

SELEÇÃO DE DTU-II EM MISTURA POPULACIONAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

SELECTION OF DTU-II IN POPULATIONAL MIXTURE OF *TRYPANOSOMA CRUZI*

LARA MARIA KALEMPA **DEMEU**¹, AMANDA REGINA NICH **DE SÁ**², ROBSON SOJIRO **WATANABE**³, MAX JEAN DE ORNELAS **TOLEDO**⁴, SILVANA MARQUES DE **ARAÚJO**⁴, MÔNICA **LÚCIA GOMES**^{4*}

1. Mestre, Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá; 2. Mestre, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá; 3. Farmacêutico pela Universidade Estadual de Maringá; 4. Professor Doutor, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá.

* Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, Zona 7, Maringá, Paraná, CEP: 87020-900, Brasil. mlgomes@uem.br; monicaluciagomes@gmail.com

Recebido em 20/06/2017. Aceito para publicação em 05/07/2017

RESUMO

Trypanosoma cruzi DTU-I e DTU-II são encontrados simultaneamente no mesmo hospedeiro. Pela análise dos genes citocromo-oxidase II (COII) e RNA ribossomal (RNAr), investigamos se a manutenção de culturas acelulares exponenciais e estacionárias durante 18-24 meses seleciona DTU-I ou DTU-II em populações naturais (PR-N10.19) e artificialmente misturadas nas proporções 9:1, 3:1, 1:1, 1:3 e 1:9, correspondentes a 90%, 75%, 50%, 25% e 10% da quantidade de DTU-I PR-150) em relação à DTU-II (PR-1256). Os resultados de COII indicaram que na cultura exponencial a DTU-I diminuiu de razão de 9:1 para 1:3 aos 15 meses, e a DTU-II predominou em todas as proporções aos 24 meses. Na fase estacionária, DTU-I diminuiu para 1:1 após 12-15 meses em cultura, e DTU-II predominou em 1:3 e 1:9. De 18 a 24 meses, a DTU-II foi predominante em todas as proporções. A análise de RNAr revelou DTU-I / DTU-II em 3:1 aos 9 meses na cultura exponencial e 9:1, 3:1 e 1:1 de 9 a 12 meses na cultura estacionária. A DTU-II predominou após 15-24 meses em todas as proporções. A análise N10.19 confirmou os resultados das proporções. A seleção de DTU-II depende da proporção de DTU-I/DTU-II, do tempo de cultivo e da fase do crescimento. Análise COII é mais adequado para o estudo da dinâmica de populações mistas.

PALAVRAS-CHAVE: Infecções mistas, *Trypanosoma cruzi*, RNA ribossomal, RFLP-COII, cultivo acelular.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi DTU-I and DTU-II have been simultaneously found in the same host. By analyzing the cytochrome oxidase II (COII) and ribosomal RNA (rRNA) genes, we investigated whether the maintenance of exponential and stationary acellular cultures for 18-24 months selects DTU-I or DTU-II in natural (PR-N10.19) and artificially mixed populations in the ratios 9:1, 3:1, 1:1, 1:3 and 1:9, correspondent to 90%, 75%, 50%, 25% and 10% of amount of DTU-I (PR-150) in relationship to DTU-II (PR-1256). The COII results indicated that in the exponential culture DTU-I decreased from ratio 9:1 to 1:3 at 15 months, and DTU-II was predominant in all proportions at 24 months. In the stationary phase, DTU-I decreased to 1:1 after 12-15

months in culture, and DTU-II predominated at 1:3 and 1:9. From 18 to 24 months, DTU-II was predominant in all proportions. The rRNA analysis revealed DTU-I/DTU-II at 3:1 at 9 months in the exponential culture and 9:1, 3:1 and 1:1 from 9 to 12 months in the stationary culture. DTU-II predominated after 15-24 months in all of the ratios. The N10.19 analysis confirmed the proportion results. The selection of DTU-II depends on the ratio of DTU-I/DTU-II, time, and phase of the culture. COII analysis is more suitable for the study of dynamic of mixed populations.

KEYWORDS: Mixed infection, *Trypanosoma cruzi*, ribosomal RNA, RFLP-COII, acellular growing.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas causada pelo *Trypanosoma cruzi* é amplamente distribuída no continente americano, sendo ainda considerada um importante problema de saúde pública. Cinco a sete milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina estão infectadas por esse protozoário (WHO, 2015; 2016). No Brasil, estima-se a existência de 3 milhões de indivíduos infectados, encontrados em quase todos os estados brasileiros, porém, com grande predomínio nas regiões nordeste, centro-oeste e sudeste (DIAS, 2016).

Estudos têm mostrado que *T. cruzi* é uma espécie heterogênea, consistindo de várias subpopulações com diferentes características bioquímicas, biológicas e genéticas (MACEDO *et al.*, 2004; BRENER, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 1998). A classificação mais atual de *T. cruzi* é designada DTU (Discrete Typing Units – Unidades de tipagens distintas) de TcI ao TcVI (ZINGALES *et al.*, 2012). TcI e TcII são frequentemente associados com diferentes hospedeiros e ciclos de transmissão (SPITZNER *et al.*, 2007; STEINDEL *et al.*, 2008; ABOLIS *et al.*, 2011). TcIII é associado com ciclo de transmissão terrestre e comum entre tatus e humanos (FREITAS *et al.*, 2006; MARCILI *et al.*, 2009). TcIV inclui cepas pertencentes

ao anteriormente descrito como zimodema 3 (MILES *et al.*, 1981) e tem sido encontrado em primatas, *Rhodnius* spp., e pacientes chagásicos associados com a transmissão oral (MARCILI *et al.*, 2009). TcV e TcVI são prevalentes entre isolados obtidos de humanos e com ampla distribuição geográfica (BARNABÉ *et al.*, 2000; BURGOS *et al.*, 2010).

