio de Janeiro.

Considerando o panorama atual da doença de Chagas, Dias (2000b) e Dias *et al.* (2002) apontam que essa endemia continuará incidindo, embora em proporções bem reduzidas, nas populações pobres e isoladas da América Latina, incapazes por si, de controlar a transmissão ou a doença. Atenção especial deverá ser dada em regiões que naturalmente convivem com o ciclo da doença, estabelecendo um sistema de vigilância epidemiológica efetivo, atenção médica e social aos milhares de infectados e avanços no tratamento específico/sintomático da doença.

Na história natural da doença de Chagas podem distinguir-se duas fases, uma aguda rápida e outra crônica de longa duração.

A fase aguda dura cerca de quatro a 12 semanas, e os parasitos podem ser detectados diretamente no sangue periférico do indivíduo infectado. Essa fase da doença é inaparente em 90% dos casos. Casos graves são, geralmente, associados às crianças menores de dois anos de idade, com quadro de morbi-mortalidade mais intenso, representado por miocardite e meningoencefalite aguda (Brener, 1992) e morte entre 1 a 45% dos casos (Dias, 1984).

Após a fase aguda, o indivíduo evolui naturalmente para a fase crônica, caracterizada pela dificuldade de detecção do parasito no sangue periférico. A maioria dos indivíduos (50-70%) desenvolve a forma indeterminada da doença crônica, caracterizada por um longo período assintomático que pode durar por toda a vida. Entretanto, mesmo após um longo período assintomático, 25 % dos indivíduos podem desenvolver a forma cardíaca da doença de Chagas, 6% a forma digestiva e 3% podem sofrer envolvimento nervoso periférico (Coura 1983, 1985; Pereira 1985). Os fatores determinantes da doença sintomática não foram completamente elucidados, mas acredita-se que a cepa do parasito, e fatores diretamente ligados ao hospedeiro estejam inter-relacionados.

1.2 O *Trypanosoma cruzi*

Taxonomicamente o *T. cruzi* enquadra-se no reino Protista, classe Kinetoplastidea, ordem Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* – grupo Stercoraria e subgênero *Schizotrypanum*.

A caracterização de populações de *T. cruzi* isoladas de diferentes origens e hospedeiros tem demonstrado uma grande diversidade de propriedades biológicas, bioquímicas, imunológicas, genéticas bem como de susceptibilidade a drogas.

1.2.1 Variabilidade Biológica

As diferenças entre isolados de *T. cruzi* foram inicialmente demonstradas através da caracterização biológica, considerando-se a morfologia das formas sanguíneas, virulência, tropismo tecidual e patogenicidade.

Chagas (1909) já descrevia diferenças morfológicas nas formas sanguíneas do parasito. Brener & Chiari (1963) e Brener (1965, 1969) confirmaram esses achados, demonstrando que formas delgadas, largas ou muito largas ocorriam em diferentes proporções nos diversos isolados do *T. cruzi*. Os autores verificaram que as formas finas são mais infectivas para células do hospedeiro vertebrado, mais sensíveis ao sistema imune e predominantes em cepas muito virulentas e macrofágicas. Em contrapartida, as formas largas são mais resistentes ao sistema imune, permanecendo mais tempo na circulação e mais presentes em cepas miotrópicas e de baixa virulência. Posteriormente, Brener (1977) sugeriu a classificação das cepas, baseado nos padrões da curva de parasitemia, em dois tipos polares: um pólo agressivo representado pela cepa Y e outro pólo mais brando representado pela cepa CL.

Viannia (1911) verificou que o *T. cruzi* poderia ser encontrado em diferentes tecidos do hospedeiro vertebrado, embora os parasitos apresentassem certa preferência por grupos celulares específicos. Estudos de tropismo tecidual comprovaram essa observação e estabeleceram a existência de cepas miotrópicas, reticulotrópicas e outras que apresentam preferência por diferentes tecidos (Silva & Nussenweig, 1953; Andrade & Andrade, 1966; Brener, 1977; Melo & Brener, 1978, Amaral *et al.*, 1975; Lenzi *et al.*, 1998).

Diferenças quanto ao grau de virulência e patogenicidade (Bice & Zeledon, 1970; Andrade, 1974; Andrade, 1985; Laura-Pires *et al.*, 1997), composição antigênica (Nussenweig & Goble, 1966) e sensibilidade a drogas (Brener *et al.*, 1976; Filardi & Brener, 1987) também foram verificadas entre as cepas de *T. cruzi*.

Andrade (1974), analisando essa variação entre isolados de *T. cruzi* sob o aspecto morfológico e comportamental em camundongos, propôs o primeiro critério de classificação para essa espécie. De acordo com esse estudo, três tipos foram estabelecidos:

- Tipo I – (cepa Y e Peruviana): multiplicação rápida, altos e precoces picos de parasitemia e mortalidade, predominância de formas finas e reticulotropismo na fase inicial da infecção;
- Tipo II – (16 cepas isoladas no Recôncavo Baiano - Estado da Bahia): multiplicação lenta, picos irregulares de parasitemia entre 12 e 20 dias, predominância de formas largas ao longo da infecção, mas com formas finas em pequeno número na fase inicial, miocardiotropismo e lesões predominando no miocárdio;
- Tipo III – (cepa Colombiana): multiplicação lenta, altos picos de parasitemia entre o 20^o e 30^o dias de infecção, baixas taxas de mortalidade, predominância de formas largas ao longo do curso da infecção com envolvimento predominante do músculo esquelético.

1.2.2 Variabilidade Molecular

Embora a caracterização biológica de isolados de *T. cruzi* seja essencial na determinação do papel das cepas na patogênese e terapêutica da doença (WHO, 1991), essa não constitui isoladamente uma ferramenta suficiente para a classificação sistemática de populações do parasito (Miles, 1979). O advento dos marcadores moleculares abriu novas perspectivas para o entendimento da doença de Chagas sob o ponto de vista da genética de população de parasitos, em uma visão integrada que engloba a diversidade genética dos três elos da cadeia epidemiológica (agente, vetor e hospedeiro). Isso permitiu correlacionar o impacto da variabilidade genética com propriedades biológicas do parasito, tais como patogenicidade, resposta terapêutica e epidemiologia da doença (Tibayrenc, 1998).

A heterogeneidade intraespecífica do *T. cruzi*, ao nível molecular, foi inicialmente demonstrada pela fenotipagem dos isolados do parasito através dos perfis de suas isoenzimas. Toyé (1974) foi o primeiro a verificar a variabilidade em isolados de *T. cruzi* utilizando o perfil eletroforético de isoenzimas. Miles *et al.* (1977, 1978) utilizando inicialmente um grupo de seis isoenzimas e posteriormente dezoito (Miles *et al.*, 1980; Miles *et al.*, 1981b,c.) sugeriram a classificação das populações naturais de *T. cruzi* isoladas no nordeste e Brasil central em três grupos distintos denominados zimodemas principais Z1, Z2 e Z3.

Vários estudos sugerem que no Brasil, há localidades apresentando o ciclo doméstico e silvestre isolados, outras em que esses se sobrepõem ou ainda transmissão enzoótica com raro envolvimento humano (Miles *et al.*, 1980). A caracterização de isolados dessas localidades tem demonstrado diferenças enzimáticas marcantes entre isolados domésticos e silvestres, que aparentemente circulam independentes (Miles, 1978; Miles *et al.* 1979, 1980; Coura *et al.*, 2002). No Brasil, o zimodema Z2 foi observado apenas no ambiente doméstico, causando doença aguda e crônica no homem e infectando uma variedade de outros hospedeiros domésticos. O Z1 e, menos comumente, Z3 foram predominantemente encontrados em ambientes silvestres, isolados de uma ampla variedade de mamíferos e vetores, mas, quando introduzidos nas casas, poderiam infectar o homem. O Z1 foi associado principalmente a mamíferos arbóreos e o Z3 a animais terrestres e tatus na Bacia Amazônica.

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

Tibayrenc & Ayala (1986) estudando os perfis isoenzimáticos de 121 amostras isoladas de vários hospedeiros em amplas áreas geográficas da América e clonadas por técnica de micromanipulação, evidenciaram a grande diversidade genética entre as populações de *T. cruzi*. A análise de 15 *locos* enzimáticos demonstrou a existência de 43 grupos genéticos distintos ou zimodemas, que foram denominados clones naturais. Esses dados demonstraram que a classificação inicial proposta em três grupos distintos não evidenciava satisfatoriamente a heterogeneidade genética do parasito, sendo que os Z1, Z2 e Z3 correspondiam aos zimodemas 17, 30 e 27, respectivamente. Posteriormente, Tibayrenc & Brenière (1988), verificaram que quatro dos clones naturais, representados pelos zimodemas 19, 20, 39 e 32, estavam presentes em maior frequência nos mais diversos hospedeiros e localidades geográficas, constituindo 53,7% dos isolados. Em decorrência dessa ubiquidade, propuseram que esses deveriam apresentar importante papel na epidemiologia da doença, sendo estudados posteriormente em vários aspectos. Veas *et al.* (1991) propuseram a caracterização molecular de isolados de *T. cruzi* dos genótipos principais com base na amplificação da

região variável do kDNA e hibridização com sondas sub-específicas diretamente no sangue de humanos e reservatórios ou fezes de triatomíneos.

Outros marcadores moleculares também têm demonstrado sucesso na detecção do polimorfismo genético em amostras de *T. cruzi*. A análise do kDNA com utilização de enzimas de restrição (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism) evidenciou que os minicírculos são heterogêneos em suas seqüências, podendo ser utilizados para a caracterização de diferentes populações do *T. cruzi* (Morel *et al.*, 1980). As populações caracterizadas por RFLP que apresentaram o mesmo perfil foram denominadas esquizodemas. As seqüências do minicírculo do kDNA mudam rapidamente, o suficiente para produzir diferenças entre cepas, mas não tão rapidamente que impeça uma análise laboratorial após estabelecimento de um estoque em hemocultura. Os resultados obtidos por essa técnica concordam com os perfis isoenzimáticos para os principais grupos, mas são mais discriminantes, demonstrando a existência de heterogeneidade dentro dos zimodemas. Sturm *et al.* (1989) otimizaram essa metodologia, realizando diretamente a digestão com enzimas de restrição do fragmento de 330pb, contendo as regiões variáveis do minicírculo, amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa estratégia aumentou a sensibilidade da técnica, possibilitando que o estudo de esquizodemas fosse realizado nas amostras biológicas, sem prévia expansão e manuseio em cultura.

Variações no tamanho das bandas cromossômicas têm sido evidenciadas em diferentes populações de *T. cruzi* e constituem uma ferramenta útil para o estudo do polimorfismo do parasito, através da técnica de PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis, Gibson & Miles, 1986; Henrkisson *et al.*, 1993).

Macedo *et al.* (1992), explorando o polimorfismo de minissatélites humanos (seqüências repetitivas em *tandem* de 10 a 15 nucleotídeos, presentes em milhares de cópias do genoma humano) obtiveram uma sonda multilocal humana que reconhece regiões de minissatélite no genoma do *T. cruzi*. A hibridização dessa sonda com o DNA nuclear do parasito, digerido com endonucleases de restrição, gera um padrão complexo de bandas específicas, denominado de impressão digital do DNA (DNA Fingerprint), que apresenta elevada correlação com a análise de esquizodema.

Polimorfismo no DNA genômico do parasito também foi detectado através da técnica de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA). Essa metodologia consiste

em uma reação em cadeia da polimerase que utiliza pequenos iniciadores de seqüências randômicas, as quais podem amplificar fragmentos anônimos no DNA alvo, gerando um padrão múltiplo de bandas cepa-específico. Essa técnica mostrou-se mais sensível que as análises de esquizodema e de impressão digital do DNA por requerer somente de 0,1 a 1,0ng de DNA total. Ela tem sido utilizada por diversos pesquisadores para a caracterização de cepas do parasito (Tibayrenc *et al.*, 1993; Steindel *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 1998). Tibayrenc *et al.* (1993) analisando 24 estoques clonais de *T. cruzi* previamente caracterizados por isoenzimas, ampliando a análise para 22 locos enzimáticos e utilizando 20 iniciadores aleatórios na análise de RAPD, demonstraram paridade entre as duas técnicas. Resultados similares foram obtidos por Steindel *et al.* (1993) que, ao analisar diversas cepas isoladas no estado de Santa Catarina, demonstraram uma clara similaridade genética, detectada pelo RAPD, entre cepas de um mesmo zimodema.

Pena *et al.* (1994) propuseram uma técnica denominada LSSP-PCR (Low-Stringency Single Specific Primer PCR) capaz de detectar mutações pontuais na seqüência de um fragmento de DNA previamente amplificado. Utilizando um único iniciador, complementar a um sítio específico do DNA molde, em baixas condições de estrigência, esse hibridiza com diversos sítios de maneira independente, gerando um padrão complexo de fragmentos que constitui uma assinatura gênica. Vago *et al.* (1996a,b) utilizando essa metodologia para avaliar a região variável do minicírculo do kDNA do *T. cruzi*, demonstraram o polimorfismo de cepas diretamente nos tecidos do hospedeiro. Essa técnica apresentou boa correlação com o DNA fingerprint.

A análise do genoma nuclear do *T. cruzi* tem demonstrado que as seqüências repetitivas representam aproximadamente 44% do DNA nuclear (Castro *et al.*, 1981; Lanar *et al.*, 1981), das quais muitas estão organizadas em *tandem*. Dentre elas estão os microsatélites, que correspondem a pequenas seqüências de DNA com motivos de repetição de até seis nucleotídeos, com elevado grau de polimorfismo em relação ao número de repetições em um dado loco. Aproveitando esta característica, Oliveira *et al.* (1997) aplicou a técnica de SSR-PCR (Single Sequence Repeat Anchored Primer PCR) para o estudo da variabilidade genética em *T. cruzi*, baseada na amplificação simultânea de vários locos entre as repetições (CA)_n de microsatélites utilizando iniciador com repetições (CA)₈RY ancoradas em um par de purina

pirimidina. De acordo com os autores, essa técnica produziu um perfil de múltiplas bandas, tão informativo e mais reprodutível que o RAPD. Posteriormente, Oliveira *et al.* (1998) caracterizaram oito locos polimórficos contendo microssatélites de repetição (CA)_n e os validaram como importante ferramenta para estudos taxonômicos e de genética de população. Pimenta (2002) caracterizou quatro novos locos de microssatélites com repetições de tri e tetranculeotídeos aplicáveis ao estudo de polimorfismo em *T. cruzi* diretamente em tecidos infectados.

1.3 Estrutura Populacional do *Trypanosoma cruzi*

Estudos de caracterização molecular em *T. cruzi* permitiram demonstrar o seu elevado polimorfismo genético e que as cepas, circulando entre vários hospedeiros silvestres e domésticos, consistem de mais de uma sub-população do parasito (Morel *et al.*, 1980; Deane *et al.*, 1984; Tibayrenc *et al.*, 1986; Marques de Araújo & Chiari, 1988; Carneiro *et al.*, 1990; Oliveira *et al.*, 1998).

Tibayrenc & Ayala (1988) propuseram que o *T. cruzi* apresenta estrutura e evolução predominantemente clonal. Isto implica que a reprodução sexual ou recombinação genética é um fenômeno extremamente raro nesta espécie; tão raro que não é capaz de impedir a existência de clones naturais estáveis no tempo. Desse modo, a variabilidade genética do parasito expressa o longo tempo de evolução separada de múltiplos clones e poderia explicar a grande variabilidade biológica e clínica do agente etiológico da doença de Chagas.

Diversos métodos de análise suportam a teoria clonal em *T. cruzi*, os quais permitem avaliar a ausência de segregação e de recombinação gênica, que são características dos organismos sexuados. Nesse sentido, Tibayrenc & Ayala (1988), analisando 21 isolados desse parasito, observaram que eles foram heterozigotos idênticos em três locos gênicos e apresentaram alguns dos correspondentes homozigotos ausentes, o que é incompatível com a ocorrência de segregação meiótica, que ocorre nos organismos sexuados. Ausência de recombinação é também fortemente reforçada, considerando que os genótipos em diferentes locos apresentaram forte desequilíbrio de

ligação. Se alelos em cada um dos 15 locos fossem combinados randomicamente, o número total de genótipos esperados seria de 7×10^{15} , pois todos poderiam ocorrer em baixa frequência. Entretanto, foram encontrados apenas 43 zimodemas, 16 dos quais diferindo em um único alelo. Além disso, alguns zimodemas (19, 20 e 39) foram amostrados repetidamente em diferentes regiões geográficas e períodos de tempo. O elevado grau de correlação observado entre os diversos marcadores nucleares e extranucleares também corrobora a ausência de recombinação.

Embora um grande número de marcadores tenha evidenciado um elevado grau de divergência genética entre as populações de *T. cruzi*, mais recentemente, estudos têm indicado uma clara subdivisão do parasito em duas linhagens filogenéticas principais (Souto & Zingales, 1993; Clark & Pung, 1994; Tibayrenc *et al.*, 1995; Souto *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1998; Bastrenta *et al.*, 1999) que se correlacionam amplamente aos zimodemas Z1 e Z2. Algumas cepas, todavia, tais como aquelas pertencentes a Z3, têm sua classificação controversa e requerem estudos mais detalhados (Anom, 1999).

Genes do RNA ribossomal (rRNA) são altamente conservados e encontrados repetidos em *tandem*, separados por regiões não transcritas no genoma dos tripanosomatídeos (Ramirez & Guervara, 1987). A análise comparativa de seqüências gênicas dessa região demonstra um elevado grau de homologia exceto para a região 3' do gene. Souto & Zingales (1993) desenhando iniciadores específicos para amplificar essa região, verificaram diferenças no tamanho dos produtos de amplificação entre diversas cepas de *T. cruzi*. Dois perfis foram inicialmente encontrados, sendo classificadas como Grupo 1 amostras que apresentam um fragmento de 125pb e em Grupo 2 aquelas com um fragmento de 110pb. A expansão no número de isolados analisados permitiu demonstrar a existência de um terceiro grupo de cepas que apresentaram as duas bandas, sendo classificadas como Grupo 1/2 (Souto *et al.*, 1996). Recentemente, Mendonça *et al.* (2002) analisando cepas pertencentes ao Z3, detectaram um fragmento de tamanho intermediário (117pb), correspondente a um novo tipo de rRNA.

A tendência de agrupamento de cepas de *T. cruzi* em duas ou três linhagens principais tem sido observada por diversos autores. Tibayrenc *et al.* (1993) já demonstravam a convergência de isolados de *T. cruzi* de diferentes regiões geográficas da América Latina para duas grandes subdivisões, claramente comprovada em um

estudo posterior através da análise de taxonomia numérica, baseada nos resultados de isoenzimas e RAPD (Tibayrenc *et al.*, 1995).

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

Os genes de mini-exons ocorrem em centenas de cópias repetidas em tandem no genoma dos tripanosomatídeos e são responsáveis pela codificação da seqüência “Splice Leader” (SL) presente na extremidade 5’ de todos os RNAs mensageiros. A análise comparativa de genes de mini-exons em cepas de *T. cruzi*, revelou dimorfismo na seqüência da região intergênica (Murthy *et al.*, 1992). Souto *et al.* (1996) estudando o polimorfismo do espaçador não transcrito do gene de mini-exon em diversas cepas do parasito, demonstrou a existência de dois grupos que apresentaram produto de amplificação de 300pb ou 350 pb. A associação dos perfis observados para os genes do rRNA e do mini-exon, permitiu classificar as cepas em três grupos: Grupo 1 (125 e 300pb), Grupo 2 (110 e 350pb) e Grupo 1/2 (ambos os produtos do rRNA com o fragmento do mini-exon do Grupo 1). A correlação desses marcadores com o RAPD distribuiu os isolados do Grupo 1 e 1/2 em um ramo da árvore filogenética o qual foi denominado Linhagem 2 e do grupo 2 em outro ramo, denominado Linhagem 1.

Posteriormente, Fernandes *et al.* (1998b) atentaram para o fato de algumas cepas do *T. cruzi* não apresentarem produto de amplificação para o gene do mini-exon. A clonagem e sequenciamento do gene de mini-exon para estas cepas, demonstraram 69% de homologia com a seqüência do gene de cepas do grupo 2, entretanto, continham uma inserção/deleção de 50pb na posição -80 em relação sítio inicial de transcrição e imediatamente abaixo da região transcrita. Essas cepas foram classificadas como Grupo 2’ e foram correlacionadas ao Z3 de Miles (Fernandes *et al.*, 1998b).

Oliveira *et al.* (1998) utilizando microssatélites para estudo de filogenia em *T. cruzi*, confirmaram resultados prévios baseados no domínio D7 do gene 24S α rRNA. Posteriormente, Macedo *et al.* (2001) evidenciaram que o grupo 2 pode se subdividido em dois subgrupos, sendo um deles mais relacionado ao grupo 1/2.

O DNA satélite em *T. cruzi* localiza-se em minicromossomos constituindo aproximadamente 9% do DNA nuclear e corresponde a uma longa seqüência em tandem de 195pb de repetição (Lanar *et al.*, 1981; Castro *et al.*, 1981; Sloof *et al.*, 1983). O DNA satélite diverge rapidamente de uma espécie a outra e fornece uma ferramenta útil para distinguir espécies relacionadas do gênero *Trypanosoma* (Ole-Mouyoi, 1987; Dickin & Gibson, 1989). Bastrenta *et al.* (1999) analisando 24 estoques de *T. cruzi*, previamente caracterizados para 22 locos enzimáticos e sete locos de RAPD, após digestão do DNA com enzimas de restrição e hibridização com uma sonda de 195pb para a região satélite, obtiveram dois padrões de RFLP correspondentes às duas linhagens filogenéticas principais. Os resultados encontrados nesse estudo se correlacionaram com os de Tibayrenc *et al.* (1993).

Desse modo, observa-se nos diversos estudos, que os pesquisadores têm descrito a diversidade genética do *T. cruzi*, revelada por diferentes marcadores, por meio de terminologias inumeráveis. Isso tem dificultado a correlação entre a genética, a complexa epidemiologia e a manifestação da doença. Em decorrência desse fato, no Encontro Satélite ocorrido durante o “Simpósio Internacional sobre os Avanços do Conhecimento da Doença de Chagas 90 anos após sua descoberta”, optou-se pela padronização da nomenclatura para esse parasito. Como estudos recentes têm indicado a convergência para duas subdivisões, ficou estabelecido que as cepas serão designadas como:

□ *T. cruzi* I quando equivalentes ao Z1 (Miles *et al.*, 1977; Barrett *et al.*, 1980), Tipo III (Andrade, 1974), Linhagem 2 (Souto *et al.*, 1996), Grupo 1 (Tibayrenc *et al.*, 1995), Ribodema II/III (Clark & Pung, 1994) e similares;

□ *T. cruzi* II quando forem equivalentes ao Z 2 (Miles *et al.*, 1977; Miles *et al.*, 1978; Barrett *et al.*, 1980), Zimodema A (Romanha *et al.*, 1979), Tipo II (Andrade, 1974), Linhagem 1 (Souto *et al.*, 1996), Grupo 2 (Tibayrenc *et al.*, 1995), Ribodema I (Clark & Pung, 1994) e similares;

□ *T. cruzi* quando não forem previamente caracterizadas ou cuja caracterização seja inconclusiva. Assim, a designação de cepas aparentemente híbridas

como o Zimodema Chileno 2b (Miles *et al.*, 1984), Zimodema 3 (Miles *et al.*, 1978), Zimodema B (Romanha *et al.*, 1979), Tipo I (Andrade, 1974), Grupo 1/2 (Souto *et al.*, 1996), Grupo 39 (Tibayrenc *et al.*, 1995) deverá ser decidida após estudos adicionais.

Entretanto o significado dessa subdivisão em duas grandes linhagens apresenta divergências de opinião (Brisse *et al.*, 2000a,b; Souto *et al.*, 1996; Macedo & Pena, 1998; Fernandes *et al.*, 1999b; Tibayrenc, 2003). Embora determinada especificidade em termos de epidemiologia, resposta a terapêutica e patogenicidade possa ser observada, algumas lacunas ainda permanecem para serem preenchidas. Por exemplo, ambas as linhagens têm sido isoladas de diferentes ciclos de transmissão. Enquanto, *T. cruzi* I tem sido identificado tanto em mamíferos silvestres na Bacia Amazônica, quanto no ciclo doméstico em países andinos, ambos dispersos por amplas regiões da América Latina, o *T. cruzi* II parece estar mais associado ao ciclo doméstico da doença.

Contudo, diversos trabalhos têm demonstrando uma maior complexidade do ciclo natural do parasito. Fernandes *et al.* (1999a) e Jansen *et al.* (1999) revelaram a presença de ambas as linhagens no ciclo silvestre, em estudos realizados em isolados da Mata Atlântica Brasileira (RJ) e no estado da Geórgia (EUA), respectivamente. Uma clara associação das linhagens principais do *T. cruzi* com diferentes hospedeiros foi verificada, com o *T. cruzi* I encontrado preferencialmente em marsupiais e *T. cruzi* II em mamíferos placentários. Cepas do zimodema 3, que até então tinham sido encontradas somente em casos agudos e no ciclo silvestre, foram também registradas em indivíduos chagásicos crônicos no Equador (Garzón *et al.*, 2002).

No Brasil, parece haver uma associação preferencial de *T. cruzi* I com o ciclo silvestre e de *T. cruzi* II com o ciclo doméstico da doença (Zingales *et al.*, 1998; Fernandes *et al.* 1998a, 1999a,b). Áreas com mais alta morbidade da doença apresentam a circulação de *T. cruzi* II, enquanto *T. cruzi* I é evidenciado em áreas onde a doença de Chagas é pouco freqüente e a morbidade baixa (Fernandes *et al.*, 1998a).

Variações geográficas na prevalência e forma clínica da doença de Chagas têm sido registradas. No Brasil, a forma indeterminada da doença de Chagas é mais comum, correspondendo a 70% dos casos, seguida pela forma cardíaca (20-30%) e digestiva (8-10%). Entretanto, no Brasil central e Chile, a forma digestiva é predominante, enquanto esta é praticamente inexistente na Venezuela e América Central

(Luquetti *et al.*, 1986; Dias, 1992). Entretanto, os fatores determinantes dessa heterogeneidade de manifestações em diferentes regiões geográficas ainda não foram completamente conhecidos e, possivelmente, não podem ser explicados exclusivamente pela genética do parasito quando se consideram apenas as duas grandes linhagens filogenéticas do *T. cruzi*.

Em relação à susceptibilidade a drogas, tem sido verificada uma maior resistência das cepas mais ao norte e centro do Brasil, quando comparadas àquelas isoladas especificamente ao sul do país, Argentina e Chile, coincidindo justamente em áreas onde há predomínio de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, respectivamente (Filardi & Brener, 1987; Toledo *et al.*, 1997; Apt *et al.*, 1998; Apt *et al.*, 2003). Trabalhos experimentais com amostras geneticamente caracterizadas reforçam essa tendência (Revollo *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2003), contudo, apontam para a grande diversidade observada entre os exemplares das duas grandes linhagens e a necessidade de se considerar subdivisões menores em *T. cruzi* em estudos dessa natureza.

Diversos marcadores multilocos sugerem a existência de subdivisões em *T. cruzi* (Tibayrenc, 1998; Barnabé *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2000a). Segundo Tibayrenc (1998), o *T. cruzi* pode ser subdividido em dois grandes grupos que reúnem estoques que são geneticamente similares e identificáveis por marcadores moleculares e imunológicos comuns. Essas subdivisões são denominadas DTU1 e DTU2 (Discrete Typing Unity 1 e 2).

A DTU1 corresponde a todos os genótipos relacionados ao *T. cruzi* I, que formalmente foram identificados como zimodema Z1. Representa um amplo e heterogêneo grupo, cuja identificação tem mais baixo valor preditivo em suas propriedades, enquanto a DTU2 parece apresentar maior especificidade geográfica e epidemiológica, sendo, portanto, sua identificação mais informativa (Barnabé *et al.*, 2000; Tibayrenc, 2003).

A DTU2 apresenta várias subdivisões menores chamadas de DTUs menores, correspondendo a DTUs 2a, 2b, 2c, 2d e 2e, das quais 2d e 2e são linhagens híbridas estabelecidas após subsequente propagação clonal (Brisse *et al.*, 2000a,b). As DTU2a e DTU2b correspondem aos Zimodemas principais Z3 e Z2, respectivamente. Os autores consideram que a especificidade biológica e epidemiológica de cada uma das subdivisões menores, incluindo os genótipos, provavelmente é mais informativa que as

DTUs maiores. Classificações baseadas em seqüências gênicas também reforçam essa subdivisão (Brisse *et al.*, 2001; Henriksson *et al.*, 2002) ou em menor número (Robello *et al.*, 2000; Kawashita *et al.*, 2001; Machado & Ayala, 2001).

Recentemente, Sturm *et al.* (2003) realizaram uma análise comparativa de 10 regiões gênicas de isolados de *T. cruzi* representativos das duas grandes subdivisões (Anon, 1999). Duas regiões intergênicas, denominadas HSP60 e 1F80, demonstraram polimorfismo e foram utilizadas para o desenho de sondas para identificação de novos isolados. Duas seqüências polimórficas foram encontradas em HSP60 e correlacionaram-se com a distinção entre *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Entretanto, polimorfismo no gene 1F18 revelou múltiplas subdivisões com as DTU2a e DTU2c apresentando padrão de *T. cruzi* I, DTU2d e DTU2 e padrão de ambos, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Esses dados sugerem que *T. cruzi* I e DTU2b parecem ser linhagens puras enquanto as subdivisões 2a/2c e 2d/2e são linhagens híbridas.

Portanto, esses dados demonstram que nosso conhecimento das implicações epidemiológicas da variabilidade genética do *T. cruzi* ainda é insatisfatório. Um conjunto de esforços se torna ainda necessário a fim conhecer marcadores que possam melhor discriminar populações do parasito com características semelhantes.

1.4 Impacto da Variabilidade Genética do Parasito sobre suas Propriedades Biológicas e Clínicas

Lambrecht (1965) já considerava a premissa que o *T. cruzi* seria constituído de populações geneticamente heterogêneas e que essa diversidade poderia ser um dos fatores que modula a patogênese da doença. O desenvolvimento dos métodos moleculares para a caracterização do parasito permitiu demonstrar amplamente a variabilidade genética para essa espécie, resultando em intensas investigações na tentativa de correlacionar a genética do parasito com as suas propriedades biológicas e clínicas fundamentais. Esses estudos apontam algumas associações interessantes:

- especificidade para o hospedeiro (Miles *et al.*, 1978; Fernandes *et al.*, 1999a), como abordado acima;

- desenvolvimento no inseto vetor (Garcia & Dvorak, 1982; Garcia & Azanbuja, 1991);
- comportamento biológico (Dvorak *et al.*, 1980; Andrade *et al.*, 1983; Andrade & Magalhães, 1997; Sanches *et al.*, 1990);
- sensibilidade a drogas (Andrade *et al.*, 1985; Andrade *et al.*, 1992; Murta *et al.*, 1998);
- manifestações clínicas (Montamat *et al.*, 1996; Vago *et al.*, 2000)

Garcia & Dvorak (1982) e Garcia & Azanbuja (1991), estudando cepas de *T. cruzi*, demonstraram que aquelas pertencentes ao *T. cruzi* I apresentam maior habilidade para infectar e completar seu ciclo de vida no inseto, que aquelas pertencentes ao *T. cruzi* II.

Dvorak *et al.* (1980) estudando populações clonais provenientes de cepas isoladas de diversas origens, constataram correlação entre a cinética de crescimento (em meio LIT e cultura de células) e os zimodemas principais. A maior taxa de crescimento foi observada para clones pertencentes ao Z1, seguida pelo Z2 e por último Z3.

Sanchez *et al.* (1990) estudaram *in vitro* a capacidade de cepas de *T. cruzi*, isoladas em regiões do Chile, Peru e Bolívia para diferenciar em tripomastigotas metacíclicos. Cepas classificadas como Z1 apresentaram maior nível de diferenciação, que variou entre 60 e 90%, enquanto as do Z2 demonstraram taxas muito heterogêneas. Tripomastigotas metacíclicos de ambos zimodemas foram infectivos para camundongos, sendo que aqueles pertencentes a Z1 produziram mais altos níveis de parasitemia comparados com as cepa Z2. Esses resultados foram corroborados por Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998 e Toledo *et al.*, 2002. Entretanto, resultados opostos têm sido verificados por alguns autores. Ruiz *et al.* (1998) e Neira *et al.* (2002) encontraram que cepas de *T. cruzi* II infectam melhor humanos e células de macaco que cepas de *T. cruzi* I. Infecção em camundongos seguiram a mesma tendência, enquanto tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* II foram mais infectivos, o mesmo inóculo para *T. cruzi* I não produziu parasitemia patente (Yoshida *et al.*, 1983). Essa discrepância pode ser atribuída a diferentes estoques de *T. cruzi* selecionados, variação nas condições de ensaio ou a grande heterogeneidade intra-grupo observada entre os estoques de *T. cruzi* (Toledo *et al.*, 2002).

Andrade & Magalhães (1997), estudando o comportamento de 138 cepas de *T. cruzi* isoladas de diversos hospedeiros e regiões geográficas, correlacionaram o comportamento biológico das cepas com seus respectivos perfis isoenzimáticos. Observou-se clara associação entre os Biodemas I (Andrade, 1974) e o Zimodema Z2b, Biodema II e Z2 e Biodema III e Z1. Considerando a susceptibilidade a drogas, esses autores também constataram que cepas do Biodema I e II (*T. cruzi* II) apresentavam uma elevada ou parcial sensibilidade ao benznidazol e nifurtimox, enquanto o Biodema III (*T. cruzi* I) exibiu um elevado grau de resistência a essas drogas (Andrade *et al.*, 1985; Andrade *et al.*, 1992).

Murta *et al.* (1998) estudando um marcador genético para resistência a droga em *T. cruzi*, verificaram que cepas pertencentes ao ZB apresentaram elevada susceptibilidade ao benznidazol independentemente da região geográfica de origem, enquanto cepas classificadas como Z1 ou Z2 foram tanto sensíveis, quanto resistentes ao tratamento. Quando correlacionadas aos perfis de genes de rRNA e mini-exon, nenhuma correlação foi verificada.

Os trabalhos tentando correlacionar a genética do parasito à forma clínica da doença ainda são inconclusivos (Apt *et al.*, 1987; Brenière *et al.*, 1985; Brenière *et al.*, 1989), e apenas alguns apresentaram tal associação. Estudos isoenzimáticos de isolados de *T. cruzi* na Argentina têm permitido classificá-los em 12 zimodemas (Montamat *et al.*, 1992; De Luca d'Oro *et al.*, 1993), nenhum deles correspondentes aos descritos anteriormente (Romanha *et al.*, 1979; Miles *et al.*, 1980). Na tentativa de correlacionar o zimodema ao quadro clínico produzido pelo parasita, Montamat *et al.* (1996) analisaram isolados de *T. cruzi* obtidos de 55 pacientes chagásicos crônicos da Argentina e demonstraram que apenas dois zimodemas, Z1 e Z12, são freqüentes e amplamente distribuídos em área endêmica. Esses diferem significativamente em sua patogenicidade. Pacientes infectados com Z1 tendem a permanecer assintomáticos por período de tempo mais longo do que aqueles infectados com Z12. Além disso, o risco para lesões cardíacas parece ser maior em pacientes abrigando Z12 do que Z1, indicando que naquela região a heterogeneidade das populações naturais do parasito apresentam correlação com a forma clínica do paciente.

Vago *et al.* (2000) caracterizando por LSSP-PCR populações de *T. cruzi* presentes no coração de 13 pacientes com a forma cardíaca da doença Chagas e no

esôfago de quatro pacientes com a digestiva (três dos quais também apresentavam a forma cardíaca), verificaram que todas as amostras apresentaram uma assinatura de kDNA diferente para cada caso, demonstrando a grande variabilidade do *T. cruzi*. Entretanto, similaridades nos perfis de kDNA foram observadas entre pacientes da mesma região geográfica, sugerindo que populações geneticamente relacionadas de *T. cruzi*, possivelmente, coexistem em uma região geográfica e podem estar determinando o desenvolvimento de uma mesma forma clínica.

Considerando que o *T. cruzi* apresenta evolução predominante clonal (Tibayrenc *et al.*, 1993), espera-se uma evolução não-independente entre diferenças biológicas e divergência genética entre os clones naturais. Isso pressupõe que clones geneticamente mais próximos apresentariam características biológicas e clínicas mais semelhantes entre si, enquanto clones geneticamente mais distantes apresentariam propriedades mais distintas. Com o objetivo de comprovar tal hipótese, esse grupo de pesquisadores iniciou intensivas investigações com estudos bem estandardizados, empregando um número satisfatório de estoques clonais e representativos da heterogeneidade genética do parasito. Nesse sentido, foram utilizados clones de *T. cruzi* representantes dos genótipos principais 19, 20, 32 e 39 (Tibayrenc & Brenière, 1988). O estudo filogenético desses clones demonstrou que clones do genótipo 19 e 20 (DTU1) são mais filogeneticamente relacionados entre si e distantes dos clones do genótipo 32 e 39 (DTU2) também mais relacionados. Diversos ensaios *in vitro* e em camundongos experimentalmente infectados foram realizados a fim de verificar a hipótese de trabalho.

Laurent *et al.* (1997) analisando o comportamento de 16 clones pertencentes aos genótipos 19, 20 e 39, avaliaram diferentes parâmetros em cultura e camundongos BALB/c. Diferenças significativas foram encontradas entre os grupos 19x20 e 20x39 mais filogeneticamente distantes, demonstrando uma forte associação estatística entre genética e diferenças biológicas.

Posteriormente, Revollo *et al.* (1998) trabalhando com 21 estoques clonais de *T. cruzi* pertencentes aos genótipos 19, 20, 39 e 32, 16 dos quais estudados por Laurent *et al.* (1997), corroboram os resultados obtidos anteriormente, através do estudo de seu comportamento em culturas acelular e celular. De um modo geral, clones dos genótipos 19 e 20 crescem mais facilmente em cultura, são mais virulentos para camundongos, apresentaram mais baixa sensibilidade a drogas quando comparados com

clones pertencentes ao grupo 32, que apresentam a menor intensidade para essas propriedades. Clones pertencentes ao grupo genético 39, que se encontra em posição genética intermediária entre os grupos 19/20 e 32, apresentaram valores intermediários de sensibilidade a drogas. Entretanto, os autores observaram grande desvio padrão entre os resultados obtidos com estoques clonais de um mesmo genótipo.

A análise de 22 locos enzimáticos e por RAPD para representantes dos genótipos 19 e 20 demonstrou que esses diferem em um único alelo (correspondente à enzima 6-fosfogluconato desidrogenase, 6PGDH, E.C.1.1.1.44) e que diferenças estatísticas não foram observadas entre os mesmos para os parâmetros avaliados. Isso levou ao agrupamento desses genótipos, que passaram a ser referidos como genótipo 19/20.

Lana *et al.* (1998) estudaram o comportamento de 20 clones pertencentes aos genótipos principais em relação à sua capacidade de infectar e desenvolver em *Triatoma infestans*. Foi constatada uma forte correlação entre marcadores genéticos e propriedades biológicas do parasito. Clones do genótipo 19/20 são mais infectivos para o inseto vetor e apresentam maior taxa de diferenciação e produção de flagelados, quando comparados com os clones pertencentes aos genótipos 39 e 32.

Diego *et al.* (1998) verificaram correlação entre a distância genética e os achados histopatológicos em camundongos Swiss infectados por clones dos genótipos 19, 20 e 39. Animais infectados com o genótipo 20 apresentaram importante comprometimento encefálico correspondendo a áreas inflamação e necrose. Parasitismo no baço e fígado foi encontrado apenas em animais infectados com o genótipo 39. O tropismo para o músculo esquelético foi acentuado para todos os genótipos e mais intenso que o cardiotropismo, que apresentou diferenças entre todos os genótipos. Entretanto, em decorrência desvio padrão no tropismo de clones de um dado genótipo, não foi possível suportar a hipótese de patogenicidade específica para zimodemas.

Toledo *et al.* (2002) demonstraram, do mesmo modo, uma forte correlação entre divergência filogenética e propriedades biológicas. Os autores utilizando 20 estoques clonais, pertencentes aos genótipos 19, 20, 39 e 32, avaliaram comparativamente 14 parâmetros em camundongos BALB/c durante a fase aguda e crônica da infecção. Genótipos mais relacionados (19x20 ou 32x39) apresentaram menor número de diferenças significativas do que genótipos geneticamente distantes (19 ou 20 *versus* 32

ou 39), exceto para a comparação 19x32. Clones do genótipo 20 foram os mais virulentos e patogênicos na fase aguda infecção, enquanto clones do genótipo 39 apresentaram parasitemias mais heterogêneas, foram os únicos nos quais se detectou parasitismo tecidual durante a fase crônica da infecção, contudo, sem correlação com a intensidade do processo inflamatório. Clones do genótipo 32 foram os menos virulentos e patogênicos e indutores de baixa produção de anticorpos.

Mais recentemente, Toledo *et al.* (2003, 2004a,b) avaliaram a ação do Benznidazol e do Itraconazol em infecções experimentais em camundongos BALB/c. Esse estudo revelou que, em relação à sensibilidade ao Itraconazol, os resultados seguiram a mesma tendência de correlação entre a distância genética e as demais propriedades biológicas do parasito, já descrita para esses clones (Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998; Lana *et al.*, 1998). Clones dos genótipos relacionados 19 e 20 e distantes dos genótipos 39 e 32 apresentaram maior resistência ao tratamento (100% em ambas as fases da infecção), enquanto os genótipos 39 e 32 apresentaram menor resistência, especialmente o genótipo 32 (45 e 16% nas fases aguda e crônica, respectivamente). Em relação ao Benznidazol, observou-se que clones do genótipo 20 foram totalmente resistentes ao tratamento, enquanto clones do genótipo 19 apresentaram diferentes graus de sensibilidade. Dois padrões de resposta ao BZ foram observados para o genótipo 39, que apresentaram clones sensíveis a resistentes ao tratamento. Esse comportamento ambíguo foi observado também para as propriedades biológicas desses parasitos, o que pode ser devido ao fato desses clones serem geneticamente híbridos. Clones do genótipo 32 apresentaram um típico padrão de susceptibilidade ao Benznidazol. Quando esses estoques são agrupados nas duas linhagens genéticas do parasito, observa-se que clones pertencentes ao *T. cruzi* I são mais resistentes ao tratamento por ambos os fármacos, que clones pertencentes ao *T. cruzi* II, em ambas as fases da infecção.

As análises tanto da resposta à terapêutica, quanto das propriedades biológicas do parasito, revelaram uma grande variabilidade entre os clones de um mesmo genótipo, demonstrando que apesar da correlação constatada, alguns clones não apresentaram comportamento típico dos representantes daquele grupo. Os genótipos 19 e 20 foram diferentes entre si em seis importantes parâmetros, embora fossem geneticamente muito próximos, permitindo considerá-los separadamente, ao contrário dos trabalhos de outros

autores (Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998). Esses dados confirmam a necessidade de se considerar as subdivisões menores em *T. cruzi* e não apenas a classificação em dois grupos principais *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, em estudos que tentam correlacionar aspectos genéticos do parasito com sua biologia, patogenicidade, epidemiologia e susceptibilidade a drogas, devido a grande heterogeneidade observada entre os mesmos.

1.5 Infecções Mistas

A caracterização bioquímica e molecular de isolados de *T. cruzi* têm evidenciado, cada vez mais, a ocorrência de infecções mistas em humanos, reservatórios e vetores (Brenière *et al.*, 1985; Tibayrenc *et al.*, 1985; Lauria-Pires *et al.*, 1996a; Bosseno *et al.*, 1996; Solari *et al.*, 1998; Bosseno *et al.*, 2000; Solari *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2003).

Recentemente, a utilização de técnicas moleculares mais sensíveis, capazes de detectar o parasito diretamente no sangue de humanos ou fezes de triatomíneos, tem detectado a ocorrência de infecções mistas por clones dos genótipos principais em 42,5% e 41,0% dos isolados provenientes de pacientes humanos da área endêmica no Chile (Solari *et al.*, 2001) e de triatomíneos bolivianos (Bosseno *et al.*, 2000), respectivamente. Esses dados demonstram a relevância das infecções mistas na epidemiologia da doença. Provavelmente, pessoas em áreas endêmicas são submetidas a várias reinfecções possibilitando a existência de um grande número de infecções mistas detectáveis no curso da doença. Contudo, as conseqüências das mesmas para o hospedeiro ainda precisam ser determinadas, tornando muito mais complexo o seu estudo.

Na tentativa de elucidar estes aspectos, estudos de infecções mistas experimentais em vetores e hospedeiros vertebrados vêm sendo realizados e têm demonstrado resultados interessantes. Pinto *et al.* (1998), comparando a taxa de transmissão vetorial em *T. infestans*, em infecções mistas e monoclonais por clones dos genótipos principais, verificaram que não ocorre apenas uma justaposição entre os clones da mistura. Os resultados sugerem uma interação entre os clones, sendo

observados tanto efeitos de estimulação quanto de inibição recíprocas. Desse modo, clones do genótipo 32, que apresentam baixa infectividade e produção de flagelados no inseto vetor, quando combinados com clones do genótipo 19/20, que são fortes para essas propriedades, foram capazes de permanecer no hospedeiro invertebrado e às vezes até mais presentes do que aqueles de genótipo 19/20. A caracterização genética por isoenzimas e RAPD indicou a permanência das infecções mistas no vetor em 87% das combinações. Resultados análogos foram obtidos por Lana *et al.* (2000) ao estudar infecções mistas com alguns destes mesmos clones em camundongos BALB/c recuperados em cultura e identificados por esses mesmos marcadores.

Franco *et al.* (2003), realizando infecções em ratos com misturas artificiais da cepa monoclonal JG (isolada de um paciente com megaloesôfago) e o clone CL-Brener (miotrópico), observaram evidente redução na taxa de mortalidade, bem como alteração no tropismo tecidual dos estoques, quando comparadas com suas respectivas infecções isoladas.

1.6 Justificativa

Considerando a prevalência de infecções mistas em humanos e vetores e que a diversidade genética das populações de *T. cruzi* têm implicações biológicas relevantes, estudos mais detalhados de infecções mistas experimentais necessitam ser realizados possibilitando assim determinar o impacto das mesmas sobre as propriedades biológicas do parasito, epidemiologia e clínica da doença.

Nesse sentido, o presente trabalho propõe estudar comparativamente infecções experimentais em camundongos BALB/c, monoclonais e mistas, utilizando diferentes composições de clones de *T. cruzi* previamente caracterizados molecularmente e apresentando distintos graus de divergência filogenética entre si, abrindo perspectivas para se entender o impacto dessas infecções tão comuns na natureza e inclusive no homem.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar em camundongos BALB/c, o impacto de infecções mistas por clones de *T. cruzi* pertencentes a genótipos distintos sobre propriedades biológicas do parasito em comparação com as respectivas infecções monoclonais e se a divergência filogenética do parasito exerce papel relevante nesse processo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar biologicamente infecções mistas pelo *T. cruzi*, considerando os parâmetros de virulência: infectividade, mortalidade, taxa de positividade de hemocultura, período pré-patente, período patente, pico máximo de parasitemia, dia do pico máximo de parasitemia e parasitemia, comparando-se:

(a) valores observados nas infecções monoclonais e mistas;

(b) valores observados nas infecções monoclonais *versus* valores esperados nas infecções mistas;

(c) valores esperados *versus* valores observados nas infecções mistas.

3 *ANIMAIS, MATERIAL E*
MÉTODOS

3.1 Estoques Clonais de *Trypanosoma cruzi*

Nesse estudo, foram utilizados oito estoques clonais de *T. cruzi* previamente caracterizados por isoenzimas e RAPD (Tibayrenc & Ayala, 1986; Tibayrenc *et al.*, 1993), pertencentes aos grupos genéticos principais 19, 20, 39 e 32 (Tabela I). Essas amostras foram isoladas de diferentes hospedeiros, originários de diversas regiões geográficas da América Latina (Tabela I), clonadas por técnica de micromanipulação e mantidas criopreservadas no “Laboratoire de Génétique des Maladies Infectieuses, Unité Mixte de Recherche IRD/CNRS, Montpellier, França”.

Tabela I

Hospedeiros e origem geográfica de oito clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos clones naturais ubíquos 19, 20, 39 e 32.

Genótipos	Clones	Hospedeiros	País	Região
19	Gambacl1	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brasil	São Paulo
	OPS21 cl1	Homem, fase aguda	Venezuela	Cojedes
20	Cuica cl1	<i>Opossum Cuica philander</i>	Brasil	São Paulo
	P209 cl1	Homem, fase crônica	Bolívia	Sucre
39	Bug2148 cl1	<i>Triatoma infestans</i>	Brasil	Rio Grande do Sul
	SO3 cl5	<i>Triatoma infestans</i>	Bolívia	Potosi
32	MAS cl1	Homem, fase crônica	Brasil	Brasília
	IVV cl4	Homem, fase crônica	Chile	Santiago

Os oito clones utilizados nesse trabalho foram selecionados entre 20 estoques clonais de *T. cruzi* avaliados por Toledo *et al.* (2002) em camundongos BALB/c, tomando-se sempre o clone de maior e menor virulência de cada um dos genótipos estudados. Os clones dos genótipos 19 e 20 (DTU1) são filogeneticamente mais relacionados entre si e distantes dos genótipos 39 e 32 (DTU2) também geneticamente próximos entre si (**Figura 1**).

Os estoques clonais criopreservados foram descongelados, cultivados em meio LIT - Liver Infusion Tryptose (Camargo, 1964) à 28°C e os tripomastigotas metacíclicos obtidos destas culturas, inoculados em camundongos albinos, de 20-30 dias de idade, para obtenção de tripomastigotas sangüíneos.

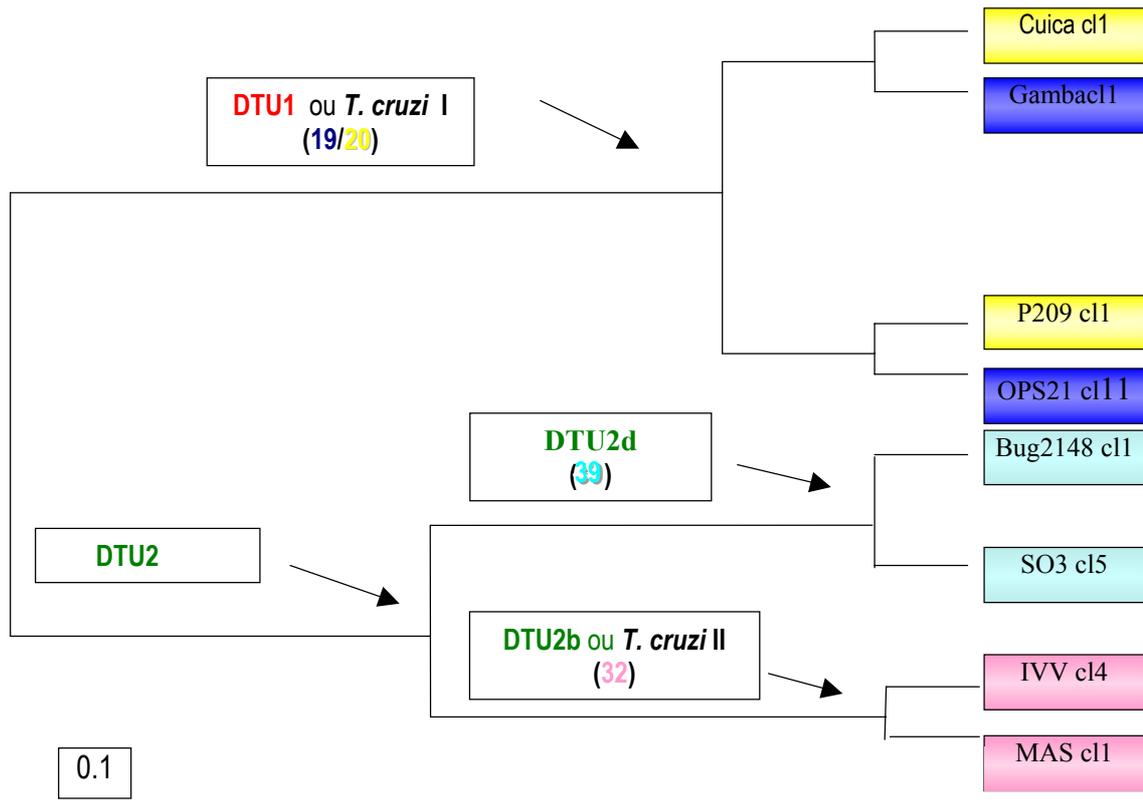


FIGURA 1: Dendrograma mostrando a divergência filogenética entre os oito clones de *T. cruzi* pertencentes aos genótipos principais em estudo, construído pela UPGMA, usando a matriz de distância genética de Jaccard (1908), obtida pela análise isoenzimática de 22 locos genéticos e RAPD. Modificado de Tibayrenc *et al.*, 1993.

3.2 Infecções Experimentais

Nos grupos experimentais foram utilizados camundongos BALB/c isogênicos, fêmeas, de 28-30 dias de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esta linhagem de camundongo foi escolhida para se obter dados comparáveis com os estudos

anteriores de infecções monoclonais (Toledo *et al.*, 2002) também realizados neste modelo experimental.

Para as infecções monoclonais, seis animais foram inoculados por via intraperitoneal com 10.000 tripomastigotas sanguíneos/animal e para as infecções mistas com 5.000 tripomastigotas sanguíneos de cada clone/animal, quantificados segundo Brener (1962) e obtidos entre a 1^a e 6^a passagens em camundongos albinos. Os clones foram combinados aos pares, resultando em 24 combinações de genótipos distintos (**Tabela III**).

Tabela II

Combinação dos clones representativos dos grupos genéticos 19, 20, 39 e 32 de *Trypanosoma cruzi* utilizados em infecções mistas de camundongos BALB/c.

Mistura de genótipos	Mistura de clones			
	+ Virulento + Virulento	- Virulento - Virulento	+ Virulento - Virulento	- Virulento + Virulento
19 + 20	Gambacl1+ P209 cl1	OPS21 cl11+ Cuica cl1	Gambacl1+ Cuica cl1	OPS21 cl11+ P209 cl1
19 + 39	Gambacl1+ Bug2148 cl1	OPS21 cl11+ SO3 cl5	Gambacl1 + SO3 cl5	OPS21 cl11+ Bug2148 cl1
19 + 32	Gambacl1+ IVV cl4	OPS21 cl11+ MAS cl1	Gambacl1+ MAS cl1	OPS21 cl11+ IVV cl4
20 + 39	P209 cl1+ Bug2148 cl1	Cuica cl1+ SO3 cl5	P209 cl1 + SO3 cl5	Cuica cl1 + Bug2148 cl1
20 + 32	P209 cl1+ IVV cl4	Cuica cl1+ MAS cl1	P209 cl1 + MAS cl1	Cuica cl1 + IVV cl4
39 + 32	Bug2148 cl1 + IVV cl4	SO3 cl5 + MAS cl1	Bug2148 cl1+ MAS cl1	SO3 cl5 + IVV cl4

+ Mais, - menos.

3.3 Avaliações Parasitológicas

3.3.1 Exame a Fresco

A contagem de formas tripomastigotas sanguíneas foi realizada diariamente, pelo exame a fresco de 5 μ L de sangue, coletados da veia caudal do animal e contados segundo Brener (1962) para traçado da curva de parasitemia.

3.3.2 Hemocultura

A técnica de hemocultura foi realizada segundo Filardi & Brener (1987). Coletou-se assepticamente 0,5mL de sangue do seio venoso retro-orbital do animal, que foi distribuído em dois tubos cônicos de 15mL contendo 3mL de LIT (Camargo, 1964). Os tubos foram incubados à 28°C, homogeneizados a cada 48h e uma gota do sedimento foi analisada ao microscópio óptico em objetiva de 40x, a cada 15 dias até o 90^o dia após a coleta. A hemocultura foi realizada para confirmação da infecção nos animais cujo exame a fresco foi negativo e para avaliação da taxa de positividade da hemocultura (+Hem).

3.4 Parâmetros Avaliados

3.4.1 Infectividade (INF)

A infectividade foi determinada pelo exame a fresco até 30^o dia após a inoculação (d.a.i.) e nos animais persistentemente negativos, por hemocultura. Essa foi expressa em porcentagem de animais que apresentaram parasitos no sangue periférico.

3.4.2 Mortalidade (MOR)

Para determinação da taxa de mortalidade os animais foram acompanhados diariamente e a mortalidade registrada até o 90^od.a.i. e expressa em porcentagem cumulativa.

3.4.3 Taxa de Positividade da Hemocultura (HEM+)

Para sua avaliação, a hemocultura foi realizada no 60^od.a.i. e expressa em percentagem cumulativa de animais com hemocultura positiva.

3.4.4 Período Pré-patente (PPP)

O PPP corresponde ao período compreendido entre a inoculação e o primeiro dia de detecção do parasito no sangue periférico do animal através do exame a fresco e expresso em dias.

3.4.5 Período Patente (PP)

O PP corresponde ao período compreendido entre o primeiro dia de exame a fresco positivo até a completa negatização da parasitemia e expresso em dias.

3.4.6 Pico Máximo de Parasitemia (PMP)

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

3.4.7 Dia do Pico Máximo (DPMP)

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

3.4.8 Parasitemia (PAR)

A contagem da parasitemia foi realizada diariamente a partir do quarto d.a.i. até a negatificação por cinco dias consecutivos. Infecções por clones de baixa virulência foram acompanhadas pelo menos até o 30^od.a.i. As curvas de parasitemia representam a contagem média da parasitemia, por dia de infecção.

3.5 Análise de Dados

A hipótese nula explorada nesse trabalho é que não há interação entre os clones de uma dada mistura. Deste modo a análise dos dados para todos os parâmetros avaliados foi realizada em três níveis, comparando-se:

(a) valores observados nas infecções monoclonais e mistas;

(b) valores observados nas infecções monoclonais *versus* valores esperados nas infecções mistas;

(c) valores esperados *versus* valores observados nas infecções mistas.

Para a análise estatística dos parâmetros PPP, PP, PM e DMP as amostras apresentaram variância homogênea e distribuição normal, sendo adotado o teste Anova para a comparação entre os valores observados para as infecções mistas e suas respectivas infecções monoclonais. Em alguns casos, quando a variância foi heterogênea, utilizou-se o teste de Mann-Whitney (MN), segundo Conares (1980).

A comparação entre os valores esperados e observados para as infecções mistas experimentais, para os parâmetros mencionados acima, foi realizada através do teste de Student.

A PAR foi analisada pelo teste não-parâmetro Kolmogorov-Sminorv (KS), que compara a área sob a curva entre duas amostras (Conares, 1980).

As taxas de infectividade (IFN), mortalidade (MOR) e hemocultura positiva (+HEM) foram comparadas utilizando-se o teste não paramétrico do qui-quadrado (χ^2) de Snedecor & Cochran (1989).

Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95%, sendo que diferenças significativas foram registradas quando o nível P de significância foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

4 *RESULTADOS*

A hipótese nula explorada nesse trabalho é que não há interação entre os clones de *T. cruzi* de uma dada mistura. Dessa forma, considerando que existe uma correlação entre os níveis de parasitemia e o tamanho do inóculo, verificada por experimentos prévios realizados por nosso grupo (**Figura 2A**), partindo-se de um Clone **A** e um Clone **B**, com diferentes níveis de virulência, o resultado esperado para a infecção mista teórica **A+B** refletirá a média de efeitos dos dois clones ou a natureza peculiar de um deles, dependendo do parâmetro avaliado (**Figura 2B**). Portanto, para facilitar a compreensão da análise dos dados realizada nesse estudo, os resultados esperados para cada um dos parâmetros avaliados nas infecções mistas foram os seguintes:

- a) Infectividade, mortalidade e taxa de positividade da hemocultura: reflexo do clone de maior virulência da mistura;
- b) Período pré-patente: reflexo do clone de PPP mais curto;
- c) Período patente: reflexo do clone de PP mais longo;
- d) Pico máximo de parasitemia e área sob a curva: a média entre os valores dos dois clones da mistura;
- e) Dia do Pico máximo: o dia do pico do clone mais virulento da mistura, se os níveis de parasitemia dos dois clones forem muito diferentes. Se as misturas apresentarem níveis semelhantes o resultado esperado aproximará da média dos valores dos dois clones;
- f) Parasitemia: média dos valores dos dois clones da mistura.

Em relação às taxas de infectividade, mortalidade e positividade da hemocultura, não foram encontradas diferenças significativas. Embora o comportamento biológico para esses parâmetros, aparentemente, tenha sofrido alteração em muitas das infecções mistas (**Tabela III**), o tamanho da amostra utilizado nesse estudo foi insuficiente para que o teste estatístico apresentasse diferença significativa.

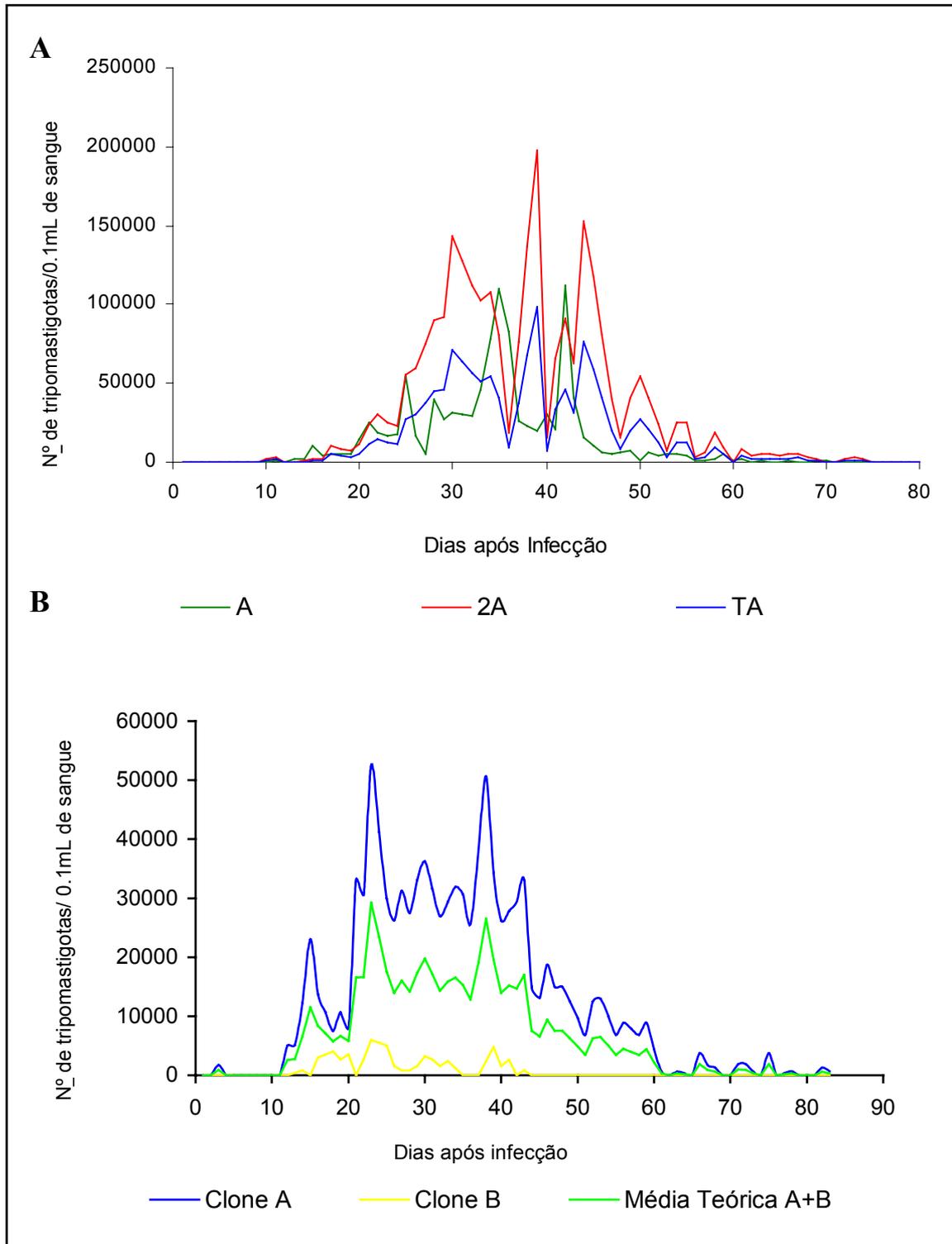


FIGURA 2: **A** - Curvas de parasitemia do clone A para o inóculo de 5.000 tripomastigotas sanguíneos por animal (A), 10.000 TS/animal (2A) e a média teórica de 2A (TA), demonstrando existir correlação entre o tamanho do inóculo e os níveis de parasitemia. **B** - Curvas de parasitemia média das infecções monoclonais pelos clones A e B e a infecção mista teórica A+B.

4.1 Análise Global dos parâmetros por Combinação Genotípica

A análise geral dos dados demonstra que os parâmetros avaliados (INF, MORT, HEM+, PPP, PP, PMP, DPMP, PAR) apresentaram diferentes percentagens de alterações significativas entre os valores esperados e observados nas infecções mistas experimentais e teóricas variando de 4,2 a 79,2% (**Figura 3**), exceto para os parâmetros infectividade e mortalidade.

Considerando-se todos os parâmetros relacionados a parasitemia agrupados, foram verificadas 11, 14, 11, 11, 15 diferenças significativas nas combinações genotípicas **19+20**, **19+39**, **19+ 32**, **20+39** e **39+32**, respectivamente (**Figura 4**). Na combinação **20+32**, constituída de clones filogeneticamente mais distantes e com graus de virulência mais distintos encontrou-se o menor número de diferenças significativas (seis).

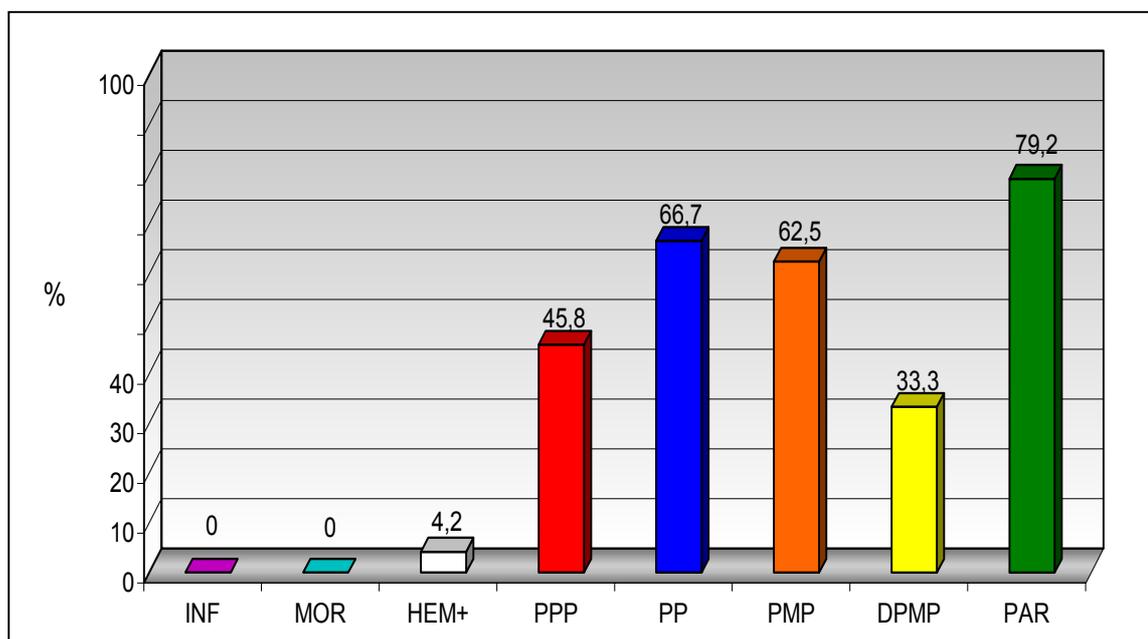


FIGURA 3: Percentagem de diferenças significativas entre os valores esperados e observados nos parâmetros avaliados em infecções mistas por estoques clonais de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais.

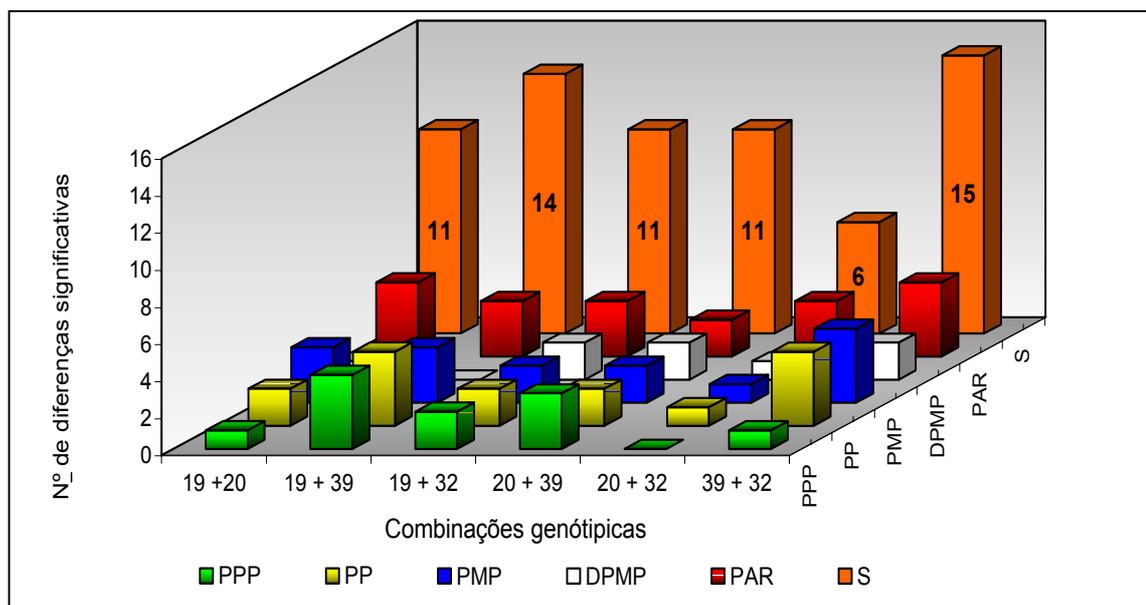


FIGURA 4: Número de diferenças significativas entre os valores esperados e observados em infecções mistas por estoques clonais de *Trypanosoma cruzi* nas combinações genótípicas estudadas. PPP = período pré-patente PP = período patente PM = pico máximo, DPM = dia do pico máximo, PAR = parasitemia, S = somatório de diferenças significativas por parâmetro avaliado.

4.2 Infectividade

As taxas de infectividade (INF) observadas em todas as infecções mistas foram de 100% (**Figura 5**), sendo igual ou superior a do clone mais infectante da mistura, quando considerada sua respectiva infecção monoclonal. Não foram encontradas diferenças significativas na análise desse parâmetro. Entretanto, combinações de clones dos genótipos 39 e 32 foram capazes de infectar todos os animais, ao contrário do observado nas respectivas infecções monoclonais (**Figuras 29A e 30A**).

As comparações entre os valores esperados e observados para todas as infecções mistas estão representadas nas **Figuras (8-24)A**.

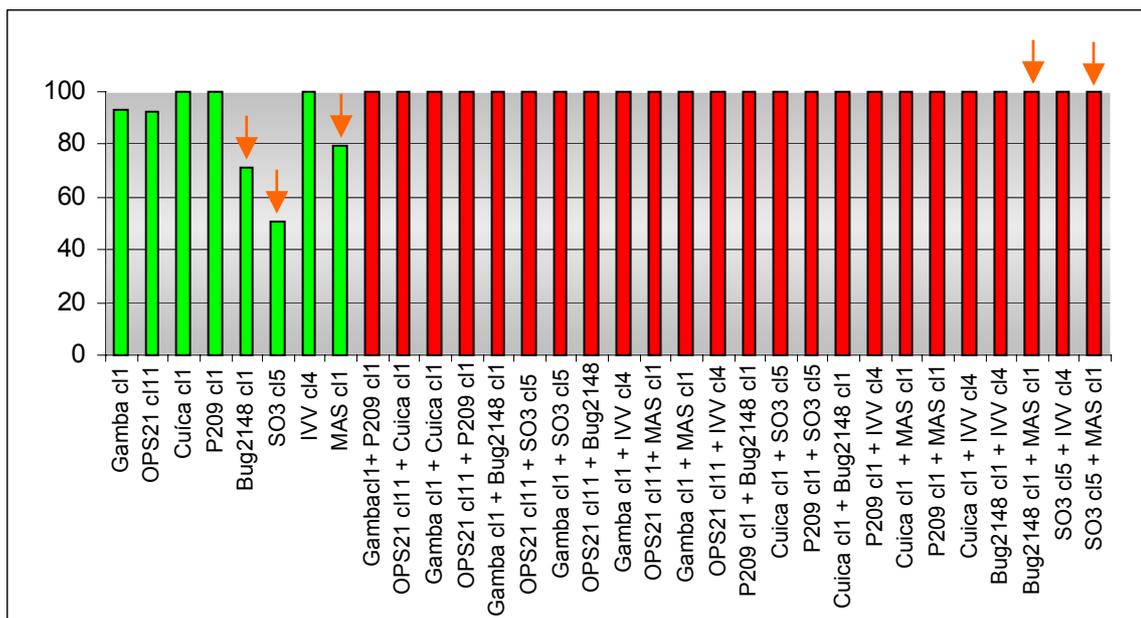


FIGURA 5: Taxas de infectividade avaliadas em camundongos BALB/c em infecções monoclonais (barras verdes) e mistas (barras vermelhas) por clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais. As setas indicam efeito estimulatório entre os clones dos genótipos 39 e 32 nas infecções mistas com taxas de infectividade de 100%, superiores ao valor esperado de 79,3%.

4.3 Mortalidade

As taxas de mortalidade (MOR) registradas para as infecções mistas variaram de zero a 40% (**Figura 6**). Embora diferenças significativas não tenham sido detectadas em relação aos valores esperados (**Figuras 8-24A**), pode-se notar que para algumas combinações ocorreu aumento importante da taxa de mortalidade, tais como OPS21 cl11 + Cuica cl1 (**Figura 9A**), OPS21 cl11 + P209 cl1 (**Figura 11A**), OPS21 cl11 + IVV cl4 (**Figura 19A**), Cuica cl1 + SO3 cl5 (**Figura 21A**). A combinação do clone P209 cl1 (genótipo 20) com clones do genótipo 39 e 32, aparentemente resultou em um efeito favorável para os animais, levando a redução da mortalidade de 15,4% a zero (**Figuras 6, 22A, 24A e 26A**), exceto para a mistura P209 cl1 + Bug2148 cl1 (**Figura 20A**) com mortalidade de 16,7%.

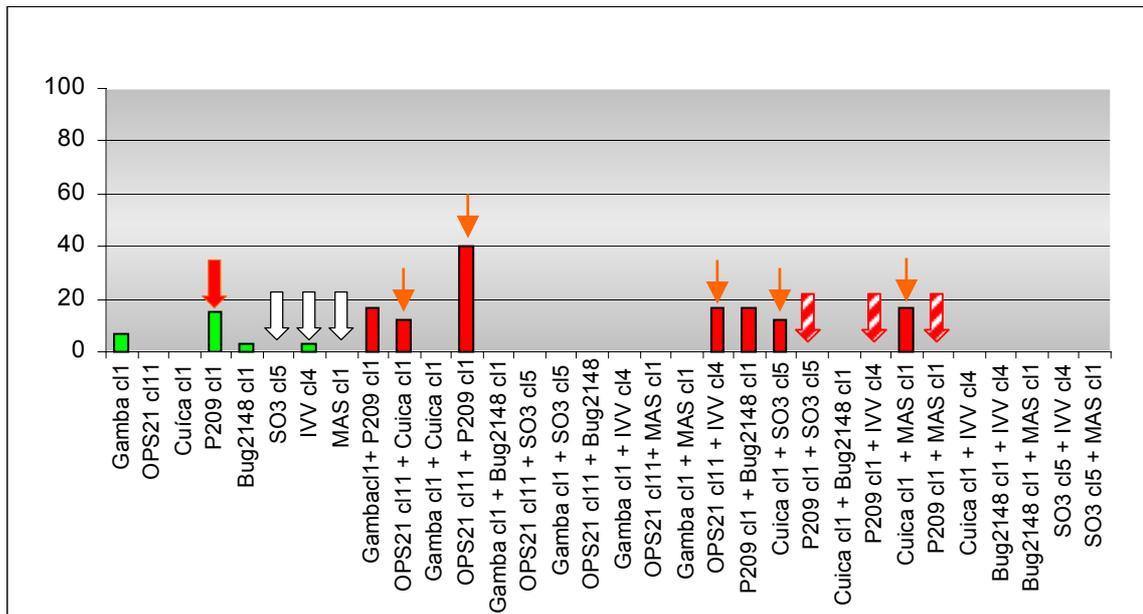


FIGURA 6: Taxas de mortalidade avaliadas em camundongos BALB/c em infecções monoclonais (barras verdes) e mistas (barras vermelhas) por clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais. As setas vermelhas com letras brancas indicam efeito redutor da mortalidade nas infecções mistas, quando clones dos genótipos 39 (setas brancas) são combinados ao clone P209 cl1 (seta vermelha); enquanto as setas alaranjadas representam aumento das taxas de mortalidade nas infecções mistas quando comparadas com suas respectivas infecções monoclonais.

4.4 Taxa de Positividade da Hemocultura

Em relação às taxas de positividade da hemocultura (Hem+) foi detectada diferença significativa em uma única mistura representada pela combinação OPS21 cl11 + S03 cl5 ($P < 0.048$), **Figura 13A**. Entretanto, a análise dos dados demonstra uma redução na positividade da hemocultura em sete das 24 (29,2%) infecções mistas estudadas, com taxas variando de 50 a 87,3% em relação ao esperado de 100% de positividade (**Figuras 7, 13A, 15A, 17A, 18A, 19A, 27A e 30A**).

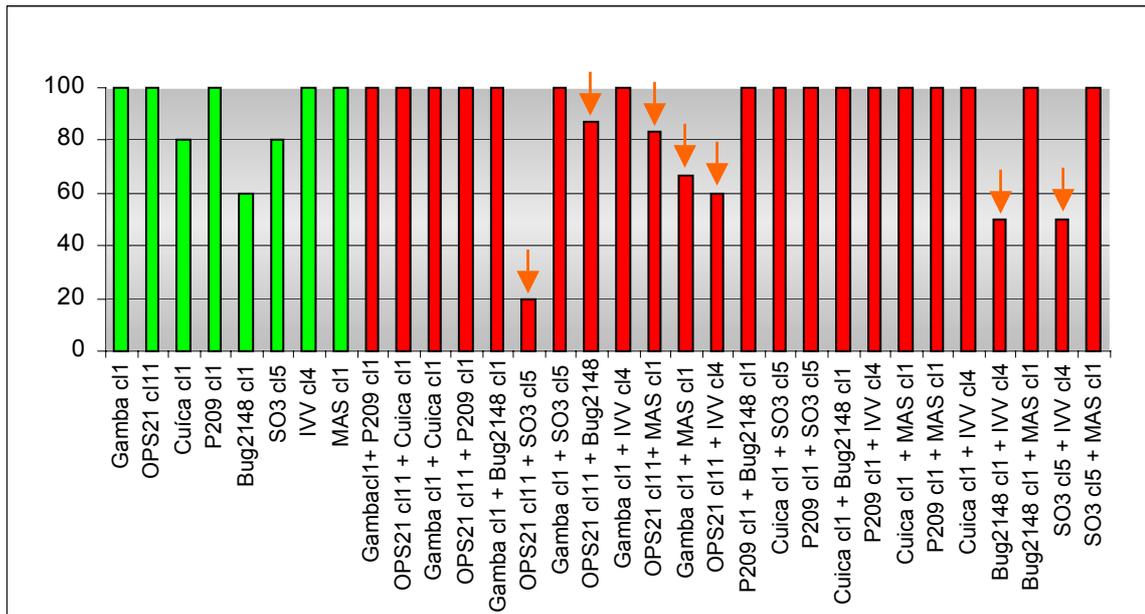


FIGURA 7: Taxas de positividade de hemocultura avaliadas em camundongos BALB/c em infecções mono-clonais (barras verdes) e mistas (barras vermelhas) por clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais. As setas indicam redução na positividade da hemocultura das infecções mistas quando comparadas com o valor esperado para a respectiva infecção mista teórica.

4.5 Período Pré-patente

O PPP médio apresentou 45,8% de alterações significativas nos valores observados nas infecções mistas em relação aos valores esperados correspondentes (Figura 3). Dessas, 16,6% (4/24) apresentaram parasitemia mais precocemente (Figuras 9A, 14A, 16A e 23A) e 29,1% (7/24) mais tardiamente (Figuras 12A, 13A, 15A, 18A, 20A, 21A, 23A e 29A) em relação ao esperado. O maior número de diferenças significativas foi observado nas combinações genotípicas 19+39 e 20+39, correspondendo a quatro e três diferenças, respectivamente. A combinação 39+32 foi a que apresentou menor grau de alteração para esse parâmetro (Figura 4).

4.6 Período Patente

O período patente foi o segundo a apresentar mais elevado grau de alterações nas infecções mistas. Foram observadas diferenças significativas em 66,7% das misturas (**Figura 3**), das quais 37,5% (9/24) apresentaram PP mais longo (**Figuras 9A, 10A, 12A, 14A, 15A, 21A, 23A, 25A e 27A**) e 29,2% (7/24) mais curto (**Figuras 13A, 17A, 19A, 28A, 29A, 30A e 31A**) que o esperado. As misturas dos genótipos **19+39** e **39+32** apresentaram alterações significativas em todas as combinações estudadas (**Figura 4**).

4.7 Pico Máximo de Parasitemia

Para o PMP foram observadas 62,5% (15/24) de diferenças significativas entre os valores esperado e observado nas infecções mistas, sendo o segundo parâmetro a apresentar maior grau de alteração. Ocorreram tanto efeitos de estimulação quanto de inibição entre os clones da mistura. Em 25,0% (6/24) das infecções duplas foi observado um aumento da parasitemia média no pico máximo (**Figuras 8A, 9A, 12A, 15A, 21A e 23A**), enquanto em 37,5% (9/24) foi observada redução neste valor (**Figuras 11A, 13A, 17A, 19A, 26A, 28A, 29A, 30A e 31A**). As alterações (**Figura 4**) ocorreram em todas as combinações genóticas em diferentes frequências: 4/4 (**19+20** e **39+32**), 3/4 (**19+39**), 2/4 (**19+32** e **20+39**), 1/4 (**20+32**). Foi evidente a ocorrência de maior número de diferenças significativas entre as combinações de clones geneticamente mais relacionados (**Figura 4**). Efeitos de estimulação aconteceram na combinação **19+20** (**Figuras 8A, 9A e 11A**) e inibição em todas as misturas da combinação **39+32** (**Figuras 28A, 29A, 30A e 31A**).

4.8 Dia do Pico Máximo de Parasitemia

Considerando os parâmetros relacionados à curva parasitemia, o dia do pico máximo foi o que apresentou menor número de diferenças significativas entre os valores esperados e observados nas infecções mistas (**Figura 4**). Foram verificadas alterações

em 33,3% (8/24) das misturas sendo que dessas, 16,7% (4/24) apresentaram DPMP precocemente (**Figuras 17A, 19A, 28A, 31A**) e 16,7% (4/24) mais tardiamente ao esperado (**Figuras 9A, 21A, 23A e 26A**). Não foi encontrada correlação entre a mudança do DPMP e as combinações genóticas (**Figura 4**). No entanto, elas ocorreram em todas as combinações dos genótipos **19+20**.

4.9 Parasitemia

A parasitemia média foi o parâmetro que apresentou a maior percentagem de alterações. Diferenças significativas foram verificadas em 79,2% (19/24) das misturas (**Figura 3**). A análise das curvas de parasitemia média revela que alterações nos níveis de parasitemia e no perfil da curva foram detectadas, sendo registrados tanto fenômenos de aumento (**Figuras 8A, 9A, 10A, 12A, 15A, 21A, 23A e 25A**), quanto de decréscimo da parasitemia (**Figuras 11A, 13A, 16A, 17A, 19A, 24A, 26A, 28A, 29A, 30A e 31A**). Apenas em cinco das 24 combinações não foram observados esses fenômenos (**Figuras 14A, 18A, 20A, 22A e 27A**), ou seja, não foram detectadas diferenças significativas entre os valores esperados e observados para as infecções mistas.

Aparentemente, não houve correlação entre a natureza da alteração e a combinação genotípica neste parâmetro.

Efeitos de estimulação foram detectados nas combinações dos genótipos **19+20** (3/4 - **Figuras 8A, 9A e 10A**), **19+39** (2/4 - **Figuras 12A e 15A**), **20+39** (2/4 - **Figuras 21A e 23A**) e **20+32** (1/4 - **Figura 25A**), representando 33,3% (8/24) das infecções mistas estudadas.

Efeitos de inibição entre os clones foram observados em 45,8% (11/24) das infecções mistas, ocorrendo em todas as misturas da combinação genotípica **39+32** (4/4 - **Figuras 28A, 29A, 30A e 31A**) e em menor proporção nas combinações **19+32** (3/4 - **Figuras 16A, 17A e 19A**), **20+32** (2/4 - **Figuras 24A e 26A**), **19+20** (1/4 - **Figuras 11A**) e **19+39** (1/4 - **Figura 13A**). A mistura OPS21 cl11 + SO3 cl5 apresentou efeito inibitório recíproco entre os clones da mistura (**Figura 13A**). Embora a infecção tenha sido comprovada em todos os animais por insistente pesquisa no exame

a fresco ou hemocultura, a parasitemia foi sempre sub-patente e a quantificação dos parasitos não foi possível por exame a fresco segundo a metodologia de Brener (1962).

Diferenças significativas quanto a parasitemia não foram registradas somente nas combinações dos genótipos mais distantes filogeneticamente **19+32** (Gambá c11 + MAS c11 - **Figura 18A**), **20+39** (P209 c11 + Bug2148 c11, P209 c11 + SO3 c15 - **Figuras 20A e 22A**) e **20+32** (Cuica c11 + IVV c14 - **Figura 27A**).

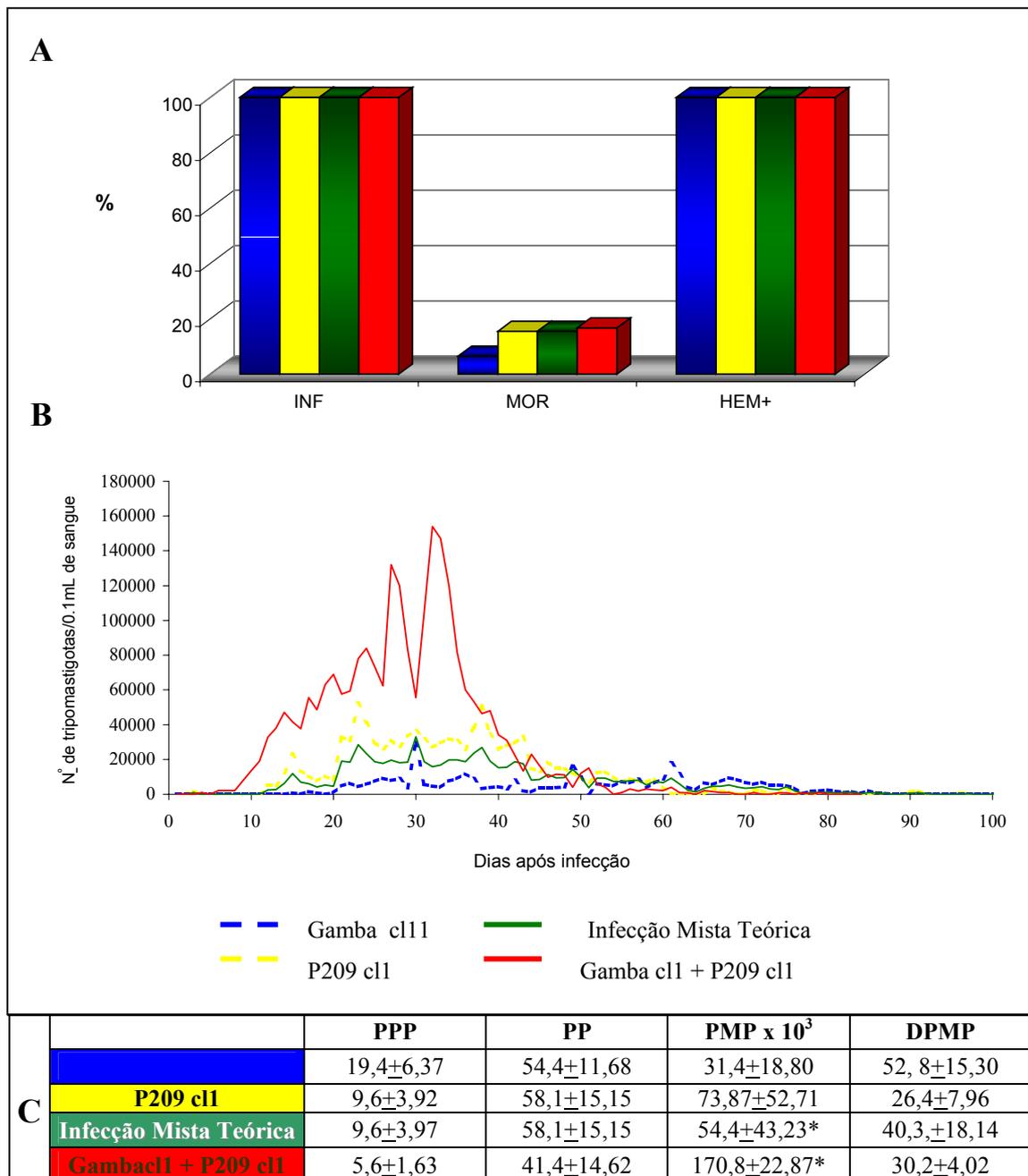


FIGURA 8: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 20 representados por Gamba c11 (+ virulento) e P209 C11 (+ virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando não ter ocorrido diferenças entre os valores esperados e observados na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito estimulador entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferença significativa (*) entre os valores esperado e observado na infecção mista foi verificada no parâmetro PMP.

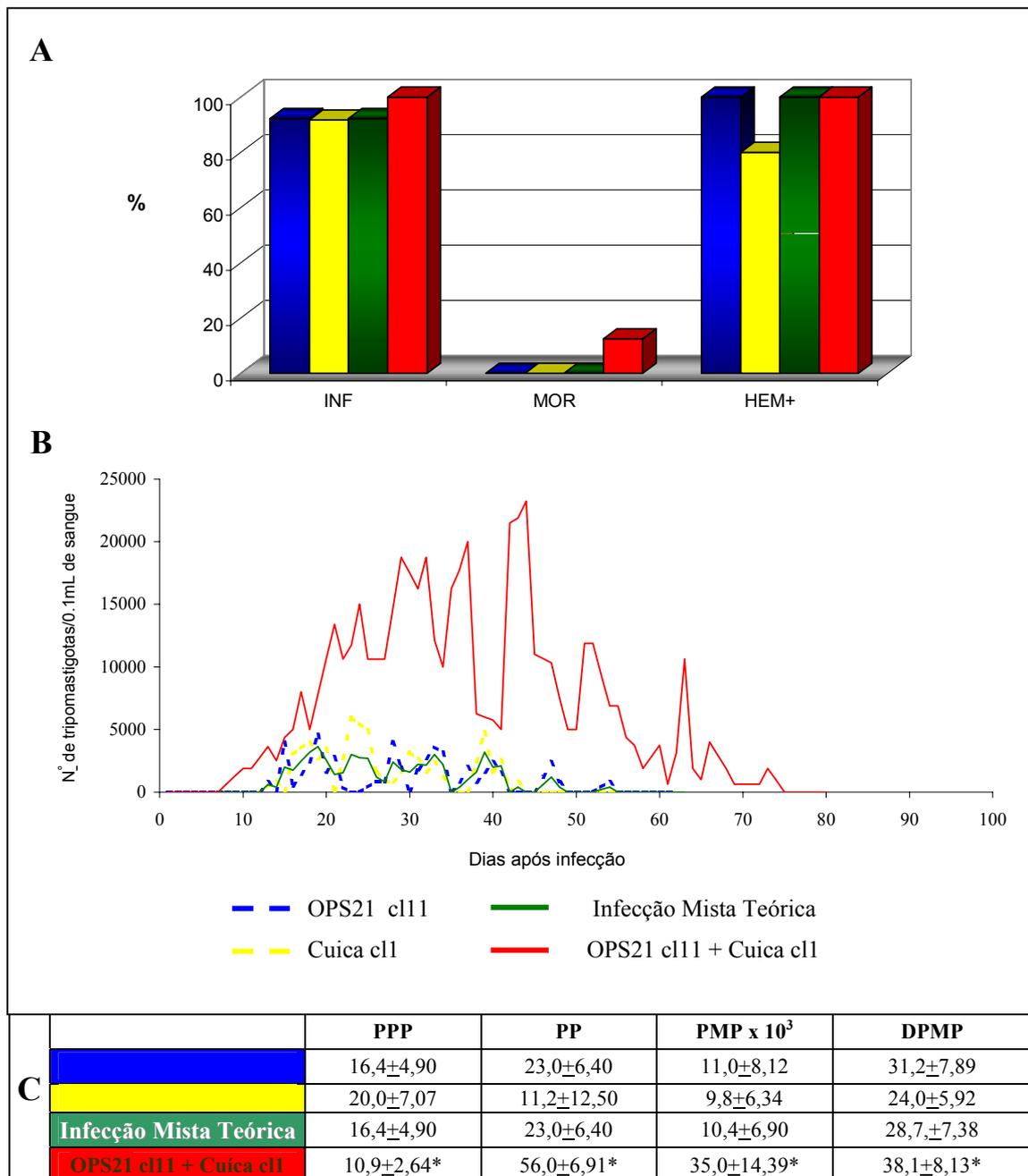


FIGURA 9: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 20 representados por OPS21 c111 (- virulento) e Cuica c11 (- virulento). **A** - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando não ter ocorrido diferenças entre os valores esperados e observados na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito estimulador entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista não foram verificadas em todos os parâmetros avaliados.

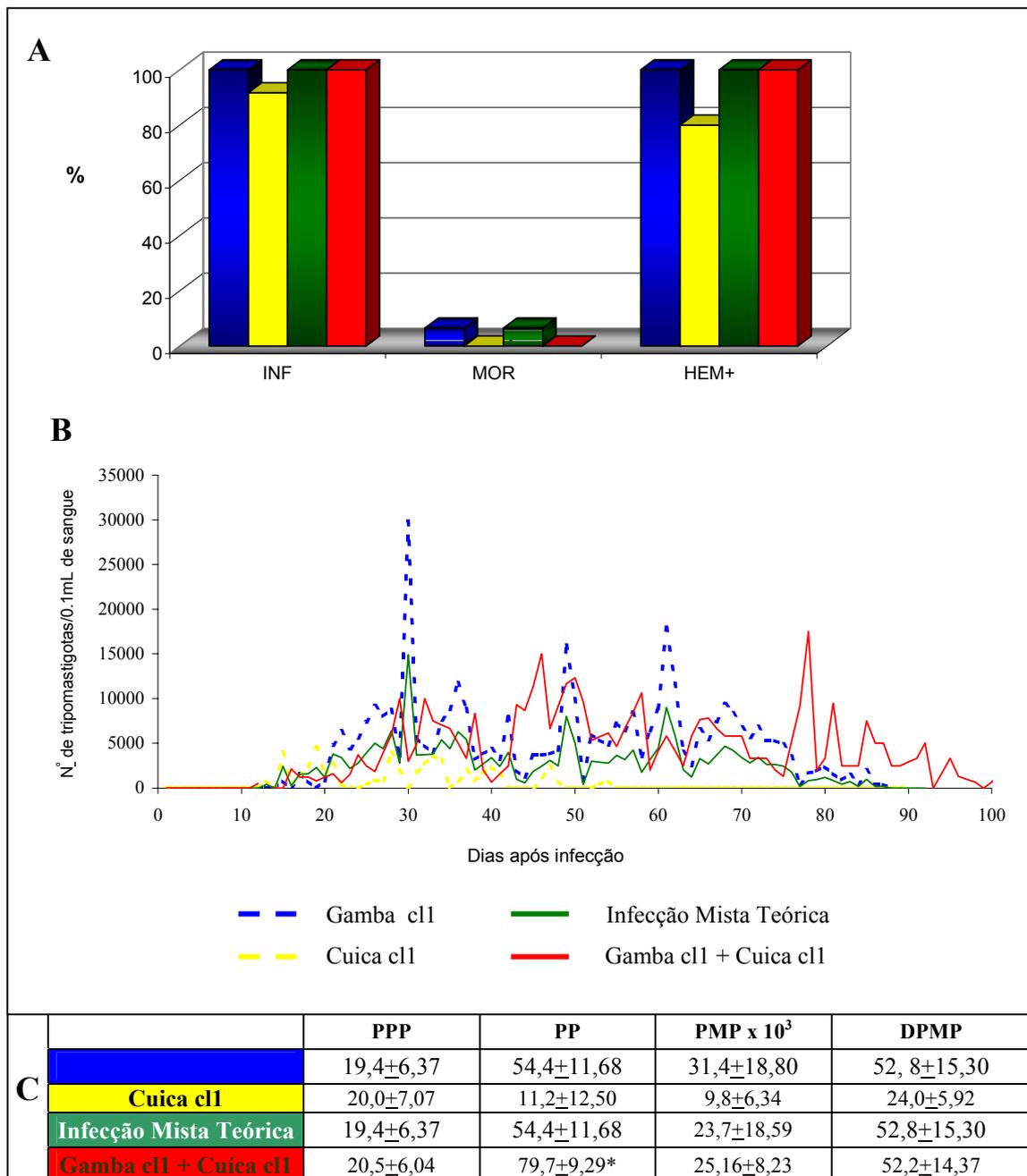


FIGURA 10: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 20 representados por Gamba c11 (+ virulento) e Cuica c11 (- virulento). **A** - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando não ter ocorrido diferenças entre os valores esperados e observados na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito estimulador entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferença significativa (*) entre os valores esperado e observado na infecção mista foi verificada no parâmetro PP.

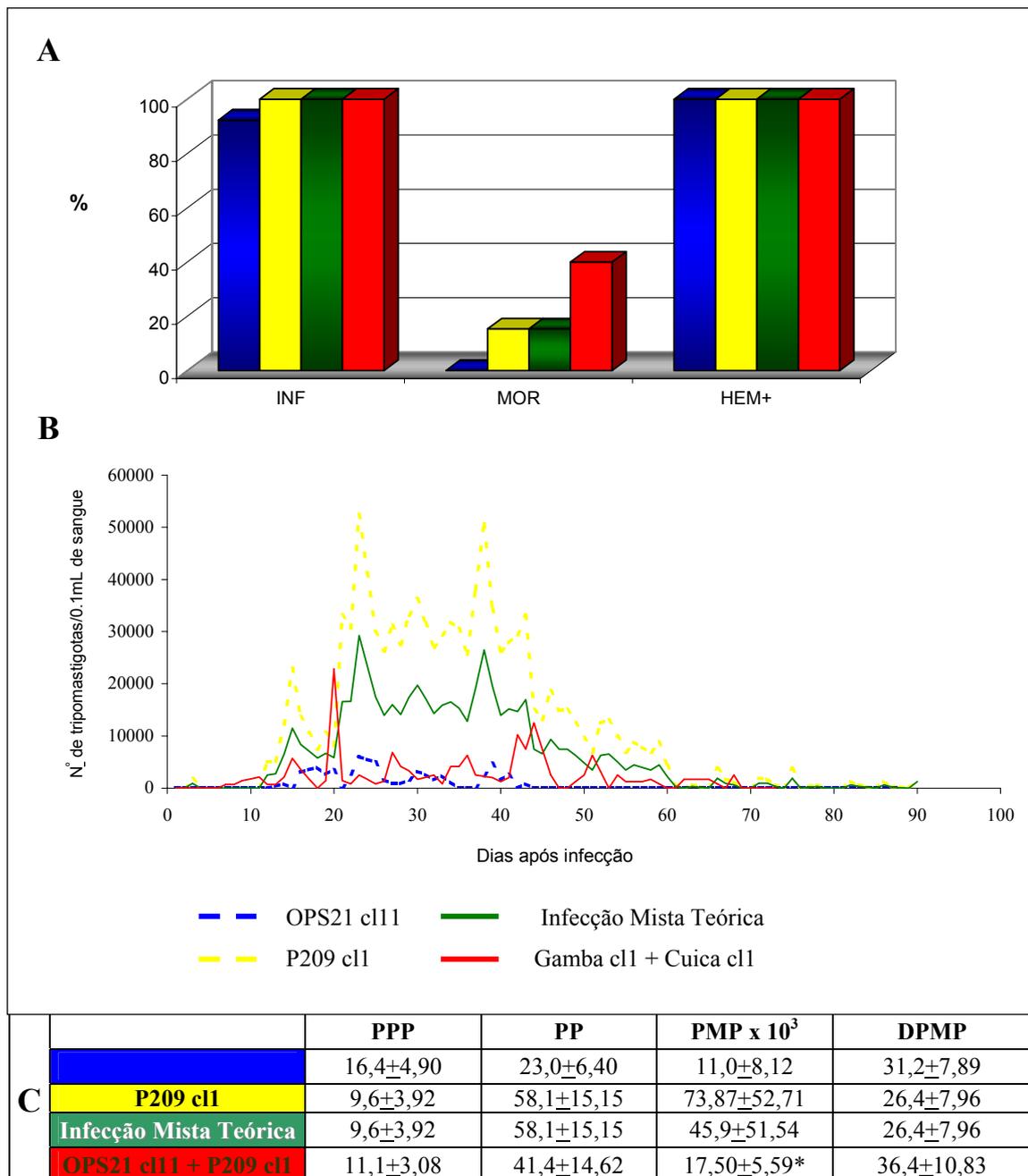


FIGURA 11: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 20 representados por OPS21 c11 (- virulento) e P209c11 (+ virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, representando aumento considerável da mortalidade na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito inibidor entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média \pm desvio padrão, diferença significativa (*) entre os valores esperado e observado na infecção mista foi verificada no parâmetro PMP.

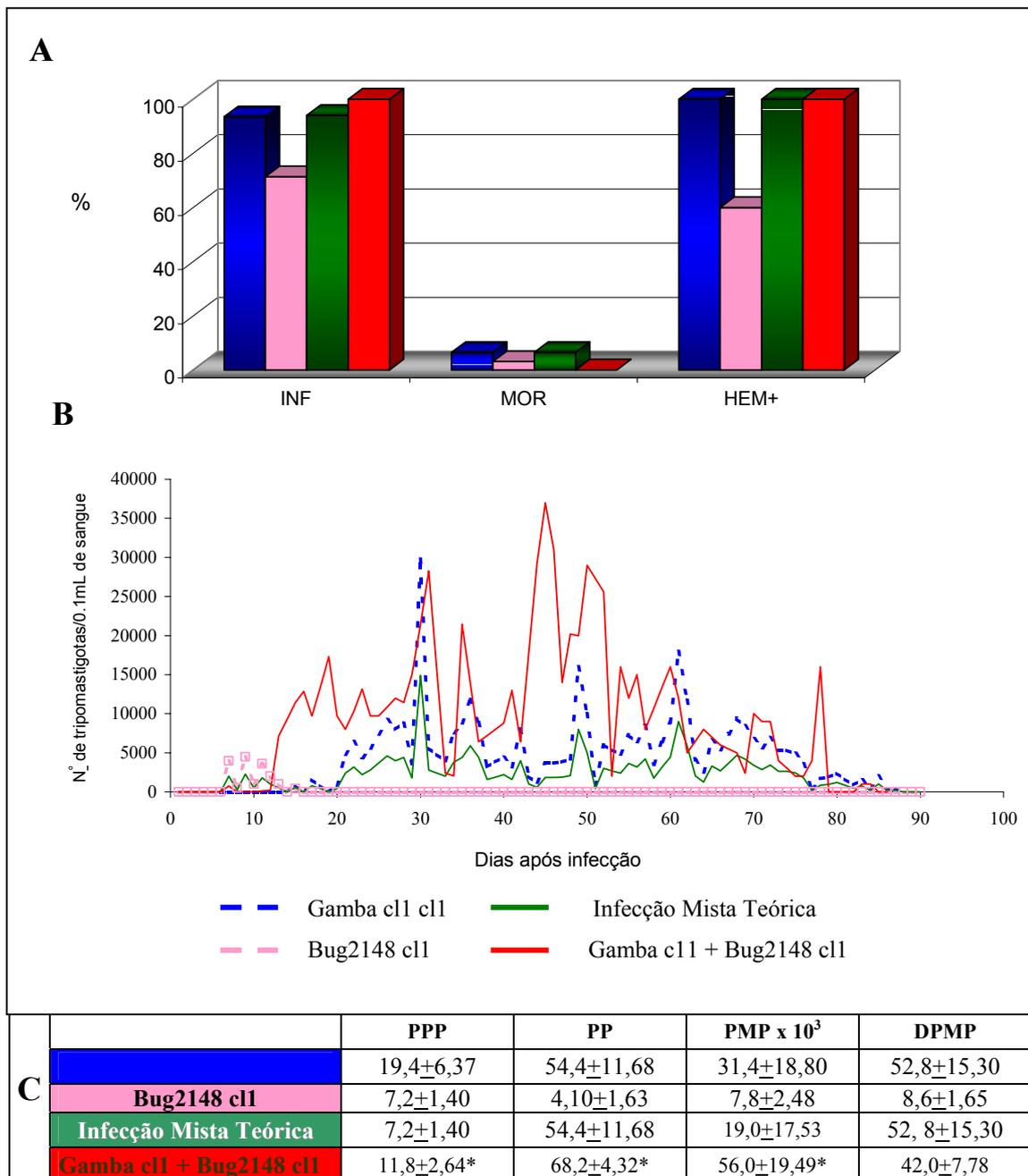


FIGURA 12: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 39 representados por Gamba c11 (+ virulento) e Bug2148 c11 (+ virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura demonstrando não ter ocorrido diferenças entre os valores esperados e observados na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito inibidor entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PPP, PP e PMP.

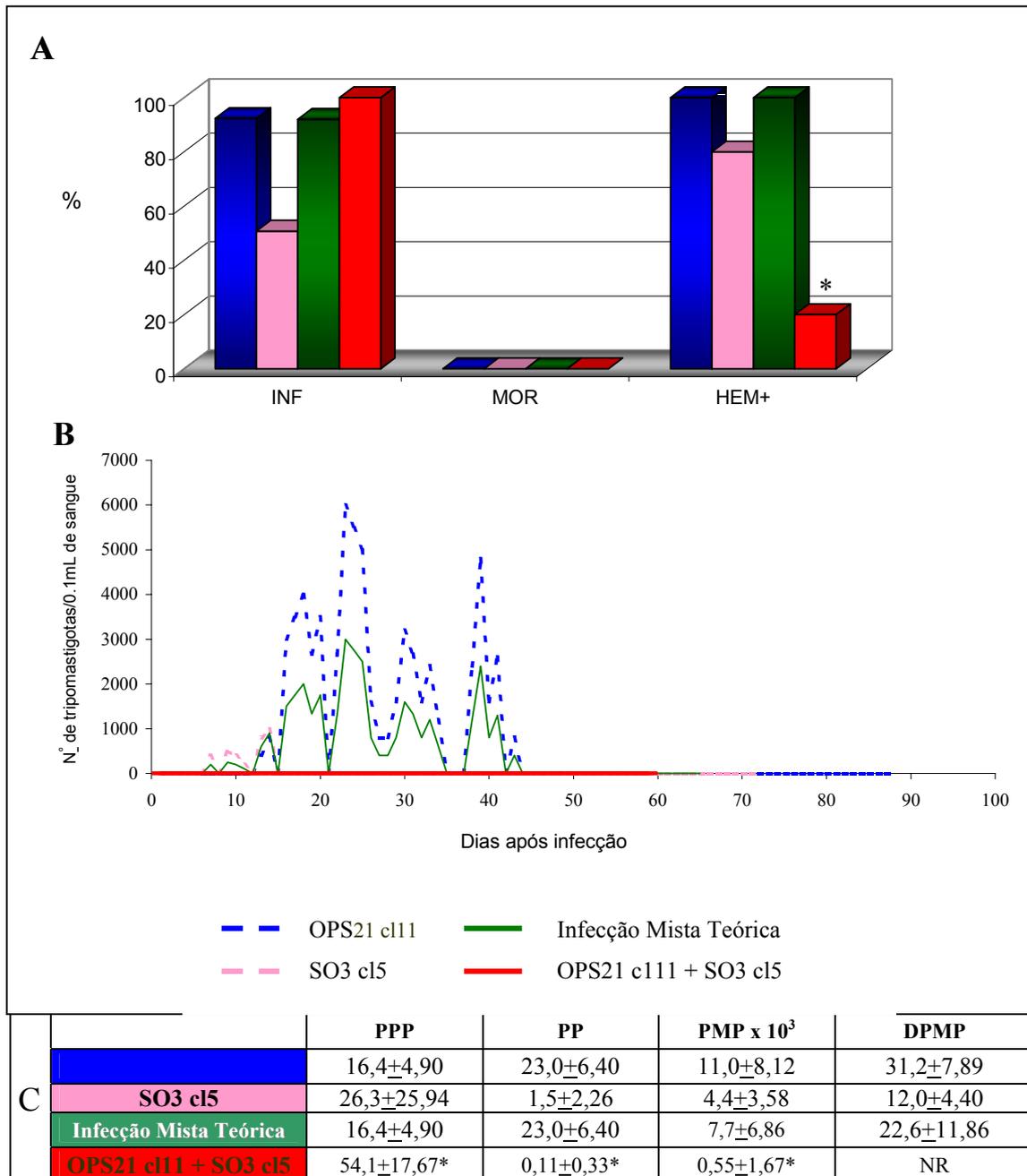


FIGURA 13: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 39 representados por OPS21 c111 (- virulento) e SO3 cl5 (- virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando redução significativa da positividade da hemocultura na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito inibidor recíproco entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média \pm desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PPP, PP, PMP. NR = não registrado.

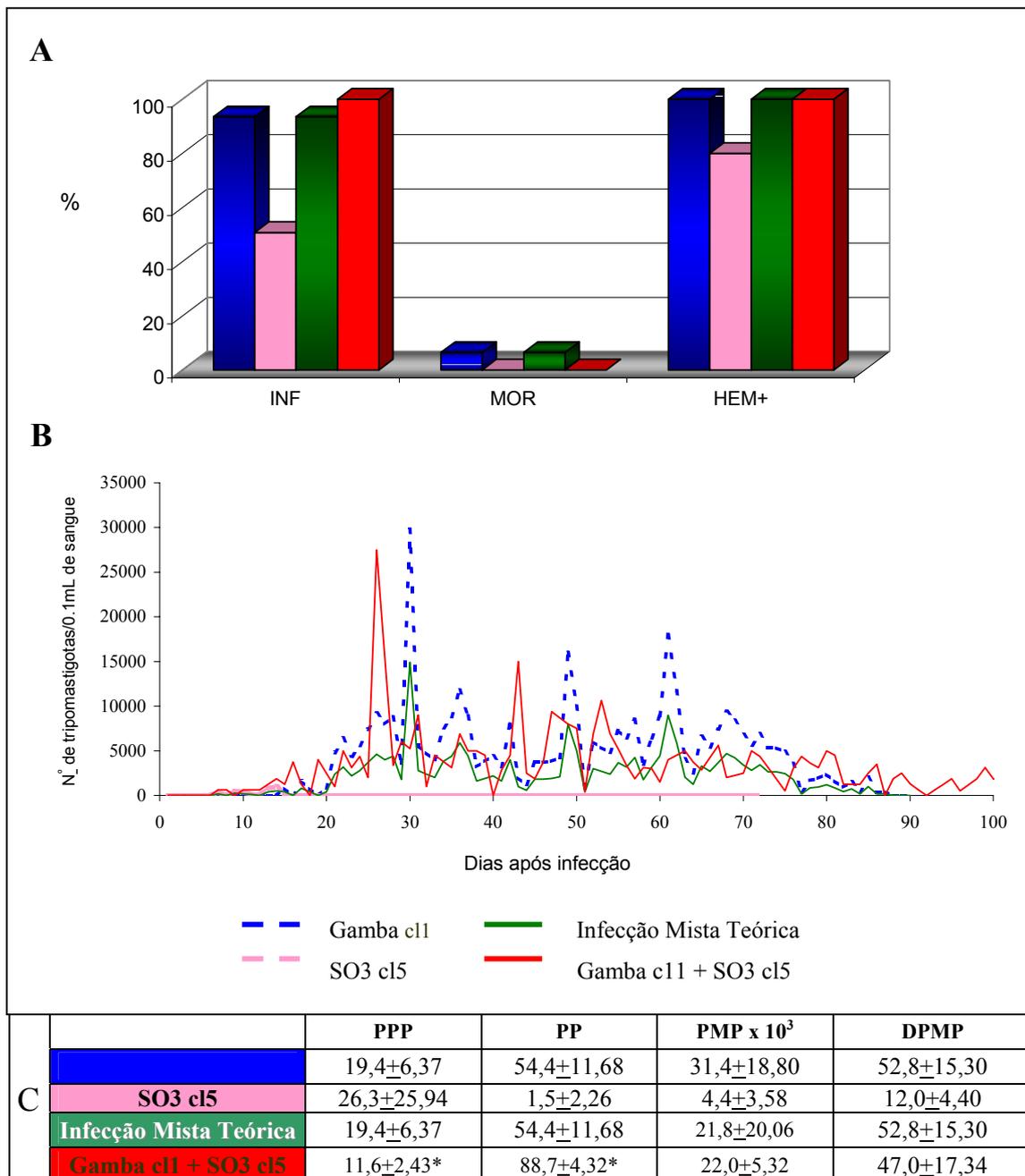


FIGURA 14: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 39 representados por Gamba c11 (+ virulento) e SO3 cl5 (- virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando não ter ocorrido diferenças entre os valores esperados e observados na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito semelhante entre as infecções mistas experimental e teórica.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PPP e PP.

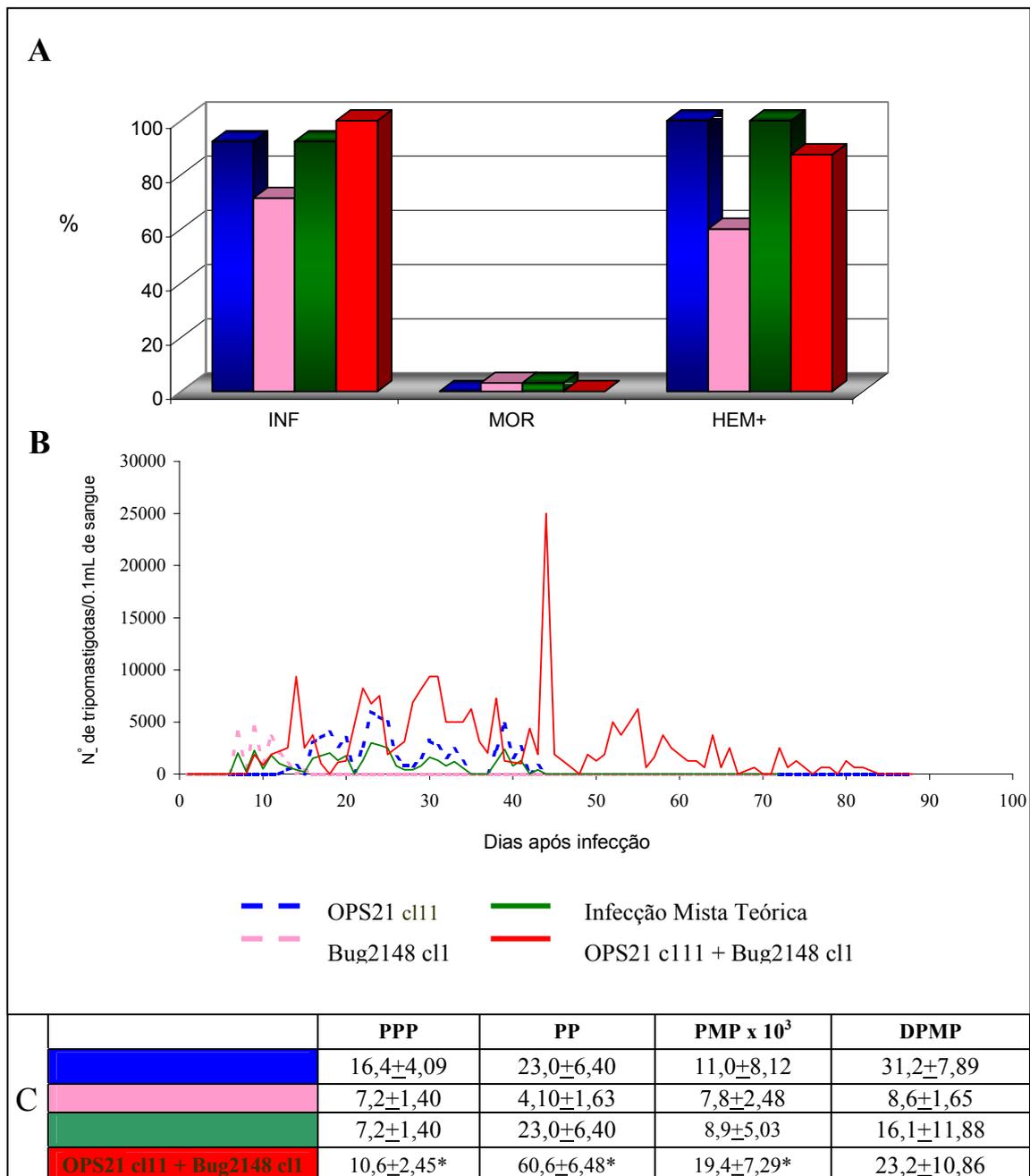


FIGURA 15: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 39 representados por OPS21 c111 (- virulento) e Bug2148 c11 (+ virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando redução da positividade da hemocultura na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito estimulador entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PPP, PP e PMP.

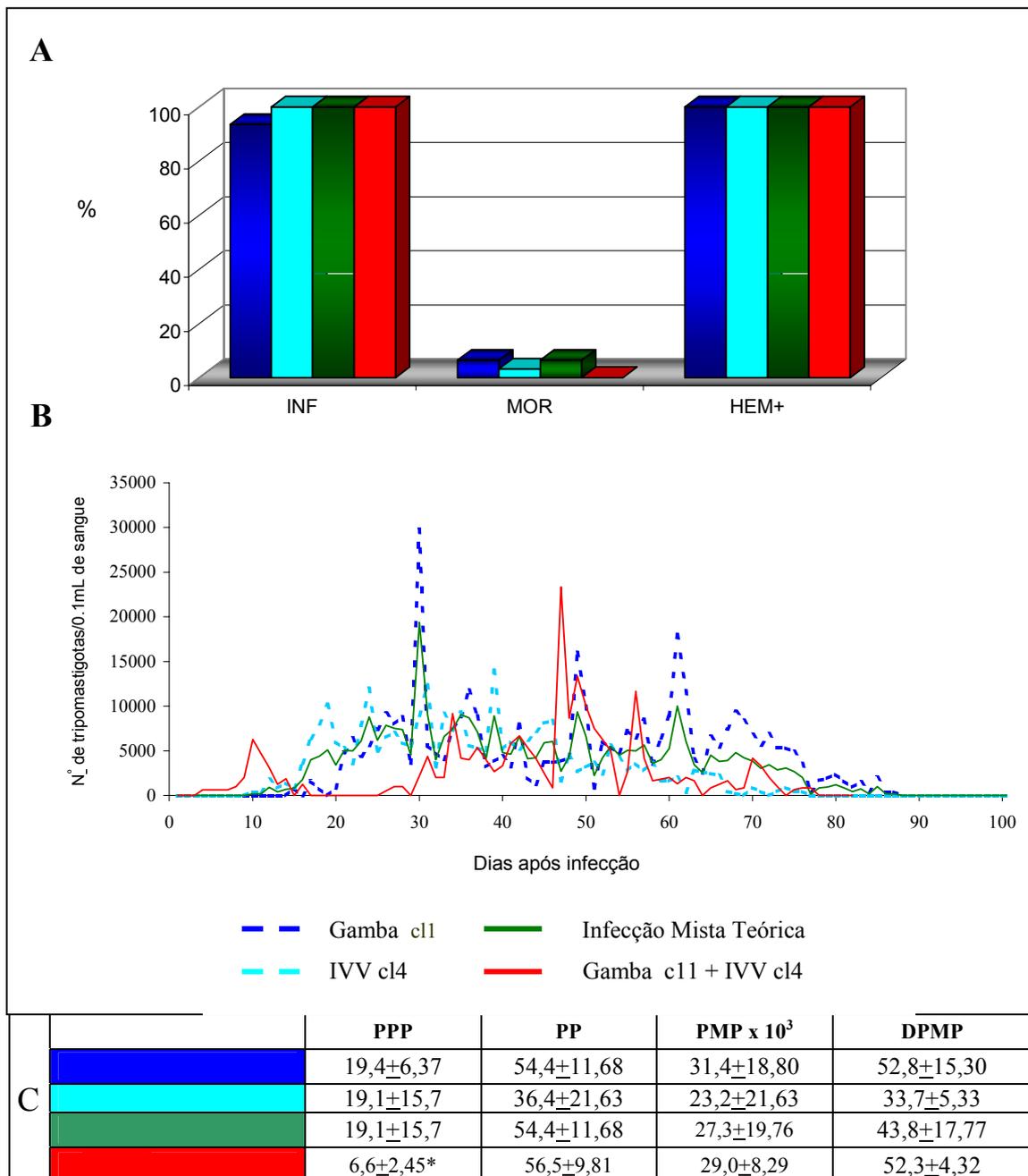


FIGURA 16: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 32 representados por Gamba c11 (+ virulento) e IVV c14 (+ virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando não ter ocorrido diferenças entre os valores esperados e observados na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito inibidor entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferença significativa (*) entre os valores esperado e observado na infecção mista foi verificada no parâmetro PPP.

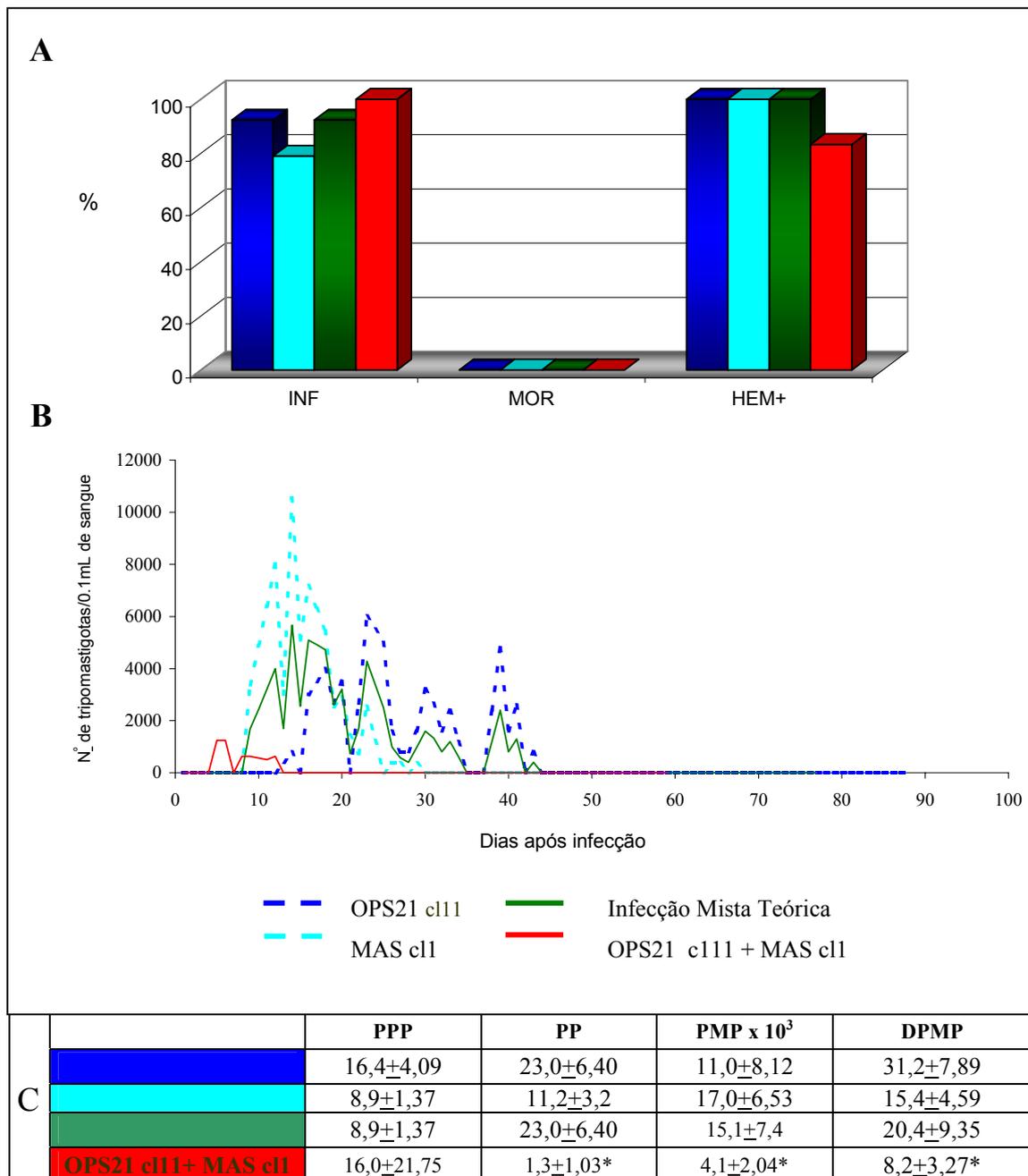


FIGURA 17: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 32 representados por OPS21 c11 (- virulento) e MAS c11 (- virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando redução da positividade da hemocultura na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito inibidor entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PP, PMP e DPMP.

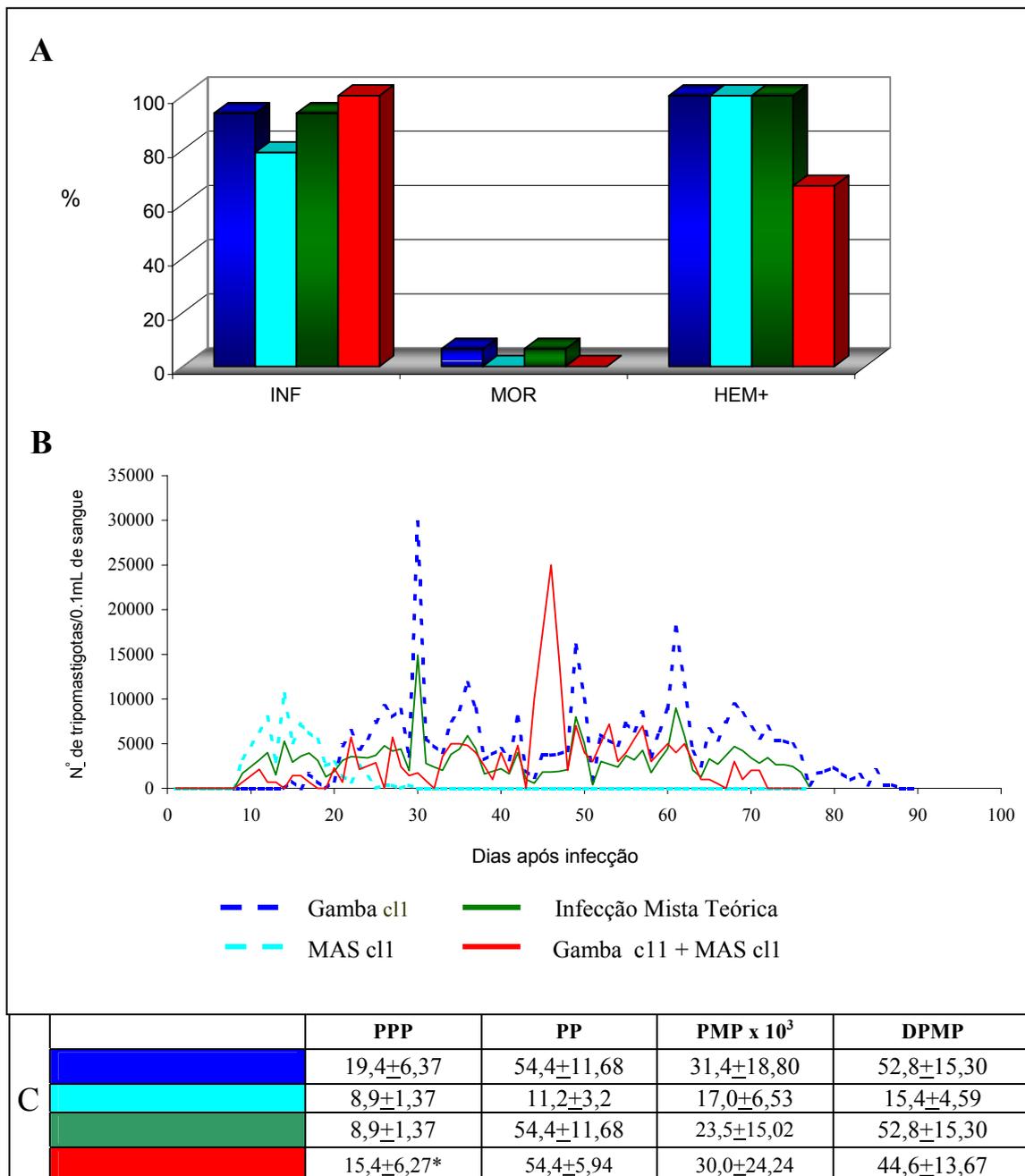


FIGURA 18: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 32 representados por Gamba c11 (+virulento) e MAS c11 (- virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando redução da positividade da hemocultura na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito semelhante entre as infecções mistas experimental e teórica.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferença significativa (*) entre os valores esperado e observado na infecção mista foi verificada no parâmetro PPP.

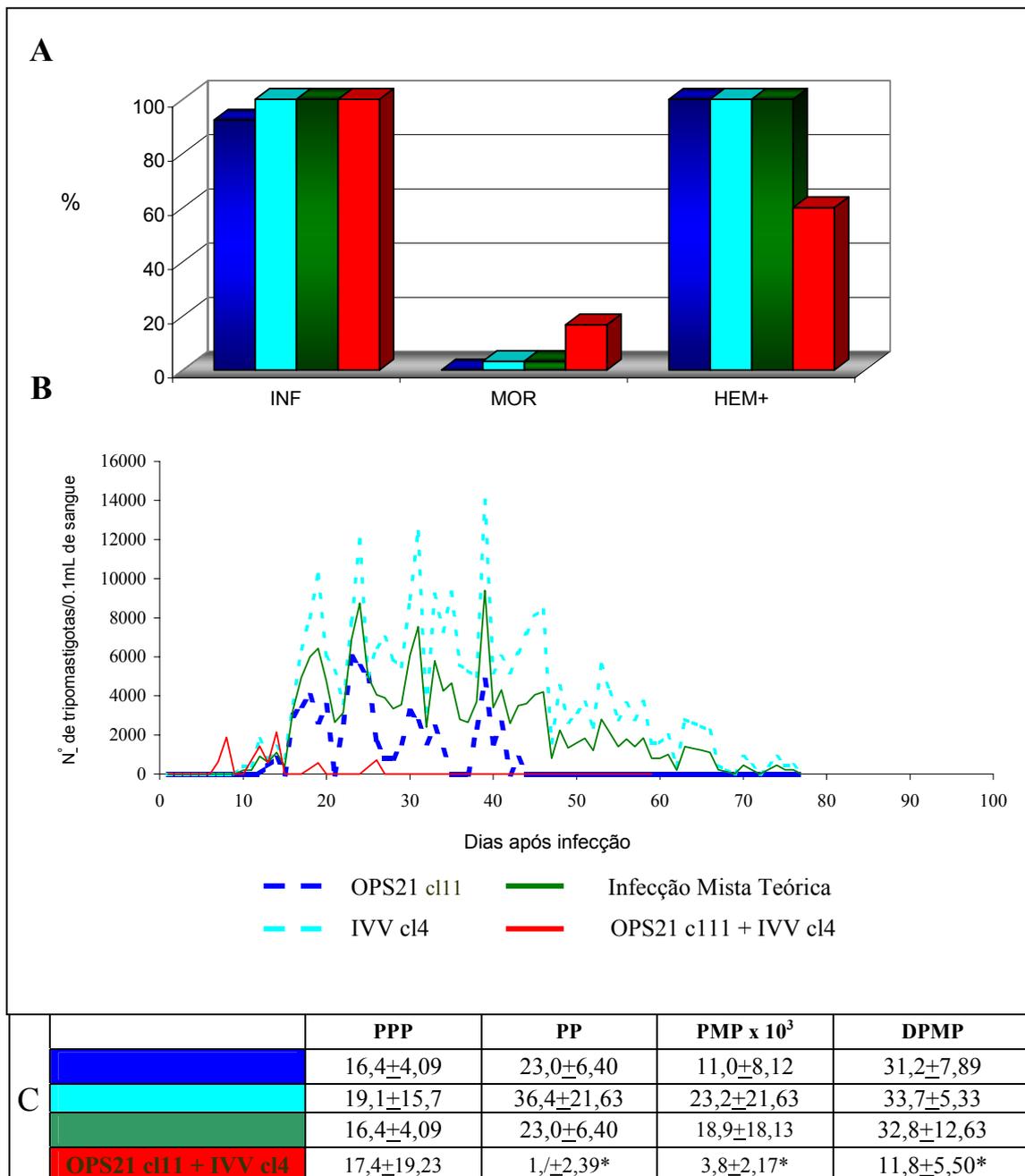


FIGURA 19: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 19 e 32 representados por OPS21 c111 (- virulento) e IVV c14 (+ virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando redução da positividade da hemocultura na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito inibidor entre os clones da mistura.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média \pm desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PP, PMP, DPMP.

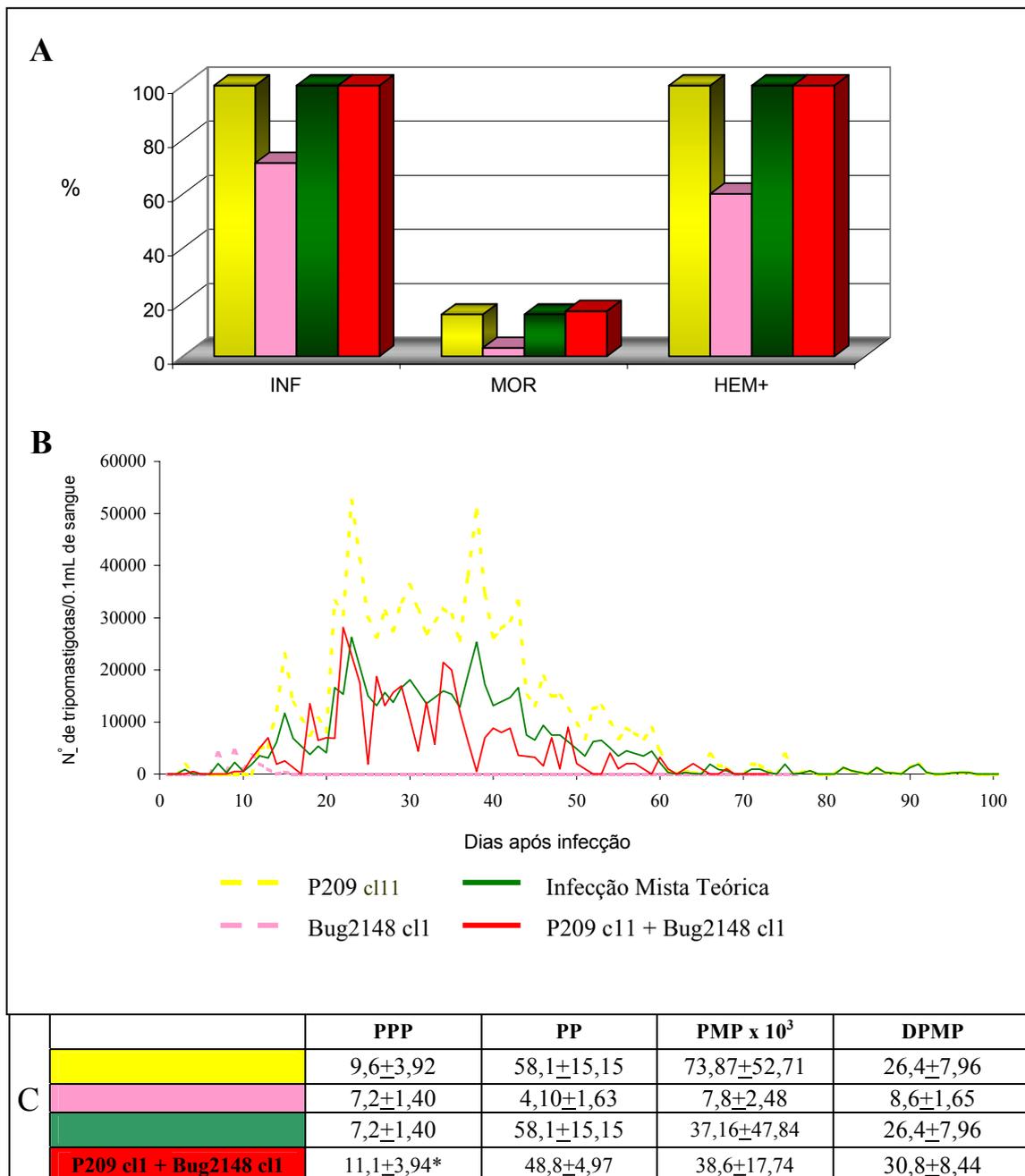


FIGURA 20: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 39 representados por P209 c11 (+ virulento) e Bug2148 c11 (+ virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando não ter ocorrido diferenças entre os valores esperados e observados para a infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito semelhante entre as infecções mistas experimental e teórica.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferença significativa (*) entre os valores esperado e observado na infecção mista foi verificada no parâmetro PPP.

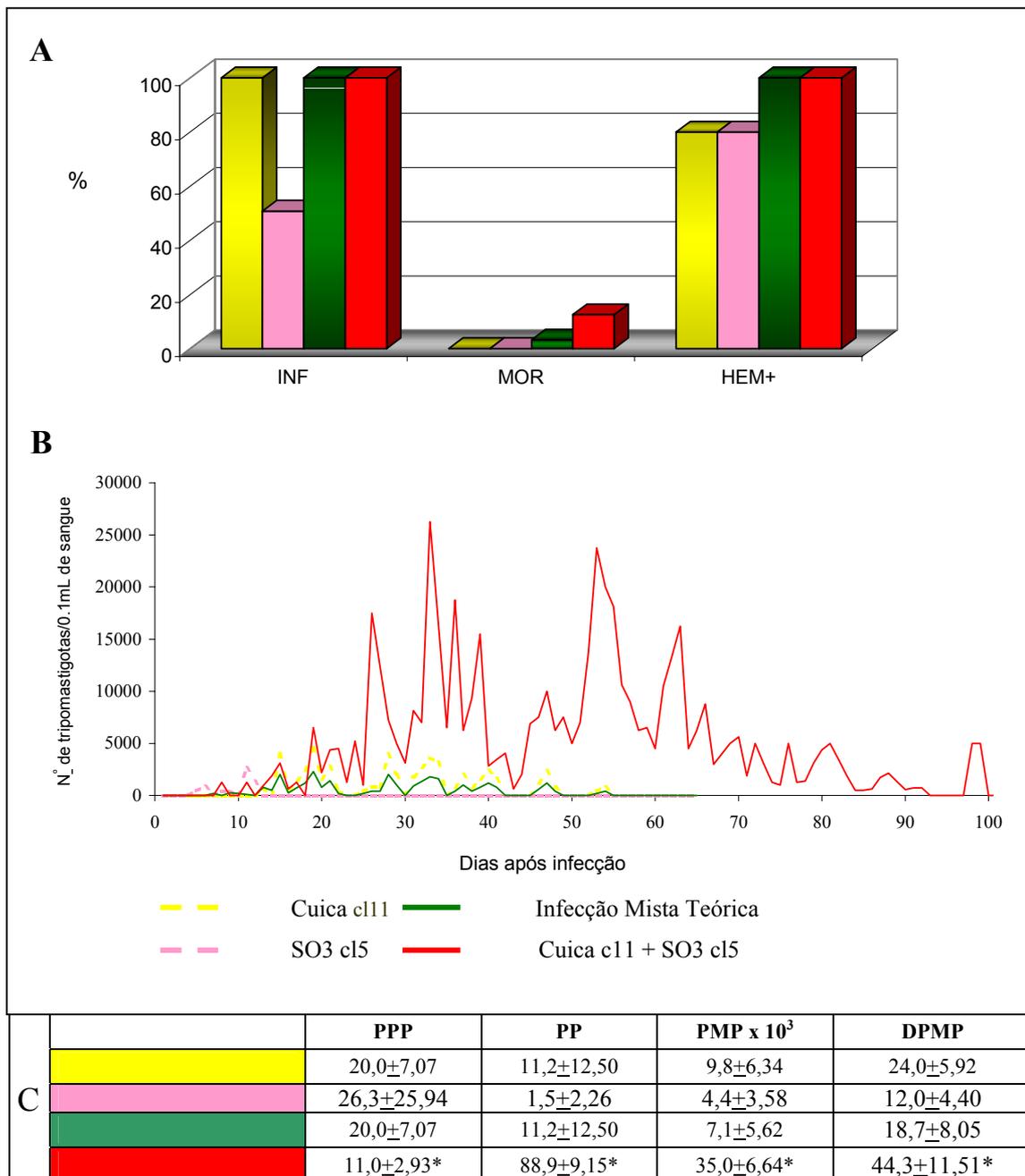


FIGURA 21: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 39 representados por Cuica c11 (- virulento) e IVV c14 (+ virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultural, demonstrando aumento da mortalidade e da positividade da hemocultura na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito estimulador entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PPP, PP, PMP e DPMP.

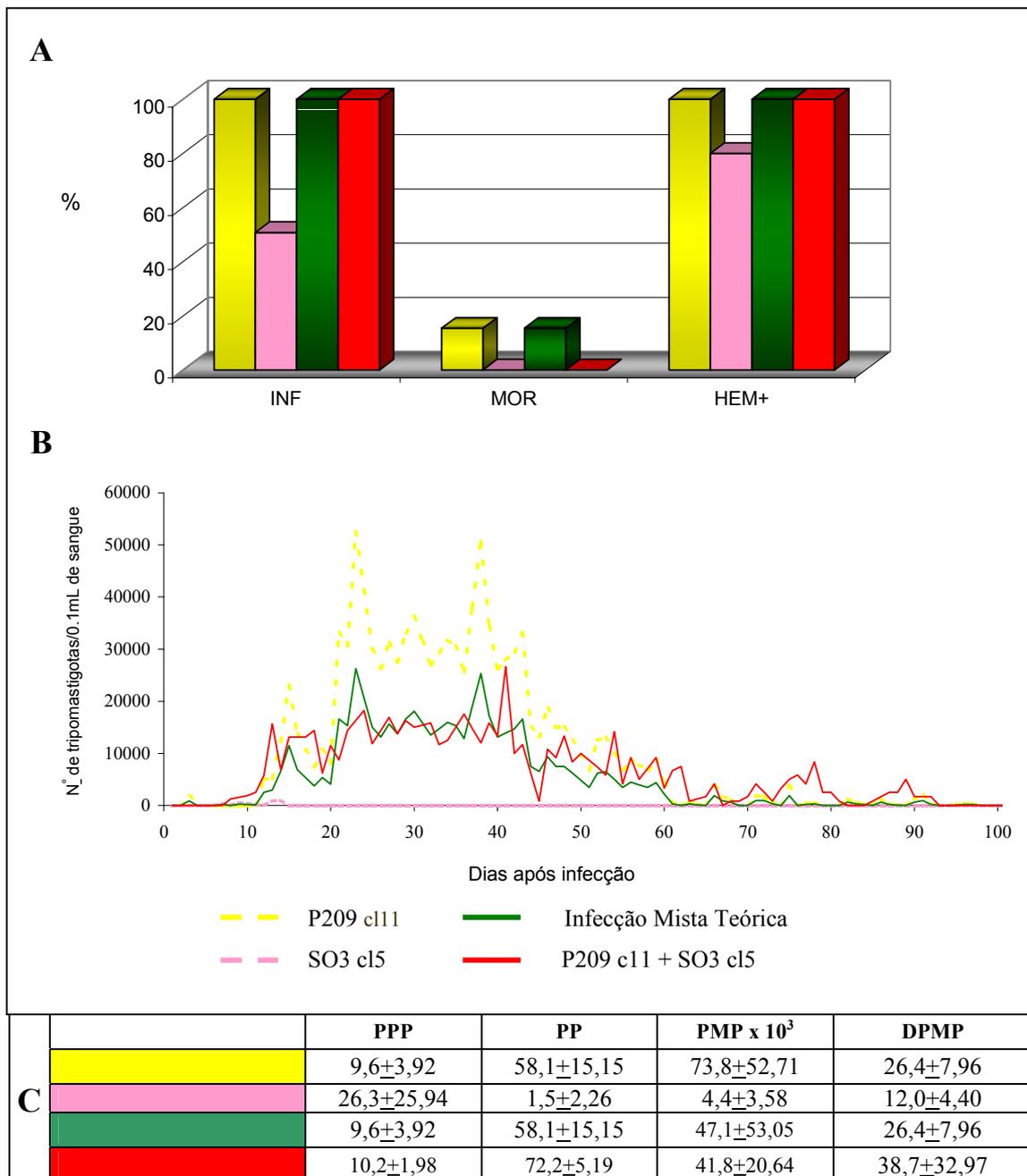


FIGURA 22: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 39 representados por P209 c11 (+ virulento) e SO3 c15 (- virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando redução da taxa de mortalidade na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito semelhante entre a infecções mistas experimental e teórica.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista não foram verificadas em nenhum dos parâmetros estudados.

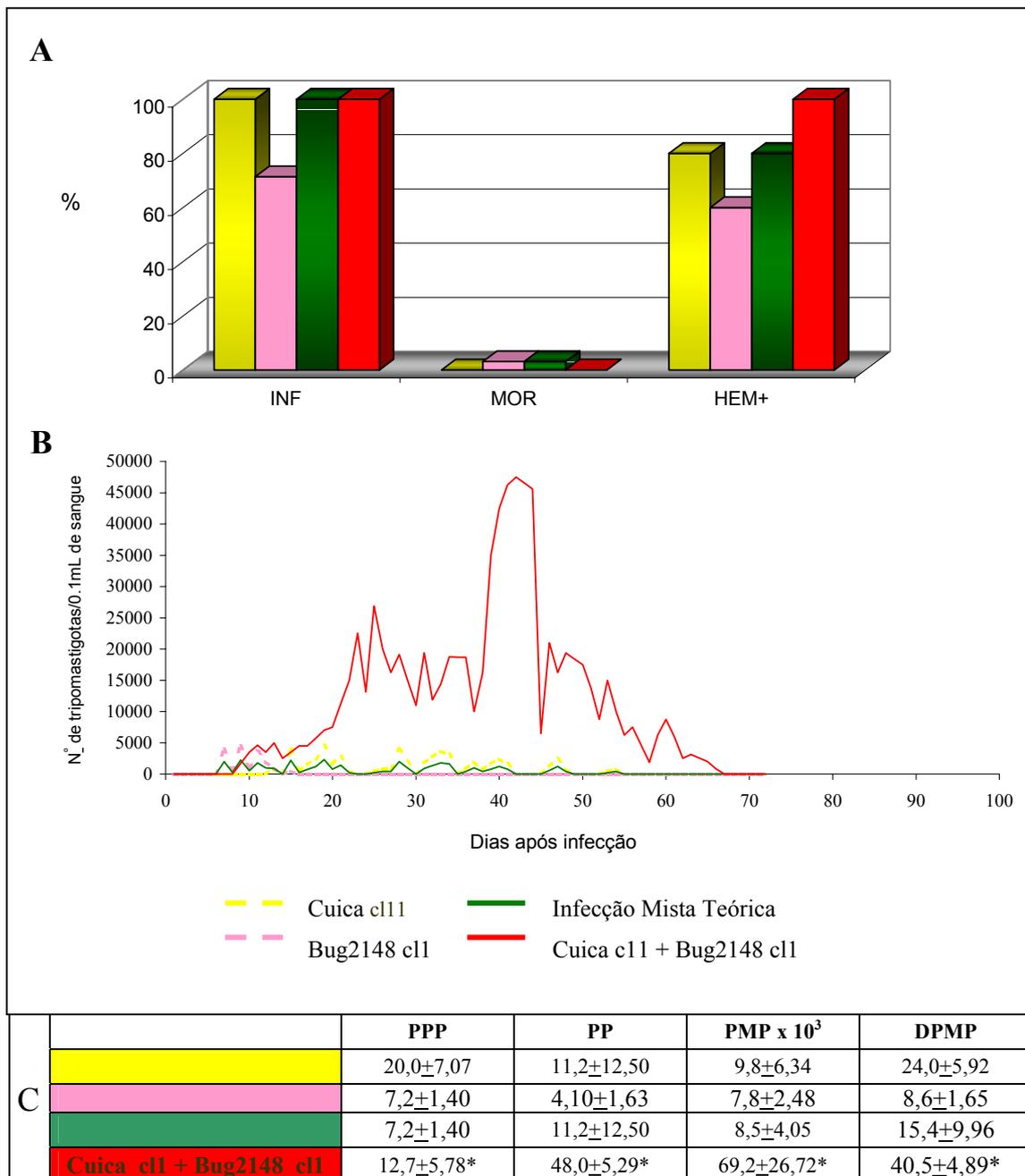


FIGURA 23: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 39 representados por Cuica c11 (-virulento) e Bug2148 c11 (+ virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando aumento da positividade da hemocultura na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito estimulador entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média \pm desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PPP, PP, PMP e DPMP.

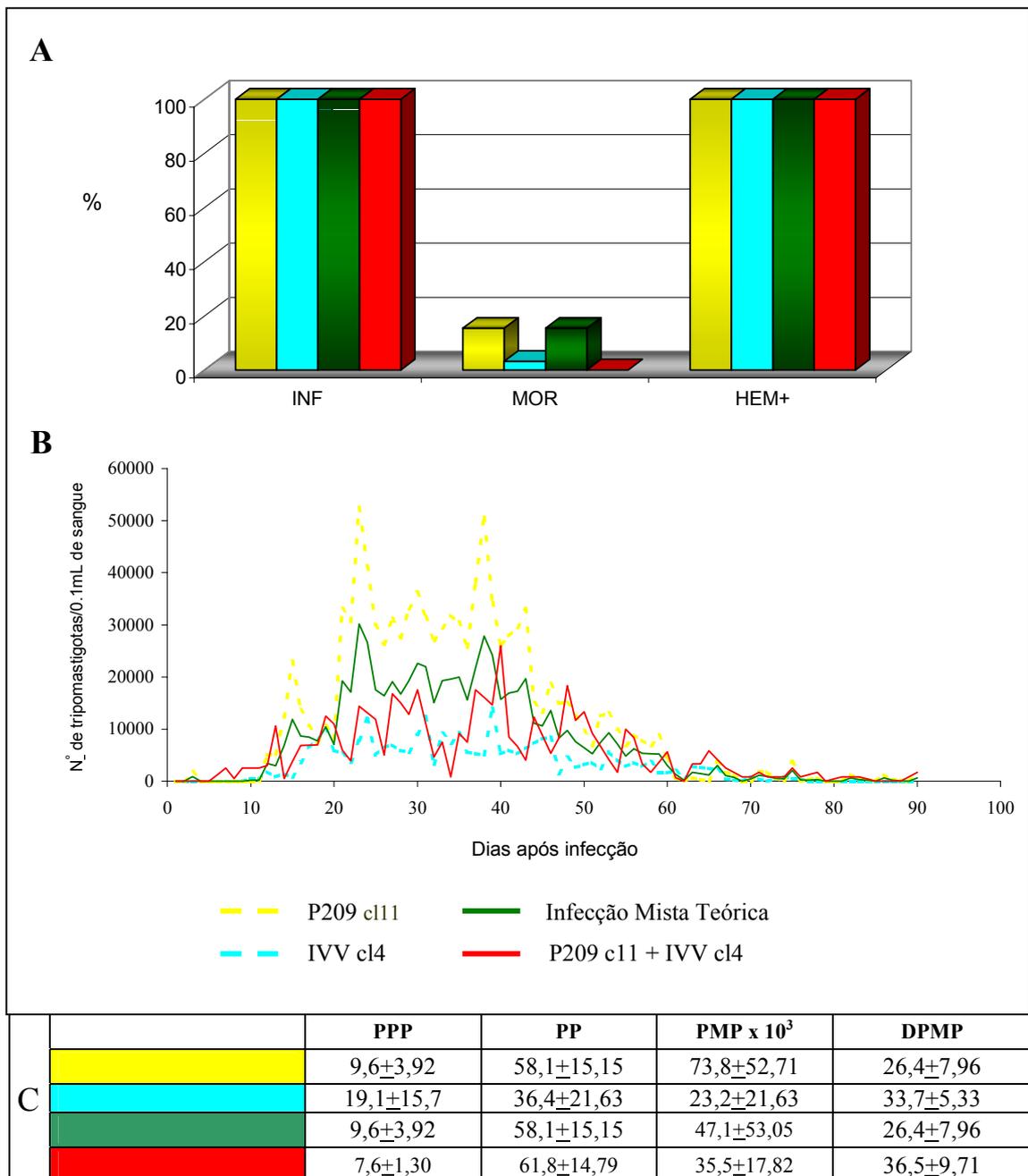


FIGURA 24: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 32 representados por P209 c11 (+ virulento) e IVV c14 (+ virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando não ter ocorrido diferenças entre os valores esperados e observados na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito inibidor entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média \pm desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PPP, PP, PMP e DPMP.

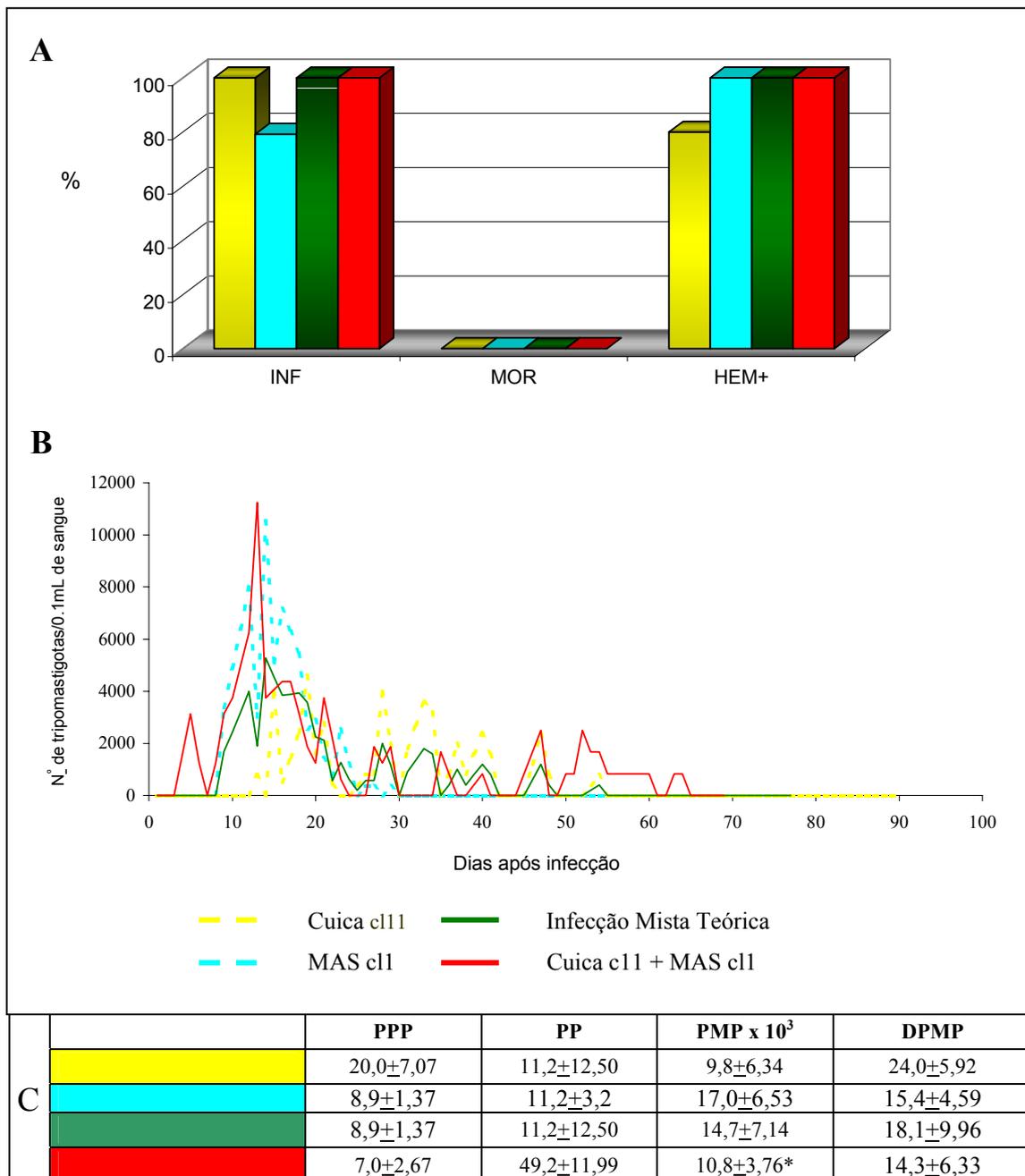


FIGURA 25: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 32 representados por Cuica c11 (- virulento) e MAS c11 (- virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando não ter ocorrido diferenças entre os valores esperados e observados na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito estimulador entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferença significativa (*) entre os valores esperado e observado na infecção mista foi verificada no parâmetro PMP.

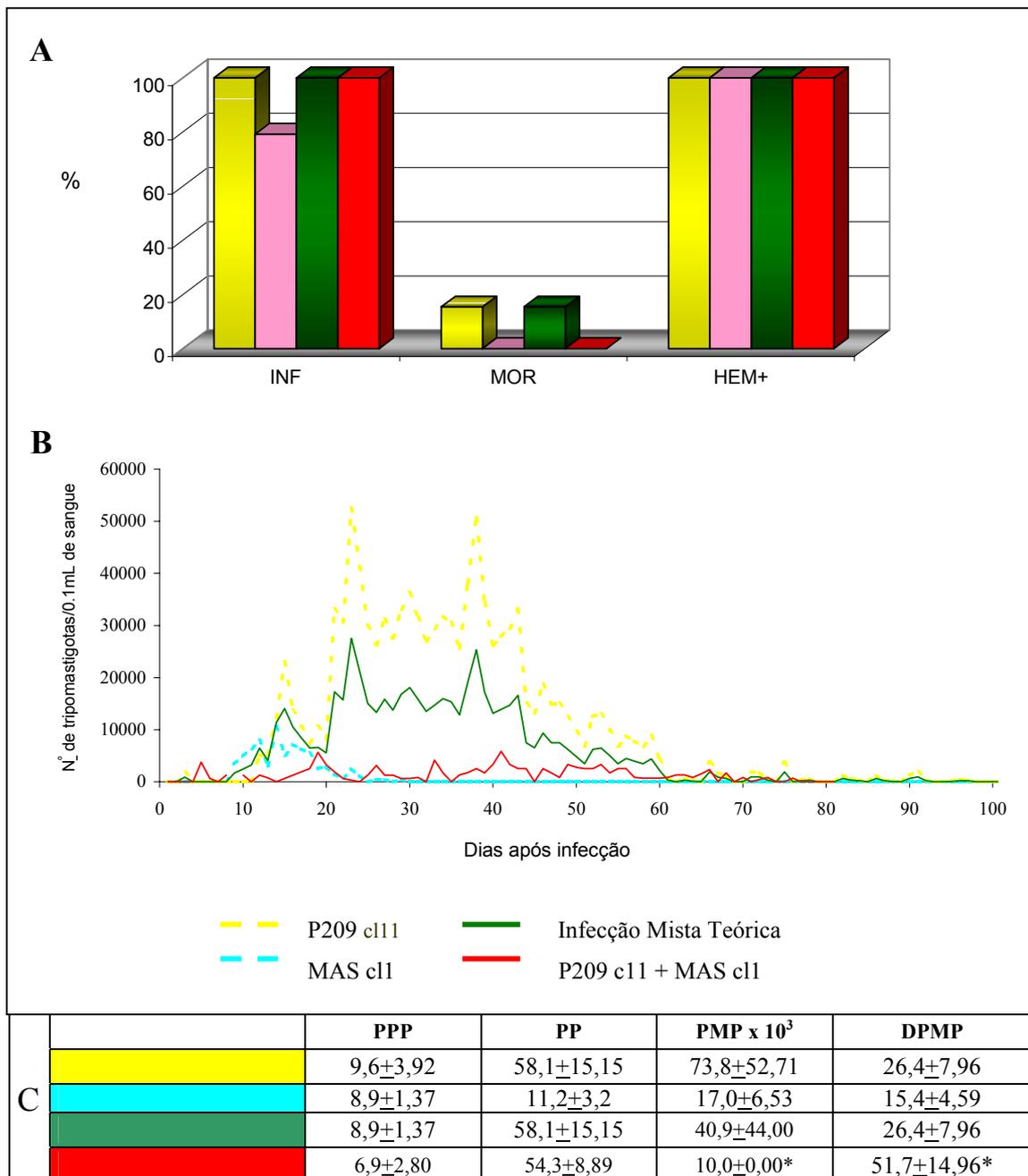


FIGURA 26: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 32 representados por P209 c11 (+ virulento) e MAS c11 (- virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando não ter ocorrido diferenças entre os valores esperados e observados na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito inibidor entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PMP e DPMP.

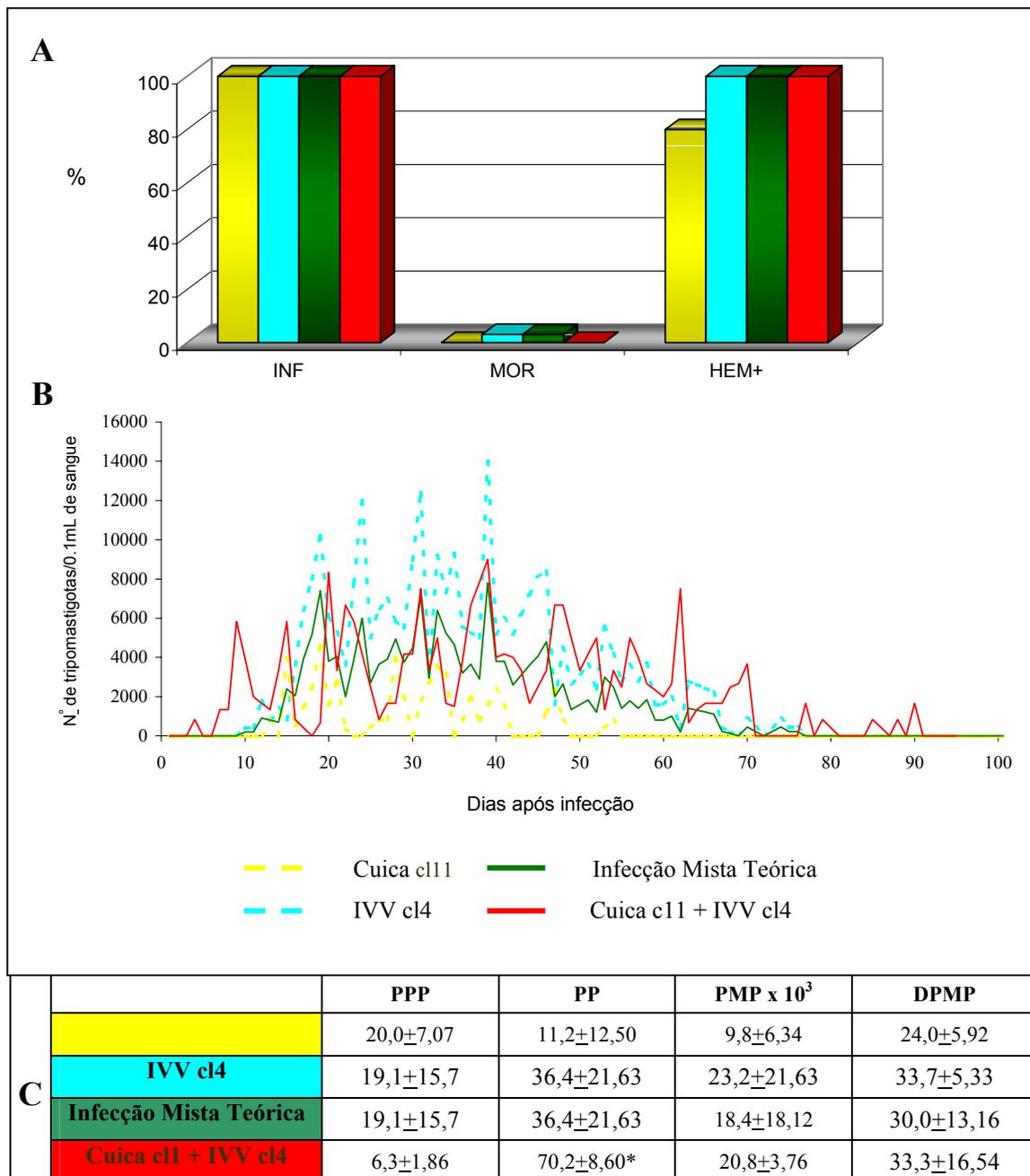


FIGURA 27: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 20 e 32 representados por Cuica c11 (- virulento) e IVV c14 (+ virulento).

A – INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando não ter ocorrido diferenças entre os valores esperados e observados na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito semelhante entre as infecções mistas experimental e teórica.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPM = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferença significativa (*) entre os valores esperado e observado na infecção mista foi verificada no parâmetro PP.

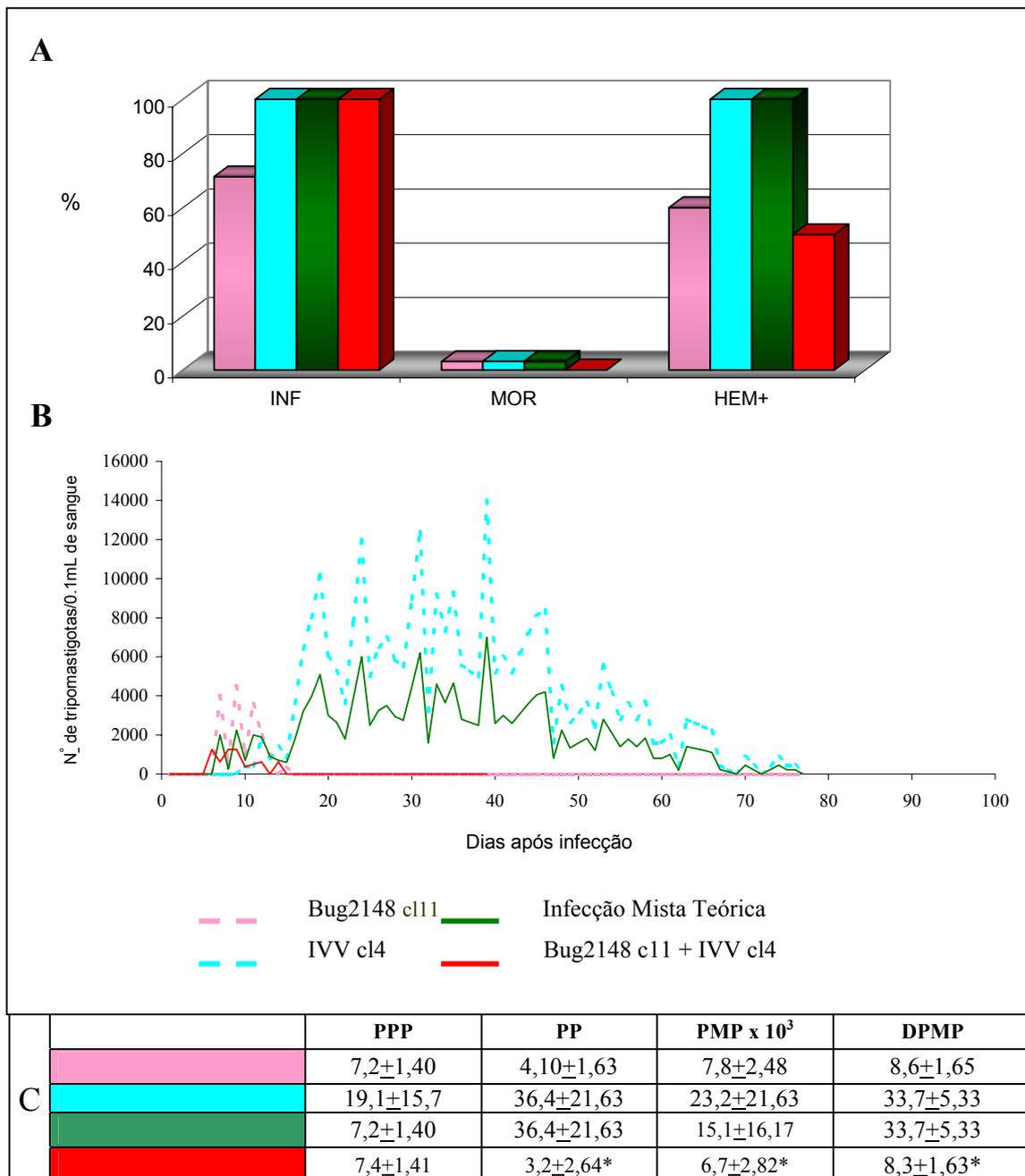


FIGURA 28: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 39 e 32 representados por Bug2148 c11 (+ virulento) e IVVc14 (+ virulento).

A – INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando redução da positividade da hemocultura na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito inibidor entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPMP = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PP, PMP e DPMP.

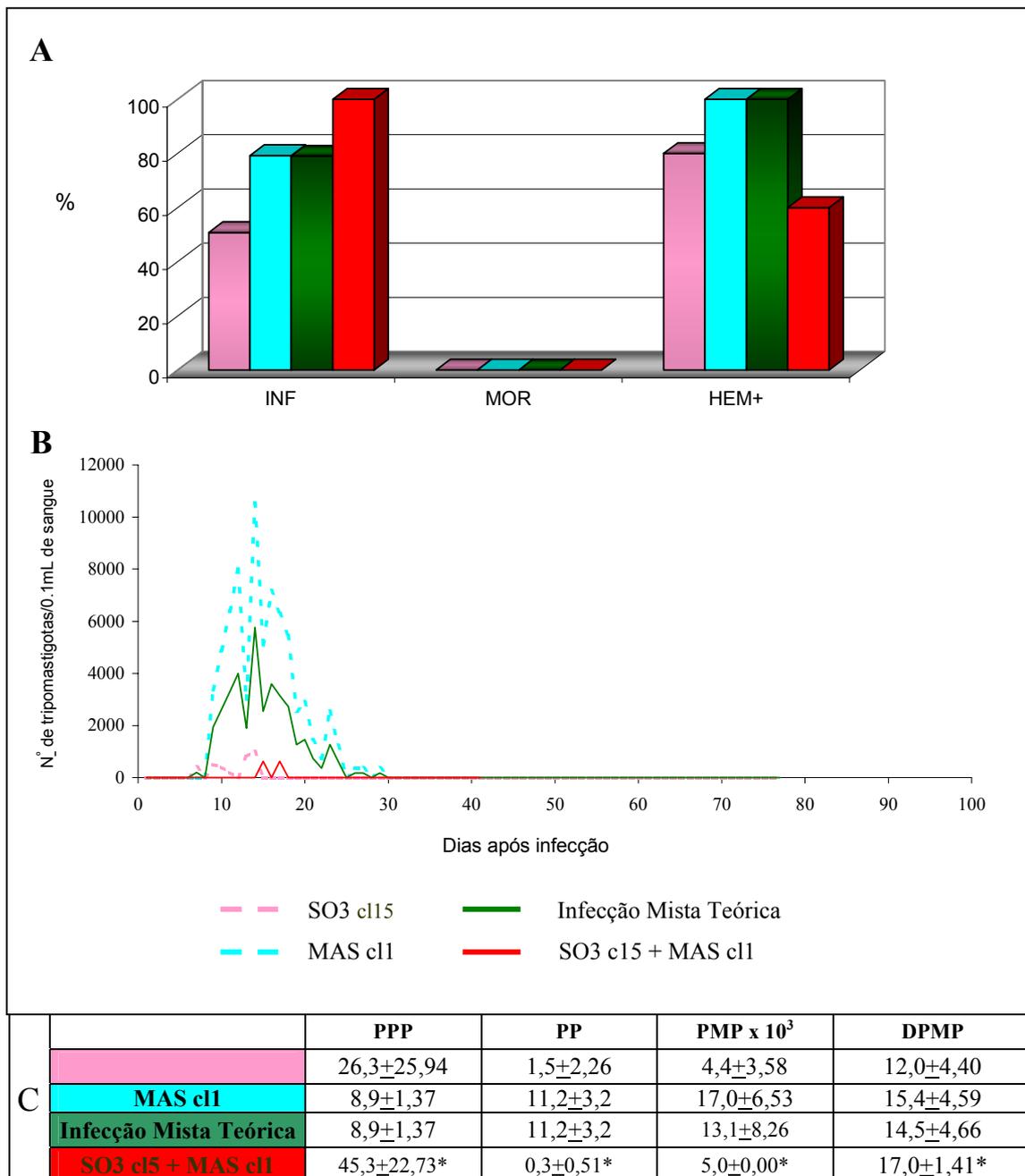


FIGURA 29: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 39 e 32 representados por SO3 c15 (- virulento) e MAS c11 (- virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando aumento na infectividade e diminuição da positividade da hemocultura na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito inibidor entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPMP = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PP, PMP e DPMP.

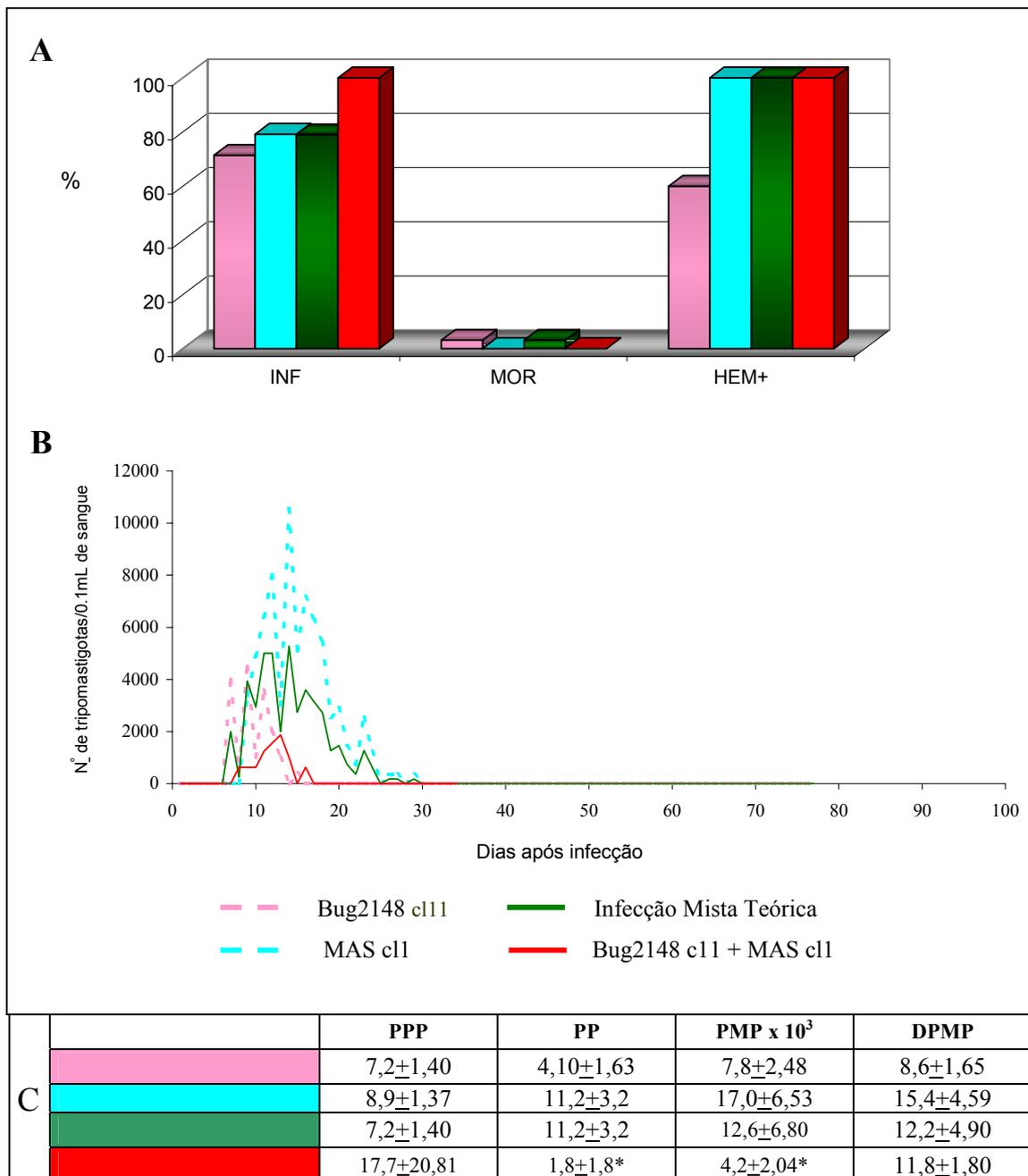


FIGURA 30: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 39 e 32 representados por Bug2148 c11 (+ virulento) e MAS c11 (- virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando aumento da positividade da hemocultura na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito inibidor entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPMP = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média \pm desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PP e PMP.

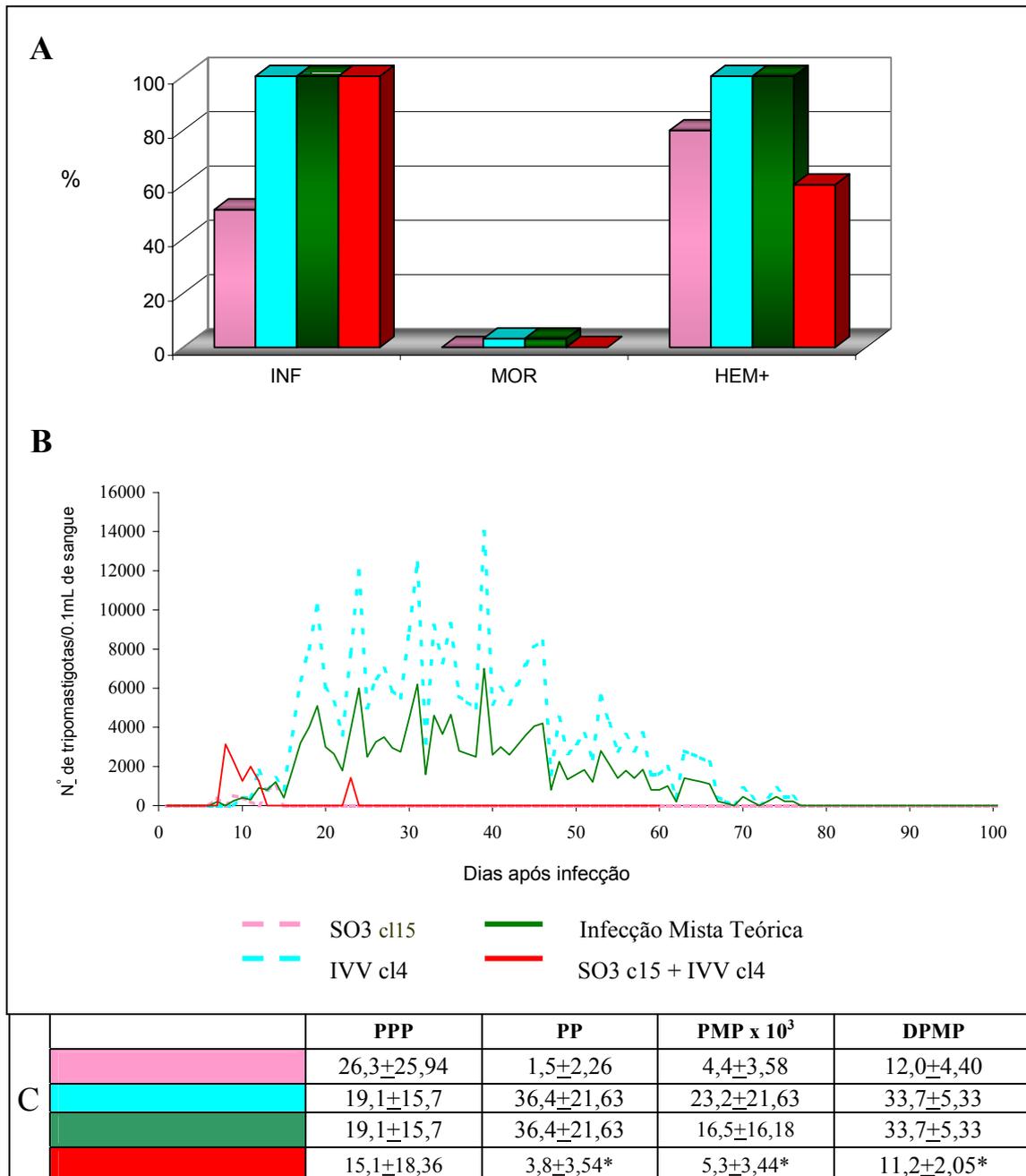


FIGURA 31: Parâmetros avaliados em camundongos BALB/c em infecções monoclonais e suas respectivas infecções mistas, experimental e teórica, por clones dos genótipos 39 e 32 representados por SO3 c15 (- virulento) e IVV c14 (+ virulento).

A - INF = taxa de infectividade, MORT = taxa de mortalidade e HEM+ = taxa de positividade da hemocultura, demonstrando não ter ocorrido diferenças entre os valores esperados e observados na infecção mista.

B - Curvas médias de parasitemia registrando efeito inibidor entre os clones da combinação.

C - PPP = período pré-patente, PP = período patente, PMP = pico máximo de parasitemia e DPMP = dia do pico máximo de parasitemia expressos pela média ± desvio padrão, diferenças significativas (*) entre os valores esperados e observados na infecção mista foram verificadas nos parâmetros PP, PMP e DPMP.

5 DISCUSSÃO

As populações naturais do *T. cruzi* demonstram um elevado grau de polimorfismo genético, revelado por distintos marcadores moleculares que incluem isoenzimas (Miles *et al.*, 1977, Tibayrenc & Ayala, 1988), RAPD (Tibayrenc *et al.*, 1993; Steindel *et al.*, 1993), RFLP do kDNA (Morel *et al.*, 1980), minissatélites (Macedo *et al.*, 1992), SSR-PCR (Oliveira *et al.*, 1997), LSSP-PCR (Vago *et al.*, 1996a), polimorfismo de genes de rRNA e mini-exons (Souto *et al.*, 1996), dentre outros.

Tibayrenc & Ayala (1988) sugeriram que esse polimorfismo é decorrente de um longo tempo de evolução clonal com ocorrências ocasionais de troca genética. A divergência evolucionária acumulada entre os clones envolve genes que governam importantes propriedades do parasito relacionadas à sua virulência, patogenicidade e epidemiologia da doença de Chagas. Conseqüentemente, uma boa correlação entre a variabilidade genética do parasito e suas propriedades biológicas e, portanto, das características clínicas da doença de Chagas seria esperada.

Embora, uma forte correlação entre a genética do parasito e suas propriedades biológicas e susceptibilidade a quimioterápicos esteja bem estabelecida (Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998; Lana *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2002 e Toledo *et al.* 2003; Toledo *et al.*, 2004a,b), essa ainda é fraca e inconclusiva em relação às formas clínicas da doença (Miles, 1981a; Apt *et al.*, 1987; Brenière *et al.*, 1985; Brenière *et al.*, 1989; Montamat *et al.*, 1996; Andrade *et al.*, 1992). Também já foi demonstrado que as populações naturais do *T. cruzi* podem ser constituídas de populações heterogêneas com propriedades biológicas distintas, que poderiam interagir resultando em propriedades novas mais adaptadas às condições no hospedeiro ou em cultura (Finley & Dvorak, 1987; Lauria-Pires *et al.*, 1996b; Lauria-Pires *et al.*, 1997). Trabalhos experimentais em infecções mistas têm confirmado este fenômeno (Pinto *et al.*, 1998; Lana *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2003).

Tais observações sugerem que a ocorrência de infecções mistas na natureza, cuja detecção vem sendo demonstrada nos últimos anos, pode ser um fator importante, influenciando as propriedades do parasito e com conseqüências relevantes para o hospedeiro, bem como na dinâmica de sua transmissão (Pinto *et al.*, 2000; Buscaglia, 2003). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi verificar, em camundongos BALB/c, o impacto de infecções mistas por estoques clonais de *T. cruzi*, pertencentes a grupos

genéticos distintos (filogeneticamente mais relacionados ou não), nas propriedades biológicas do parasito, quando comparadas com as infecções monoclonais correspondentes.

Os resultados obtidos permitem rejeitar a hipótese nula de trabalho de que não há interação entre os clones de uma mistura e demonstram claramente, que em infecções mistas por clones de *T. cruzi* não se pode prever o efeito resultante, baseado no que se conhece das suas respectivas infecções monoclonais.

Diferentes taxas de alteração em relação aos valores esperados foram observadas para os parâmetros avaliados, que variaram de 4,2 a 79,2%. A taxa de infectividade foi sempre igual ou superior ao clone mais infectivo da mistura. Embora diferenças significativas não tenham sido observadas neste parâmetro em relação às infecções monoclonais, todas as infecções mistas apresentaram 100% de positividade no exame de sangue a fresco. Clones do genótipo 32 e 39 quando combinados, foram capazes de infectar todos os animais, ao contrário do observado com estes mesmos clones, nas infecções monoclonais. Isso sugere um efeito estimulatório entre os clones das misturas Bug2148 c11 + MAS c11 e SO3c15 + MAS c11, nas quais o valor esperado de infectividade nas infecções duplas seria de 79,3%.

Em nosso estudo, não foram detectadas diferenças significativas na mortalidade dos animais, quando comparados os valores esperados e observados nas infecções mistas. Isto se deve provavelmente ao fato dos estoques clonais utilizados serem de baixa virulência e ainda não terem sido adaptados em camundongos ou mantidos em passagens sucessivas, que poderiam resultar em aumento de sua virulência (Brener & Chiari, 1963; Brener *et al.*, 1974; Carneiro *et al.*, 1990) refletindo inclusive nas taxas de mortalidade.

Franco *et al.* (2003), infectando ratos com um clone letal combinado a um clone de baixa virulência, observaram 0% de mortalidade nos animais com a dupla infecção, demonstrando haver interação favorável entre os clones da mistura para esse parâmetro. O mesmo foi verificado em relação à combinação do clone P209 c11 (genótipo 20) com clones dos genótipos 32 e 39, exceto Bug2148 c11 (genótipo 39). Diminuição da mortalidade também ocorreu nos animais infectados com clones desses genótipos (20+39 ou 20+32), indicando um aparente efeito redutor da mortalidade pelos genótipos

32 e 39 (menos virulentos) sobre o genótipo 20 (mais virulento). Para duas das três combinações, foi observada concomitante redução na parasitemia.

A associação entre os parâmetros parasitemia e mortalidade tem sido controversa na literatura. Se por um lado, diversos trabalhos registraram uma relação direta entre a taxa de mortalidade e os níveis de parasitemia (Lana *et al.*, 1986; Andrade *et al.*, 1974; Veloso *et al.*, 2000), outros trabalhos indicaram uma correlação fraca entre esses parâmetros (Wrightsmann *et al.*, 1982; Wallace *et al.*, 2001; Paláu *et al.*, 2003) sugerindo ser esta característica intrínseca do parasito mais do que do nível de parasitemia propriamente dita (Bestetti, 1997). Essa correlação também não foi observada nesse presente estudo. A mistura OPS21 cl11 + P209 cl1 foi a única combinação genotípica 19+20, que apresentou diminuição da parasitemia. Curiosamente, esta foi a mistura onde se observou aumento mais evidente da taxa de mortalidade em relação às infecções monoclonais. Neste caso, foi verificado que os animais se mostraram bastante debilitados em todo o curso da infecção, sugerindo que outros fatores estariam envolvidos na dinâmica das infecções mistas.

Em relação à hemocultura, ocorreu redução em sua porcentagem de positividade em sete das 24 infecções mistas experimentais, embora na grande maioria destas a redução não tenha sido significativa. Essa redução, aparentemente, estava correlacionada com os níveis de parasitemia, indicando evidente alteração no comportamento biológico dos clones da mistura. Apenas em uma das misturas (OPS21 cl11 + SO3 cl5), foi verificada uma redução significativa na positividade da hemocultura, que, curiosamente, apresentou efeito inibitório recíproco entre os clones da mistura para a maioria dos parâmetros avaliados. Todos os animais infectados com essa mistura apresentaram exame a fresco positivo após exaustiva pesquisa do parasito, comprovando que a alteração ocorreu em decorrência da interação entre os clones e/ou com seu hospedeiro e não pelo insucesso da infecção.

A parasitemia apresentou o maior número de diferenças significativas (19 em 24 combinações analisadas), provavelmente por refletir os demais parâmetros a ela relacionados (PPP PP, PMP, DPMP). Foram verificadas alterações na maioria das combinações genotípicas estudadas. Efeitos tanto de inibição quanto de estimulação foram observados nas infecções mistas quando comparadas com os valores esperados. Ao contrário do observado em nosso estudo, para a maioria das infecções mistas,

Franco *et al.* (2003) não observaram tais alterações na parasitemia. Estes autores trabalharam apenas com duas populações de *T. cruzi*, uma híbrida (CL Brener) e outra pertencente à linhagem *T. cruzi* II (JG), sendo deste modo não representativas da grande heterogeneidade genética deste parasito.

Combinações genóticas 19+20, constituídas por clones filogeneticamente relacionados, apresentaram em geral, efeito estimulatório entre os mesmos, indicado pelo aumento da parasitemia, que foi superior até mesmo ao clone mais virulento da mistura. Entretanto, as combinações genóticas 32+39, também relacionadas geneticamente entre si, apresentaram efeito inibitório entre os clones da mistura, demonstrado pelo evidente decréscimo da parasitemia.

Clones dos grupos genéticos 19 e 20 (*T. cruzi* I) são mais infectivos e virulentos para camundongos quando comparados com clones dos genótipos 39 (híbridos) e 32 (*T. cruzi* II) (Laurent *et al.*, 1997; Toledo *et al.*, 2002). Nas combinações 19+20, aparentemente ocorre uma exacerbação dos fatores de virulência nas infecções mistas e no segundo caso (39+32) parece ocorrer exatamente o contrário. Toledo *et al.* (2002), estudando o comportamento de clones do *T. cruzi* dos genótipos principais 19, 20, 39 e 32 de Tibayrenc e Brenière (1988), nesse mesmo modelo experimental, demonstraram que clones dos genótipos 39 e 32 são de menor virulência e também mais sensíveis à resposta imunológica, sendo mais bem controlados por essa, podendo ser estes fatores os responsáveis pelas diferenças observadas em relação à parasitemia entre as combinações 19+20 versus 39+32.

Nossos resultados, no geral, sugerem uma importante interação entre as características dos clones componentes das misturas e não somente uma justaposição. Este fato foi previamente observado por Pinto *et al.* (1998) e Pinto *et al.* (2000), que demonstraram interações entre clones de *T. cruzi* pertencentes a diferentes genótipos, em infecções mistas de *T. infestans*. Esses autores evidenciaram estimulação ou inibição recíprocas entre os clones da mistura. Curiosamente, clones pouco infectivos para o vetor e com menor capacidade de completar seu ciclo evolutivo, quando associados aos clones fortes para essas propriedades, foram capazes de permanecer no hospedeiro invertebrado e às vezes estiveram até mais presentes. A relação quantitativa entre os clones da mistura foi estimada indiretamente pela intensidade das bandas eletroforéticas do perfil de isoenzimas e de RAPD (Pinto *et al.*, 1998). Resultados semelhantes foram

obtidos por Lana *et al.* (1998) estudando infecções mistas e monoclonais, com alguns destes estoques clonais, em camundongos BALB/c. Essas observações registrando alterações das propriedades do parasita em infecções mistas, tanto no vetor quanto no hospedeiro vertebrado, evidenciam claramente que sua ocorrência pode influenciar de modo significativo a dinâmica de transmissão do *T. cruzi*.

Interações entre populações de *T. cruzi* com comportamentos distintos (Clone CL Brener e Cepa JG) também foram observadas em ratos experimentalmente infectados (Franco *et al.*, 2003). Os autores verificaram diferentes tropismos teciduais e maior taxa de sobrevivência em infecções mistas, quando comparadas com as infecções puras.

Estes trabalhos juntamente com os dados aqui obtidos, indicam que a interação entre clones em infecções mistas pode resultar em alterações significativas das propriedades biológicas do parasito. Os fatores determinantes desse processo ainda precisam ser elucidados e, provavelmente, mecanismos importantes relacionados à modulação da resposta imunológica, competição entre os clones da mistura e alteração da expressão gênica, tanto do hospedeiro quanto do parasito, podem estar envolvidos.

A capacidade de adaptar-se a novos ambientes e hospedeiros tem sido descrita para muitas espécies. Em condições de *stress* ou pressões seletivas, cromossomos e minicírculos têm apresentado evidências de plasticidade em *T. cruzi* e *Leishmania* (McDaniel & Dvorak, 1993). Variações no cariótipo de populações clonadas de *T. cruzi* foram observadas por Wagner & So (1990) após cultivo foram associadas com aumento na infectividade do variante em cultura celular. Alves *et al.* (1996) também verificaram mudança no perfil de restrição de DNA e PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) com concomitante perda de infectividade, quando clones de *T. cruzi* foram mantidos em crescimento exponencial ou após subclonagem. Pacheco *et al.* (1995) e Pacheco & Brito (1999), verificaram evidência de polimorfismo na seqüência de minicírculos em clones, em modelo animal, controlando as fontes exógenas de variabilidade, como reinfeção ou acúmulo de múltiplas infecções, por clonagem e subclonagem do inóculo inicial. Em alguns casos, esta mudança reverteu ao padrão original e poderia estar associada à alteração da virulência do parasito. O mesmo foi observado por Alves *et al.* (1993) em relação ao padrão de isoenzimas e infectividade de clones de *T. cruzi* após subcultura e inoculação dos mesmos em camundongos.

Mecanismos de trans-splicing e edição do RNA mitocondrial, já descritos para *T. cruzi*, poderiam resultar, pelo menos teoricamente, na formação de novas proteínas, inclusive de superfície, que poderiam estar relacionadas com a interação e penetração do parasito com a célula hospedeira levando a alteração de sua virulência.

Diferentes padrões de expressões gênicas em cepas de *T. cruzi* estão sendo descritos, sugerindo diferentes capacidades de adaptação do parasito ao ambiente, no caso hospedeiro vertebrado. Isso implica que diferentes expressões genótípicas poderiam resultar em propriedades específicas para diferentes populações (Cortez *et al.*, 2003; Dost *et al.*, 2004). As ecto-ATPases Mg^{2+} -dependentes estão presentes na superfície do *T. cruzi* e, aparentemente, estão relacionadas à virulência desse patógeno, podendo estimular a adesão a células hospedeiras. Diferentes níveis de expressão e isoformas dessa enzima têm sido descritos para distintas populações de parasitos (Silverman *et al.*, 1998; Barros *et al.*, 2000) e em diferentes células de uma mesma população de *T. cruzi* (Bisaggio *et al.*, 2003), que podem refletir diferenças na infectividade. Dost *et al.* (2004) estudaram os níveis de transcritos de mRNA em diferentes cepas de *T. cruzi*, quantificados por RT-PCR, para seis genes possivelmente relacionados a alterações patológicas durante a infecção. Diferentes padrões de expressão foram revelados em todas as cepas para cada um dos genes analisados. Além disso, diferentes populações de *T. cruzi* modulam a expressão gênica da célula hospedeira de modo específico, resultando na produção de diversos componentes, que irão determinar o sucesso da interação com a célula hospedeira e o curso da infecção (Burleigh & Woolsey, 2002).

É provável que a complexa interação resultante da modulação da expressão gênica da célula hospedeira, induzida pelo *T. cruzi*, e as estratégias de evasão da resposta imune influencie o curso de infecção e seja determinante na sobrevivência do patógeno. Na superfície dos tripomastigotas são expressas glicoproteínas abundantes e heterogêneas, com afinidades para diferentes proteínas da matriz extracelular, relacionadas à adesão e internalização em células hospedeiras (Yoshida *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 1998; Santori *et al.*, 1996; Schenckman, 1993; Zingales *et al.*, 1985). Provavelmente, múltiplos caminhos de sinalização são integrados para coordenar a invasão, suportar a replicação intracelular e influenciar o tropismo tecidual do parasito (Burleigh & Woolsey, 2002).

Durante a invasão da célula, o *T. cruzi* expõem moléculas funcionais que se tornam alvos da reposta imune e podem contribuir para sua eliminação. (Palau *et al.*, 2003). Entre essas moléculas estão vários membros da família de proteínas SAPA, trans-sialidases, neuramidases, glicoproteínas mucinas-Like cuja expressão difere entre as diversas populações de *T. cruzi* e forma evolutiva do parasito (Sheneckman *et al.* 1991; Frasc, 1994; Ruiz *et al.*, 1998; Frasc, 2000). Anticorpos reconhecendo essas proteínas e neutralizando a atividade de trans-sialidases foram encontradas no soro de humanos e animais infectados pelo *T. cruzi* (Pollevick *et al.*, 2000; Leguizamón *et al.*, 1994a, b).

Considerando o importante papel do sistema imune no controle da parasitemia (Brenner e Gazzinelli, 1997) e que diferentes cepas do *T. cruzi* apresentam graus distintos de susceptibilidade a anticorpos (Krettli *et al.*, 1982), ou mesmo induzem resposta imune diversas (Tarleton 1990; Tarleton *et al.*, 1992), possivelmente este tem participação importante nas alterações observadas nas infecções mistas experimentais. Desse modo, a resposta imune estimulada por um clone do parasito em infecções mistas, poderia influenciar a relação do outro clone com a célula hospedeira.

Nesse sentido, em infecções mistas pelo *T. cruzi*, intrincados mecanismos podem estar relacionados, incluindo reações cruzadas entre anticorpos e integração de caminhos de vias de sinalização que resultam em diferenças nas expressões gênicas, ativados por distintos clones do parasito presentes na mistura. Isso poderia parcialmente, explicar as alterações das propriedades biológicas do *T. cruzi* em infecções mistas observadas nesse estudo.

Quando todos os parâmetros relacionados à parasitemia foram agrupados (PPP, PP, PMP, DPMP, PAR), verificou-se 11, 14, 11, 11, 6 e 15 diferenças significativas nas combinações genóticas 19+20, 19+39, 19+32, 20+39, 20+32 e 39+32, respectivamente. Embora, não se possa estabelecer uma correlação clara entre o tipo de efeito observado (estimulação/inibição) entre as misturas, constata-se que as combinações genóticas 20+32, constituídas de clones filogeneticamente mais distantes e com graus de virulência mais distintos, foram justamente as que apresentaram o menor número de diferenças significativas. Diferenças significativas para a parasitemia, um dos mais importantes parâmetros de virulência, não foram encontradas somente em cinco das 24 infecções mistas estudadas, consistindo exatamente em combinações

filogeneticamente mais distantes 19+32, 20+32 e 20+39, o que sugere menor interferência de um clone sobre o outro nestes casos.

Diversos autores têm demonstrando a relevância da variabilidade genética do *T. cruzi* em suas propriedades biológicas fundamentais. Correlação entre o padrão de isoenzimas de cepas do *T. cruzi* e o comportamento biológico foi verificado por Carneiro *et al.*, 1991; Dvorak, 1980; Andrade *et al.*, 1992; Andrade *et al.*, 1997, bem como a sensibilidade a drogas.

O *T. cruzi* apresenta estrutura e evolução clonal e como tal pode ser considerado como subdivisões genéticas estáveis (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc & Ayala, 1988). Essa estrutura clonal pressupõe uma correlação entre genética e as diferentes propriedades do parasito. Diversos trabalhos empregando os mesmos estoques clonais de *T. cruzi* utilizados nesse estudo, corroboram esta hipótese e demonstram uma forte ligação entre a distância genética e as propriedades biológicas em cultura acelular e celular (Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998) comportamento e patogenicidade em camundongos e vetores (Laurent *et al.*, 1997; Lana *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2002) e susceptibilidade a drogas *in vitro* (Revollo *et al.*, 1998) e *in vivo* (Toledo *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2004a,b)

Considerando que nas infecções mistas os clones podem apresentar relações simbióticas ou também de competição e que clones geneticamente mais próximos apresentam propriedades biológicas mais semelhantes, seria esperado, como observado nesse trabalho, que clones filogeneticamente mais distantes e, portanto, de propriedades mais distintas, apresentassem menor grau de competição entre si, corroborando a hipótese de trabalho de que a divergência filogenética do *T. cruzi* exerce impacto sobre as propriedades biológicas do parasito em infecções mistas no hospedeiro vertebrado, como verificado em relação às infecções monoclonais (Toledo *et al.*, 2002).

Atualmente, o desenvolvimento de métodos moleculares mais sensíveis que permitem caracterizar diretamente as populações de *T. cruzi* presentes no sangue e demais tecidos dos vertebrados ou fezes de triatomíneos, tem comprovado a relevância das infecções mistas na epidemiologia da doença (Bosseno *et al.*, 2000; Vago *et al.*, 2000; Solari *et al.*, 2001). Indivíduos vivendo em área endêmica são provavelmente submetidos a várias reinfecções, que aumentam o número de infecções mistas

detectáveis no curso da doença (Brenière *et al.*, 1998). Entretanto, o impacto dessas infecções mistas ainda precisa para ser elucidado.

Esse trabalho representa um importante avanço para o entendimento das infecções mistas e demonstra nitidamente, que a interação entre os clones da mistura pode resultar em alteração das propriedades biológicas do parasito e conseqüentemente, do curso da infecção.

As cepas de *T. cruzi* não são necessariamente populações homogêneas e diferentes clones podem apresentar, como revelado por diferentes estudos, diferenças na sua composição antigênica (Brenière *et al.*, 1991), virulência (Postan *et al.*, 1983; Lauria-Pires *et al.*, 1997), padrões de isoenzimas (Golderberg & Pereira, 1983; Montamat *et al.*, 1996; Lauria-Pires *et al.*, 1996a) e constituição gênica (Lauria-Pires *et al.*, 1996a; Morel *et al.*, 1980; Deane *et al.*, 1984; Carneiro *et al.* 1990; Oliveira *et al.*, 1998). Andrade & Magalhães (1997) definiram cepas como populações estáveis que representam o equilíbrio entre múltiplos clones com predominância de um comportamento biológico. Entretanto, em decorrência da alteração das pressões do meio ou hospedeiro, uma população particular do parasito pode mudar seu comportamento com o tempo, levando a alterações no comportamento da cepa como um todo (Carneiro *et al.*, 1990; Alves *et al.*, 1993; Veloso *et al.*, 2001). Lauria-Pires *et al.* (1997) demonstraram que o padrão de comportamento de um estoque parental, em relação à cinética de crescimento e diferenciação em meio acelular, não é necessariamente o mesmo observado para as linhagens subclonais subseqüentes. Esses dados sugerem que o comportamento de uma infecção mista é determinado pela interação dos clones presentes na mistura e seu ambiente, corroborando os resultados encontrados nesse estudo.

Embora grandes avanços tenham sido alcançados em relação ao entendimento dos fatores determinantes da forma clínica da doença de Chagas e no sucesso de seu tratamento, esses ainda permanecem insatisfatórios e inconclusivos. As conseqüências da variabilidade genética, nestes aspectos, podem ser difíceis de serem avaliadas em decorrência das infecções mistas, encontradas tanto no ciclo silvestre como doméstico da doença, ignoradas antes do emprego dos marcadores moleculares hoje disponíveis.

A caracterização de sub-populacionais de *T. cruzi* isoladas de pacientes, reservatórios e vetores em áreas endêmicas poderá revelar diferentes padrões de

combinações genéticas na mistura original, permitindo assim encontrar melhores correlações com a epidemiologia da doença, tais como capacidade de desenvolver no vetor ou vertebrado e serem transmitidas entre estes; evolução da infecção e manifestações clínicas da doença e susceptibilidade a quimioterápicos. Os resultados aqui encontrados ressaltam ainda mais a importância de se considerar as infecções mistas, tão frequentes na natureza, tanto em animais reservatórios e vetores, (Tibayrenc *et al.*, 1985; Bosseno *et al.*, 1996; Solari *et al.*, 1998; Bosseno *et al.*, 2000) bem como no homem (Brenière *et al.*, 1985; Lauria-Pires *et al.*, 1996a; Solari *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2003) e suas diversas conseqüências para o hospedeiro.

6 *CONCLUSÕES*

- As propriedades biológicas de clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais em infecções mistas foram diferentes daquelas teoricamente esperadas, para a maioria das infecções estudadas em relação às respectivas infecções monoclonais.
- Os dados obtidos sugerem a ocorrência de interações entre os genótipos envolvidos na mistura e não somente uma justaposição. Essa interação resulta em fenômenos de estimulação ou inibição entre os clones da mistura, comprovados pela alteração significativa dos parâmetros avaliados em relação aos esperados para as infecções mistas.
- A natureza dos efeitos de estimulação ou inibição observados não apresenta uma correlação direta com divergência filogenética do parasito. Efeitos estimulatórios e inibitórios da parasitemia foram observados em todas as combinações genótípicas estudadas, independentes da distância genética dos clones da mistura, exceto para a combinação 39+32 em que foram observados somente efeitos inibitórios.
- A divergência filogenética dos clones presentes em infecções mistas parece desempenhar um forte impacto sobre as propriedades do parasito, quando consideradas em conjunto. Combinações de clones geneticamente mais distantes apresentaram menor grau de alterações nas propriedades biológicas em infecções duplas, quando comparadas como o resultado esperado e tomando como base as respectivas infecções monoclonais. Efeitos semelhantes ao esperado foram encontrados somente em combinações de clones geneticamente mais distantes.
- Os dados sugerem a necessidade de se considerar o impacto das infecções mistas por clones de *T. cruzi* com características genéticas distintas sobre o hospedeiro, tanto na evolução da doença, quanto na sua epidemiologia e na resposta a terapêutica.

7 *PERSPECTIVAS*

7.1 Identificação dos clones isolados de infecções mistas não tratadas por hemocultura

Os parasitos recuperados através da hemocultura, foram mantidos em crescimento exponencial em meio LIT e o sedimento lavado em solução salina tamponada, congelado a -70°C para posterior análise pelo perfil de isoenzimas, RAPD e microssatélites. A caracterização dos clones encontradas no animal permitirá avaliar a dinâmica de interação entre os clones da mistura e interpretar os fenômenos de inibição e estimulação observados nas infecções mistas.

O emprego de diferentes metodologias para a identificação dos clones permitirá verificar o grau de correlação entre os marcadores moleculares utilizados neste estudo.

7.2 Identificação dos clones isolados de infecções mistas não tratadas em eluato de sangue

Amostras de sangue de cada animal, retirado pelo plexo venoso retro-orbital, foram coletados aos 60 dias após inoculação em Guanidina-HCl/EDTA 6 M e conservados a temperatura ambiente. Essas amostras serão submetidas à extração de DNA e aquelas positivas na PCR (fragmento de 330 pb de minicírculos do kDNA do parasito) serão analisados por microssatélites, polimorfismo dos genes de rRNA e subunidade II da Citocromo oxidase (CoII).

Esta caracterização possibilitará comparar os resultados obtidos diretamente do sangue com o encontrado após isolamento e cultivo do parasito em meio LIT, permitindo assim verificar se o manuseio do parasito em cultura altera a composição original da população.

7.3 Identificação dos clones presentes nos tecidos do hospedeiro

Dois animais de cada uma das 24 infecções mistas estudadas foram necropsiados entre 30-35 dias após inoculação (d.a.i) e outros dois animais entre 120-125 (d.a.i). Todos tecidos foram coletados, processados e armazenados a -70°C . Esse material abre

perspectivas para o estudo do tropismo tecidual em infecções mistas, utilizando um grande número de amostras e combinações representativas da diversidade genética do parasito.

7.4 Tratamento de infecções mistas

Considerando a importância de infecções mistas em humanos (Solari *et al.*, 2001) e a complexidade e dificuldade oferecidas à terapêutica, o estudo do tratamento e de infecções mistas experimentais, constituídas de populações caracterizadas geneticamente e que representem a divergência filogenética do parasito, poderá constituir em uma importante ferramenta para o melhor entendimento à resposta ao tratamento.

8 *REFERÊNCIAS*
BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES A.B.M., TANURI A., ALMEIDA D.F. & VON KRUGER W.M.A. (1993). Reversible changes in the isoenzyme electrophoretic mobility pattern and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* **77**, 246-253.
- ALVES A.B.M., ALMEIDA D.F. & VON KRUGER W.M.A. (1996). Genoma variation in *Trypanosoma cruzi* clonal cultures. *Parasitol. Res.* **82**, 410-415.
- AMARAL C.F.S., TAFURI W.L. & BRENER Z. (1975). Frequência do parasitismo encefálico em camundongos experimentalmente infectados com diferentes cepas de *Trypanosoma (Shizotrypanum) cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **9**, 243-246.
- ANDRADE S.G. & ANDRADE Z.A. (1966). Estudo histopatológico comparativo das lesões produzidas por duas cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Hospital* **70**, 1268-1278.
- ANDRADE S.G. (1974). Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev. Pat. Trop.* **1**, 65-121.
- ANDRADE V., BRODSKYN C. & ANDRADE S.G. (1983). Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**, 796-799.
- ANDRADE S.G. (1985). Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **18**, 39-46.
- ANDRADE S.G., MAGALHAES J.B. & PONTES A.L. (1985). Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull. World Health Organ.* **63**, 721-726.
- ANDRADE S.G., RASSI A., MAGALHAES J.B., FERRIOLLI F.F. & LUQUETTI A.O. (1992). Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**, 624-626.
- ANDRADE S.G. & MAGALHAES J.B. (1997). Biodemes and zimodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **30** (1), 27-35.
- ANONYMOUS. (1999). Recommendations from a Satellite Meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94** (suppl. 1), 429-432.
- APT W., AGUILERA X., ARRIBADA A., GOMES M.L., MILES M.A. & WIDMER G. (1987). 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.* **37**, 307-302.

- APT W., AGUILERA X., ARRIBADA A., PEREZ C., MIRANDA C., SANCHEZ G., ZULANTAY I., CORTES P., RODRIGUEZ J. & JURI D. (1998). Treatment of chronic Chagas disease with itraconazole and allopurinol. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**, 133-138.
- APT W., ARRIBADA A., ZULANTAY I., SANCHEZ G., VARGAS S.L. & RODRIGUEZ J. (2003). Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **97**, 23-29.
- BARNABE C., BRISSE S. & TIBAYRENC M. (2000). Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitol.* **120 (Pt 5)**, 513-526.
- BARRETT T.V., HOFF R.H., MILES M.A., GODFREY D.G., TEIXEIRA R., ALMEIDA DE SOUZA J.A. & SHERLOCK I.A. (1980). Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.* **74**, 84-90.
- BARRETTO M.P. (1979). Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Z. Brener & Z. A. Andrade (Orgs.). Rio de Janeiro, Guanabara koogan Ed.
- BASTRENTA B., BOSSENO M.F., BARNABE C., TIBAYRENC M. & BRENIERE S.F. (1999). Restriction fragment length polymorphism of 195 bp repeated satellite DNA of *Trypanosoma cruzi* supports the existence of two phylogenetic groups. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**, 323-328.
- BESTETTI R.B. (1997). Shoul benznidazole be used in chronic Chagas Disease? (letter comment). *Lancet.* **349**, 653.
- BICE D.E. & ZELEDON R. (1970). Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J. Parasitol.* **56**, 663-670.
- BITTENCOURT A.L. (2000). Transmissão da doença de Chagas. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Z. Brener, Andrade Z.A. (Orgs.). Rio de Janeiro, Guanabara koogan Ed.,16-20.
- BOSSENO M.F., TELLERIA J., VARGAS F., YAKSIC N., NOIREAU F., MORIN A. & BRENIERE S.F. (1996). *Trypanosoma cruzi*: study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian Triatoma infestans vectors shows a high frequency of mixed infections. *Exp. Parasitol.* **83**, 275-282.
- BOSSENO M.F., YACSIK N., VARGAS F. & BRENIERE S.F. (2000) Selection of *T. cruzi* clonal genotypes (clonet 20 and 39) isolated from Bolivian triatomines following subculture in liquid medium. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **95**, 601-607.
- BRENER Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **4**, 389-396.

- BRENER Z. (1965). Comparative studies of different strains of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **59**, 19-26.
- BRENER Z. (1969). The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **63**, 215-220.
- BRENER Z. (1977). Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations present with distinct characteristics. *PAHO, Scientific Publication* **347**, 11-21.
- BRENER, Z. (1992). Immune response and immunopathology in *Trypanosoma cruzi* infection. In: Chagas disease: its impact on transfusion and clinical medicine. Wendel S., Brener Z., Camargo M. & Rassi A. São Paulo, ISTB Brazil – SBHH, 31-48.
- BRENER Z. & CHIARI E. (1963). Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **19**, 220-224.
- BRENER Z., CHIARI E. & ALVARENGA N.J. (1974). Observations on *Trypanosoma cruzi* strains maintained over an 8-year period in experimentally inoculated mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **16**, 39-46.
- BRENER Z., COSTA C.A. & CHIARI C. (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **18**, 450-455.
- BRENER Z. & GAZZINELLI R.T. (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **114**, 103-110.
- BRENIERE S.F., TIBAYRENC M., ANTEZANA G., PABON J., CARRASCO R., SELAES H. & DESJEUX P. (1985). Preliminary results suggesting a tenuous or nonexistent relation between clinical forms of Chagas disease and isoenzyme strains of *T. cruzi*. *C.R. Acad.Sci. III* **300**, 555-557.
- BRENIERE S.F., CARRASCO R., REVOLLO S., APARACIO G., DESJEUX P. & TIBAYRENC M. (1989). Chagas disease in Bolivia: clinical and epidemiological features and zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. *Am J Trop Med Hyg* **41**, 529.
- BRENIERE S.F., ARANIKI I., LE RAY D. & TIBAYRENC M. (1991). SDS-PAGE analysis of surface proteins and antigens evidences high heterogeneity in natural clones of *T. cruzi*, correlated with isoenzyme variability. *C. R. Acad. Sci. III* **312**, 449-454.

- BRENIERE S.F., BOSSENO M.F., TELLERIA J., BASTRENTA B., YACSIK N., NOIREAU F., ALCAZAR J.L., BARNABE C., WINCKER P. & TIBAYRENC M. (1998). Different behavior of two *T. cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. *Exp. Parasitol.* **89**, 285-295.
- BRENIERE S.F., BARNABE C., BOSSENO M.F. & TIBAYRENC M. (2003). Impact of number of isoenzyme loci on the robustness of intraspecific phylogenies using multilocus enzyme electrophoresis: consequences for typing of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.* **127**, 273-281.
- BRISSE S., BARNABE C. & TIBAYRENC M. (2000a). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.* **30**, 35-44.
- BRISSE S., DUJARDIN J.C. & TIBAYRENC M. (2000b). Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* **111**, 95-105.
- BRISSE S., VERHOEF J. & TIBAYRENC M. (2001). Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *T. cruzi* lineages. *Int. J. Parasitol.* **31**, 1218-1226.
- BURLEIGH B.A. & WOOLSEY A.M. (2002). Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol.* **4**, 701-711.
- BUSCAGLIA C.A. & DI NOIA J.M. (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. *Microbes. Infect.* **5**, 419-427.
- CAMARGO E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **12**, 93-100.
- CARNEIRO M., CHIARI E., GONCALVES A.M., SILVA PEREIRA A.A., MOREL C.M. & ROMANHA A.J. (1990). Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop* **47**, 35-45.
- CARNEIRO M., ROMANHA A.J. & CHIARI E. (1991). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **86**, 387-393.
- CASTRO C., CRAIG S.P. & CASTANEDA M. (1981). Genome organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **4**, 273-282.
- CLARK C.G. & PUNG O.J. (1994). Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**, 175-179.

- CONARES, W. J. (1980). Practical non parametric statistics. Jonh Wilwu & Sons. New York, 2^a ed., Chapter 6.
- CORTEZ M., NEIRA I., FERREIRA D., LUQUETTI A.O., RASSI A., ATAYDE V.D. & YOSHIDA N. (2003). Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. *Infect. Immun.* **71**, 6184-6191.
- COURA J.R., ANUNZIATO N. & WILLCOX H.P. (1983). Chagas disease morbidity. I. Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **78**, 363-372.
- COURA J.R., JUNQUEIRA A.C., FERNANDES O., VALENTE S.A. & MILES M.A. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* **18**, 171-176.
- DEANE M.P., LENZI H.L. & JANSEN A. (1984). *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **79**, 513-515.
- DIAS J.C.P. (1984). Acute Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **79**, 17-26.
- DIAS J.C.P. (1992). Epidemiology of Chagas disease. In: Chagas disease (american trypanosomiasis): Its impact on Transfusion and Clinical Medicine. *ISBT, Brazil - SBHH*, 49-80.
- DIAS, J. C. P. (1993). Situación actual de la enfermedad de Chagas em las Américas. In: Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. R.J. Madoery, & M.L. Cámara (Orgs.). Buenos Aires, Congresso Nacional de Medicina.
- DIAS J.C.P. (2000a). Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad. Saude Publica* **16 Suppl 2**, 43-59.
- DIAS J.C.P. (2000b). Doença de Chagas no século XXI. In: Simpósio Virtual de Enfermidade de Chagas, Buenos Aires. Disponível em: <<http://www.foc.org.ar/foc/chagas/c12pinto/htm>>. Acesso em: 15 nov. 2004.
- DIAS J.C.P., SILVEIRA A.C. & SCHOFIELD C.J. (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**, 603-612.
- DICKIN S.K. & GIBSON W.C. (1989). Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**, 135-142.
- DIEGO J.A., PALAU M.T., GAMALLO C. & PENIN P. (1998). Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. *Trop. Med. Int. Health* **3**, 222-233.

- DOST C.K., SARAIVA J., MONESI N., ZENTGRAF U., ENGELS W. & ALBUQUERQUE S. (2004). Six *Trypanosoma cruzi* strains characterized by specific gene expression patterns. *Parasitol. Res.* **94**, 134-140.
- DVORAK J.A. & HARTMAM D.L. (1980). *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *J. Protozool.* **27**, 472-474.
- FERNANDES O., JANSEM A.M.COLS & COLS (1999a). The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by nontranscribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitol.* **118**, 161-166.
- FERNANDES O., SANTOS S., JUNQUEIRA A., JANSEN A., CUPOLILLO E., CAMPBELL D., ZINGALES B. & COURA J.R. (1999b). Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 195-197.
- FERNANDES O., SOUTO R.P., CASTRO J.A., PEREIRA J.B., FERNANDES N.C., JUNQUEIRA A.C., NAIFF R.D., BARRETT T.V., DEGRAVE W., ZINGALES B., CAMPBELL D.A. & COURA J.R. (1998a). Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**, 807-811.
- FERNANDES O., STURM N.R., DERRE R. & CAMPBELL D.A. (1998b). The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **95**, 129-133.
- FILARDI L.S. & BRENER Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg.* **81**, 755-759.
- FINLEY R.W. & DVORAK J.A. (1987) *Trypanosoma cruzi*: analysis of the population dynamics of heterogeneous mixtures. *J. Protozool.* **34**, 409-415.
- FORRANTTINI O.P. (1980). Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev. Saúde Pública* **14**, 265-299.
- FRANCO D.J., VAGO A.R., CHIARI E., MEIRA F.C., GALVAO L.M. & MACHADO C.R. (2003). *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp. Parasitol.* **104**, 54-61.
- FRASCH A.C. (1994). Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. *Parasitol.* **108**, S37-S44.
- FRASCH A.C. (2000). Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today* **16**, 282-286.
- GARCIA E. & AZANBUJA P. (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol. Today* **7**, 240-244.

- GARCIA E.S. & DVORAK J.A. (1982). Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**, 259-262.
- GARZÓN E.A., BARNABE C., CORDOVA X., BOWEN C., PAREDES W., GOMEZ E., OUAISSI A., TIBAYRENC M. & GUEVARA A.G. (2002). *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **96**, 378-382.
- GIBSON W.C. & MILES M.A. (1986). The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* **5**, 1299-1305.
- GOMES M.L., MACEDO A.M., PENA S.D. & CHIARI E. (1998) Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. *Acta Trop.* **69**, 99-109.
- HENRIKSSON J., DUJARDIN J.C., BARNABE C., BRISSE S., TIMPERMAN G., VENEGAS J., PETTERSSON U., TIBAYRENC M. & SOLARI A. (2002). Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitol.* **124**, 277-286.
- HENRIKSSON J., PETTERSSON U. & SOLARI A. (1993). *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. *Exp. Parasitol.* **77**, 334-348.
- JANSEN A.M., SANTOS DE PINHO A.P., LISBOA C.V., CUPOLILLO E., MANGIA R.H. & FERNANDES O. (1999). The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 203-204.
- KAWASHITA S.Y., SANSON G.F., FERNANDES O., ZINGALES B. & BRIONES M.R. (2001). Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 2250-2259.
- KRETTELI A.U. & BRENER Z. (1982). Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* **129**, 2009-20012.
- LAMBRECHT F.L. (1965). Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **7**, 346-352.
- LANA M. & CHIARI C.A. (1986). Comparative biological characterization of Berenice and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from the same patient at different times. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **81**, 247-253.
- LANA M., DA SILVEIRA P.A., BARNABE C., QUESNEY V., NOEL S. & TIBAYRENC M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.* **90**, 20-25.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LANA M., DA SILVEIRA P.A., BASTRENTA B., BARNABE C., NOEL S. & TIBAYRENC M. (2000). *Trypanosoma cruzi*: infectivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice. *Exp. Parasitol.* **96**, 61-66.
- LANAR D.E., LEVY L.S. & MANNING J.E. (1981). Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **3**, 327-341.
- LAURENT J.P., BARNABE C., QUESNEY V., NOEL S. & TIBAYRENC M. (1997). Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.* **114** (Pt 3), 213-218.
- LAURIA-PIRES L., BOGLIOLO A.R. & TEIXEIRA A.R. (1996a). Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients. II. Isozyme and RFLP characterizations. *Exp. Parasitol.* **82**, 182-190.
- LAURIA-PIRES L. & TEIXEIRA A.R. (1996b). Virulence and pathogenicity associated with diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**, 304-310.
- LAURIA-PIRES L., SANTANA J.M., TAVARES F.S. & TEIXEIRA A.R. (1997). Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients: I--Behavioral characterization in vitro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **30**, 187-192.
- LEGUIZÁMON M.S., CAMPETELLA O.E., GONZÁLEZ CAPPAS M. & FRASCH A.C. (1994a). Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infections. *J. Infect. Dis.* **170**, 1570-1574.
- LEGUIZÁMON M.S., CAMPETELLA O.E., GONZALEZ CAPPAS M. & FRASCH A.C. (1994b). Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity. *Infect. Immun.* **62**, 3441-3446.
- LENZI H.L., CASTELO-BRANCO M.T., PELAJO-MACHADO M., OLIVEIRA D.N. & GATTASS C.R. (1998). *Trypanosoma cruzi*: compromise of reproductive system in acute murine infection. *Acta Trop.* **71**, 117-129.
- LISBOA C.V., DIETZ J., BAKER A.J., RUSSEL N.N. & JANSEN A.M. (2000). *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at the Reserva Biológica de Poco das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **95**, 445-452.
- LUQUETTI A.O., MILES M.A., RASSI A., DE REZENDE J.M., DE SOUZA A.A., POVOA M.M. & RODRIGUES I. (1986). *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas disease in central Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**, 462-470.

- LUCA D'ORO G.M., GARDENAL C.N., PERRRET B., CRISSI J.V. & MONTAMAT E.E. (1993). Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations from Argentina estimated from enzyme polymorphism. *Parasitol.* **107**, 405-410.
- MACEDO A.M., MARTINS M.S., CHIARI E. & PENA S.D. (1992). DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol.* **55**, 147-153.
- MACEDO A.M. & PENA S.D.J. (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today* **14**, 119-123.
- MACEDO A.M., PIMENTA J.R., AGUIAR R.S., MELO A.I., CHIARI E., ZINGALES B., PENA S.D. & OLIVEIRA R.P. (2001). Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**, 407-413.
- MACEDO, V. O. (1997). Forma indeterminada da doença de Chagas. In: Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Dias J.C. & Coura J.R. (Orgs.). Rio de Janeiro, FIOCRUZ Ed., 135-152.
- MACHADO C.A. & AYALA F.J. (2001). Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 7396-7401.
- MARQUES-ARAÚJO S. & CHIARI E. (1988). Caracterização Biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **83**, 175-181.
- MCDANIEL J.P. & DVORAK J.A. (1993). Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**, 213-222.
- MELO R.C. & BRENER Z. (1978). Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.* **64**, 475-482.
- MENDONÇA M.B.A., NEHME N.S., SANTOS S.S., CUPOLILLO E., VARGAS N., JUNQUEIRA A., NAIFF R.D., BARRET T.V., COURA J.R., ZINGALES B. & FERNADES O. (2002). Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zimodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitol.* **124**, 177-184.
- MILES M.A., TOYE P.J., OSWALD S.C. & GODFREY D.G. (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg.* **71**, 217-225.
- MILES M.A., SOUZA A., POVOA M., SHAW J.J., LAINSON R. & TOYE P.J. (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* **272**, 819-821.

- MILES M.A. (1979). Transmission cycles and heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*. In: Biology of the Kinetoplastida, Vol.2, Lumsden W.H.R. & Evans D.A.(Orgs.), 117-116.
- MILES M.A., LANHAM S.M., DE SOUZA A.A. & POVOA M. (1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**, 221-237.
- MILES M.A., CEDILLOS R.A., POVOA M.M., DE SOUZA A.A., PRATA A. & MACEDO V. (1981a). Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? *Lancet* **1**, 1338-1340.
- MILES M.A., DE SOUZA A.A. & POVOA M. (1981b). Chagas disease in the Amazon basin III. Ecotopes of ten triatomine Bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belem, Para State, Brazil. *J. Med. Entomol.* **18**, 266-278.
- MILES M.A., POVOA M.M., DE SOUZA A.A., LAINSON R., SHAW J. J. & KETTERIDGE D.S. (1981c). Chagas disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para State, north Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**, 667-674.
- MILES M. A., APT B.W.; WIDMER G., POVOA M.M., SCHOFIELD C.J. (1984). Isoenzyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78** (4), 526-35.
- MONCAYO A. (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98**, 577-591.
- MONTAMAT E.E., LUCA D'ORO G.M., PERRET B. & RIVAS C. (1992). Characterization of *Trypanosoma cruzi* from Argentina by eletrophoretic zmogramas. *Acta Trop.* **50**, 125-133.
- MONTAMAT E.E., LUCA D'ORO G.M., GALLERANO R.H., SOSA R. & BLANCO A. (1996). Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: correlation with clinical picture. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**, 625-628.
- MOREL C., CHIARI E., CAMARGO E.P., MATTEI D.M., ROMANHA A.J. & SIMPSON L. (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **77**, 6810-6814.
- MURTA S.M., GAZZINELLI R.T., BRENER Z. & ROMANHA A.J. (1998). Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benzimidazole and nifurtimox. *Mol. Biochem. Parasitol.* **93**, 203-214.

- MURTHY V.K., DIBBERN K.M. & CAMPBELL D.A. (1992). PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Mol. Cell Probes* **6**, 237-243.
- NEIRA I., FERREIRA A.T. & YOSHIDA N. (2002). Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. *Int. J. Parasitol.* **32**, 405-414.
- NUSSEINZWEIG, V AND GOBLE, F. (1966). Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. *Exp. Parasitol.* **18**, 224-230.
- OLE-MOIYOI, O. K. (1987). Trypanosome species-specific DNA probes to detect infection in Tsetse flies. *Parasitol. Today* **3**, 371-374.
- OLIVEIRA R.P., MACEDO A.M., CHIARI E. & PENA S.D. (1997). An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. *Parasitol. Today* **13**, 196-200.
- OLIVEIRA R.P., BROUDE N.E., MACEDO A.M., CANTOR C.R., SMITH C.L. & PENA S.D. (1998). Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 3776-3780.
- PACHECO R. S., MARTINEZ E., VALDERRAMA L., MOMEN H. & SARAVIA N.G. (1995). Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **69** (2), 197-209.
- PACHECO R.S. & BRITO C.M. (1999). Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94** Suppl **1**, 199-201.
- PALAU M.T., MEJIA A.J., VERGARA U. & ZUNIGA C.A. (2003). Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent *Trypanosoma cruzi* populations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98**, 543-548.
- PENA S.D., BARRETO G., VAGO A.R., DE MARCO L., REINACH F.C., DIAS N.E. & SIMPSON A.J. (1994). Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**, 1946-1949.
- PEREIRA J.B., WILLCOX H.P. & COURA J.R. (1985). Morbidity in Chagas disease. III. Longitudinal study of 6 years, in Virgem da Lapa, MG, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **80**, 63-71.
- PIMENTA J. R. (2002). Análises filogenéticas e populacionais em *Trypanosoma cruzi* a partir de estudos de microsatélites polimórficos de DNA. Tese de doutorado, Belo Horizonte, UFMG , p150.

- PINTO A.S., DE LANA M., BASTRENTA B., BARNABE C., QUESNEY V., NOEL S. & TIBAYRENC M. (1998). Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. *Parasitol. Res.* **84**, 348-353.
- PINTO A.S., DE LANA M., BRITTO C., BASTRENTA B. & TIBAYRENC M. (2000). Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *Int. J. Parasitol.* **30**, 843-848.
- POLLEVICK, G. D., DI NOIA, J. M., SALTO, M. L., LIMA, C., AND LEGUIZÁMON, M. S. (2000). *Trypanosoma cruzi* surface mucins with exposed variant epitopes. *J. Biol. Chem.* **275**, 27671-27680.
- RAMIREZ J.L. & GUEVARA P. (1987). The ribosomal gene spacer as a tool for the taxonomy of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **22**, 177-183.
- REVOLLO S., OURY B., LAURENT J.P., BARNABE C., QUESNEY V., CARRIERE V., NOEL S. & TIBAYRENC M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp. Parasitol.* **89**, 30-39.
- ROBELLO C., GAMARRO F., CASTANYS S. & ALVAREZ-VALIN F. (2000). Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. *Gene* **246**, 331-338.
- ROMANHA A.J., SILVA PEREIRA A.A., CHIARI E. & KILGOUR V. (1979). Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp. Biochem. Physiol.* **62**, 139-142.
- ROMANHA, A. J. (1982). Heterogeneidade enzimática em *Trypanosoma cruzi*. Tese de doutorado , Belo Horizonte, UFMG, p. 110.
- RUIZ R.C., FAVORETO S JR, DORTA M.L., OSHIRO M.E., FERREIRA A.T., MANQUE P.M. & YOSHIDA N. (1998). Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem. J.* **330** (Pt 1), 505-511.
- SANCHEZ G., WALLACE A., OLIVARES M., DIAZ N., AGUILERA X., APT W. & SOLARI A. (1990). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodemes: in vitro differentiation of epimastigotes and infectivity of culture metacyclic trypomastigotes to mice. *Exp. Parasitol.* **71**, 125-133.
- SANTORI F.R., DORTA M.L., JULIANO L., JULIANO M.A., DA SILVEIRA J.F., RUIZ R.C. & YOSHIDA N. (1996). Identification of a domain of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 required for attachment and invasion of mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **78**, 209-216.

- SCHENCKMAN S., JIANGM. S., HART G. W. & NUSSENZWIG V. (1991). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* **65**, 1117-1126.
- SILVA L.H.P & NUSSENZWEIG V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* **20**, 191-208
- SLOOF P., BOS J.L., KONINGS A.F., MENKE H.H., BORST P., GUTTERIDGE W.E. & LEON W. (1983). Characterization of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *J. Mol. Biol.* **167**, 1-21.
- SNEDECOR, G. W. & COCHRANW.G. (1989). Statistical Methods. 8^aed., Iowa State, University Press. Ames, p. 503.
- SOLARI A., CAMPILLAY R., ORTIZ S. & WALLACE A. (2001). Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp. Parasitol.* **97**, 226-233.
- SOLARI A., WALLACE A., ORTIZ S., VENEGAS J. & SANCHEZ G. (1998). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean insect vectors. *Exp. Parasitol.* **89**, 312-322.
- SOUTO R.P. & ZINGALES B. (1993). Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62**, 45-52.
- SOUTO R.P., FERNANDES O., MACEDO A.M., CAMPBELL D.A. & ZINGALES B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**, 141-152.
- STEINDEL M., DIAS N.E., DE MENEZES C.L., ROMANHA A.J. & SIMPSON A.J. (1993). Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**, 71-79.
- STURM N.R., DEGRAVE W., MOREL C. & SIMPSON L. (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**, 205-214.
- STURM N.R., VARGAS N.S., WESTENBERGER S.J., ZINGALES B. & CAMPBELL D.A. (2003). Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* **33**, 269-279.
- TARLETON R.L. (1990). Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* **144**, 717-724.

- TARLETON R.L., KOLLER B.H., LATOUR A. & POSTAN M. (1992). Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature* **356**, 338-340.
- TIBAYRENC M., CARIOU M. L., SOLIGNAC J. P., DEDET J. P., POCH O. & DEJEUX P. (1985). New electrophoretic evidence of genetic variation & diploidy in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Genetic* **23**, 223-225.
- TIBAYRENC M., WARD P., MOYA A. & AYALA F.J. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **83**, 115-119.
- TIBAYRENC M. & BRENIERE S.F. (1988). *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **83 Suppl 1**, 249-255.
- TIBAYRENC M. & AYALA F. J. (1988). Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution* **42**, 277-292.
- TIBAYRENC M., NEUBAUER K., BARNABE C., GUERRINI F., SKARECKY D. & AYALA F.J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90**, 1335-1339.
- TIBAYRENC M. (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.* **36**, 47-115.
- TIBAYRENC M. (1998). Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **93**, 577-580.
- TIBAYRENC M. (2003). Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid. Biol. Dis.* **2**, 12
- TOLEDO M.J., GUILHERME A.L., DA SILVA J.C., DE GASPERI M.V., MENDES A.P., GOMES M.L. & DE ARAUJO S.M. (1997). *Trypanosoma cruzi*: chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Parana state and from different endemic areas of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **39**, 283-290.
- TOLEDO M.J., DE LANA M., CARNEIRO C.M., BAHIA M.T., MACHADO-COELHO G.L., VELOSO V.M., BARNABE C., TIBAYRENC M. & TAFURI W.L. (2002). Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp. Parasitol.* **100**, 161-172.

- TOLEDO M.J., BAHIA M.T., CARNEIRO C.M., MARTINS-FILHO O.A., TIBAYRENC M., BARNABE C., TAFURI W.L. & DE LANA M. (2003). Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **47**, 223-230.
- TOLEDO M.J., BAHIA M.T., VELOSO V.M., CARNEIRO C.M., MACHADO-COELHO G.L., ALVES C.F., MARTINS H.R., CRUZ R.E., TAFURI W.L. & LANA M. (2004a). Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 1045-1053.
- TOLEDO, M. J. O., TAFURI, W. L., BAHIA, M. T., TIBAYRENC, M., AND LANA, M. (2004b). Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas Disease. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **4**, 11-22.
- TORRES, J. P., ORTIZ, S., AND SOLARI, A. (2003). *Trypanosoma cruzi* isolate from Chile are heterogeneous & composed of mixed populations when characterization by Schizodeme & Southern analyses. *Parasitol.* **128**, 161-168.
- TOYÉ, P. J. (1974). Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **68**, 147.
- VAGO A.R., MACEDO A.M., OLIVEIRA R.P., ANDRADE L.O., CHIARI E., GALVAO L.M., REIS D., PEREIRA M.E., SIMPSON A.J., TOSTES S. & PENA S.D. (1996a). Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.* **149**, 2153-2159.
- VAGO A.R., MACEDO A.M., ADAD S.J., REIS D.D. & CORREA-OLIVEIRA R. (1996b). PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas disease. *Lancet* **348**, 891-892.
- VAGO A.R., ANDRADE L.O., LEITE A.A., D'AVILA R.D., MACEDO A.M., ADAD S.J., TOSTES S.J.R, MOREIRA M.C., FILHO G.B. & PENA S.D. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.* **156**, 1805-1809.
- VEAS F., BRENIERE S.F., CUNY G., BRENGUES C., SOLARI A. & TIBAYRENC M. (1991). General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cell Mol. Biol.* **37**, 73-84.
- VELOSO V.M., CARNEIRO C.M., TOLEDO M.J., LANA M., CHIARI E., TAFURI W.L. & BAHIA M.T. (2001). Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**, 1005-1011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- VIANNIA G. (1911). Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Moléstia de Carlos Chagas". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **3**, 276-294.
- WAGNER W. & SO M. (1990). Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. *Infect. Immun.* **58**, 3217-3224.
- WALLACE A., ORTIZ S., SANCHEZ G., VILLAGRA R., MUGA M. & SOLARI A. (2001). Studies on parasitemia courses and mortality in mice infected with genetically distant *Trypanosoma cruzi* clonets. *Biol. Res.* **34**, 83-90.
- WALTER A. (2003). Human activities and American trypanosomiasis. Review of the literature. *Parasite* **10**, 191-204.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1991). Control of Chagas disease. Report of a Expert Committee. *WHO Technical Report Series* **811**, p. 95.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2000). Chagas disease: certification of interruption of transmission in Brazil. *Weekly Epidemiological Record* **19**, 153-155.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2002). Report of the Expert Committee on the Control of Chagas disease. *Technical Report Series* **905**, p.85.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2003). Chagas disease. In: TDR Switzerland. Disponível em <[http:// who.int/tdr/dw/chagas2003.htm](http://who.int/tdr/dw/chagas2003.htm)>. Acesso em: 13 de dez. 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