Ainda não está claro o envolvimento das DTU I e II na patologia da doença. No norte da América do Sul onde predomina TcI, este está associado com a doença menos severa em humanos, enquanto que TcII, TcV e TcVI são mais comuns no Cone Sul, onde megassíndromes são mais frequentes (MILES *et al.*, 2009; LLEWELLYN *et al.*, 2011). Por outro lado, pacientes da Colômbia infectados com TcI apresentaram alterações cardíacas com maior frequência do que aqueles infectados com TcII (RAMÍREZ *et al.*, 2010). Essas duas DTUs possuem comportamentos distintos a respeito de sua virulência, capacidade de invasão da célula, infectividade (MORTARA *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2010), capacidade de transmissão no vetor (LANA *et al.*, 1998) e resistência a agentes quimioterápicos (TOLEDO *et al.*, 2003).

As DTU TcI e TcII, frequentemente são encontradas em hospedeiros distintos, mas a ocorrência de infecções mistas com essas duas DTU em um mesmo hospedeiro, também tem sido relatada (SPITZNER *et al.*, 2007; STEINDEL *et al.*, 2008; ABOLIS *et al.*, 2011). Embora, estudos que abordem a evolução de infecções mistas não estejam disponíveis, competições entre parasitos de diferentes genótipos dentro de um hospedeiro pode ser um importante fator na evolução e ecologia do parasito (GOWER; WEBSTER, 2005). Infecções naturais por TcI e TcII em vetores e reservatórios têm sido relatadas mas, pelo menos no Brasil, apenas TcII tem sido consistentemente observado em pacientes na fase crônica da infecção (FREITAS *et al.*, 2005). Pena *et al.* (2011) mostraram que macrófagos murinos infectados com populações naturalmente mistas (*T. cruzi* I e II) oriundas de vetores foram capazes de selecionar apenas populações TcII. Juntos, estes dados levantam a hipótese que cepas de TcII são selecionadas *in vivo* durante a infecção humana (PENA *et al.*, 2011). Outros resultados que apontam para seleção de TcII em humanos é que a análise molecular das cepas de *T. cruzi* em um surto de fase aguda da doença de Chagas em Santa Catarina, sul do Brasil, identificou padrões de infecção mista (TcI/TcII) em cepas derivadas de *Triatoma tibiamaculata*, enquanto cepas isoladas de pacientes mostraram padrões de TcII (STEINDEL *et al.*, 2008).

Co-infecções por TcI e TcII foram também observadas por outros autores em uma mesma espécie vetora ou quando cepas de *T. cruzi* foram isoladas de humanos, triatomíneos e reservatórios silvestres (SPITZNER *et al.*; ABOLIS *et al.* 2011). Em *Rhodnius prolixus* experimentalmente infectados com as seis

DTU de *T. cruzi* foi evidenciado a presença de infecções mistas e seleção dinâmica em direção a uma DTU específica (SÁ *et al.*, 2016). Seleção de determinadas subpopulações de *T. cruzi* podem também ocorrer após manutenção de cepas em laboratório (MACEDO *et al.*, 2004; DEANE *et al.*, 1984). Nesse trabalho foi proposto verificar se a manutenção em cultivo acelular por um longo período de tempo seleciona populações naturalmente mistas e artificialmente misturadas (TcI/TcII) em diferentes proporções utilizando as análises dos genes de rRNA e de COII.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As cepas isoladas de humano, 150 (TcI) e 1256 (TcII) em misturas artificiais contendo proporções diferentes de TcI e TcII (10, 25, 50, 75 e 90%) e isolada de *Triatoma sordida* (N10.19) naturalmente mista (TcI+TcII) foram utilizadas nesse estudo. Estas cepas estão criopreservadas em nitrogênio líquido há aproximadamente 20 anos no Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Estadual de Maringá (LDC/UEM). Como cepas referência foram utilizadas Sylvio (TcI) e Esmeraldo (TcII).

Essas misturas de populações (TcI/TcII) foram mantidas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) a 28°C de acordo com Chiari (1981), mas com repiques a cada 72 horas para a fase exponencial do crescimento e a cada 15 dias para a fase estacionária, por ser o período que no nosso laboratório correspondeu a duplicação do parasito. As misturas artificiais foram mantidas por 24 meses e a mistura natural por 18 meses. Os parasitos foram mantidos até atingir a concentração de 1×10^9 células/mL, lavados por três vezes em tampão KRT (Krebs-Ringer-Tris) e a massa parasitária foi obtida a cada 30 dias e armazenada a -20°C até o uso.

Da massa parasitária o DNA foi extraído como descrito por Macedo *et al.* (1992). A massa celular foi ressuspendida em NaCl 80 mM/EDTA 45mM, pH 8.0/SDS 1%. Proteinase K (Sigma Company Ltda) foi adicionada a 0,1mg/mL e o produto foi incubado a 37°C por uma noite. A extração foi realizada com fenol, fenol-clorofórmio, seguida por uma precipitação com etanol absoluto. O DNA foi ressuspendido em tampão de Low-TE (Tris-HCl, pH 8.0/ 1mM EDTA, pH 8.0) na proporção de 100 μ L/ 10^9 células. O DNA foi quantificado utilizando-se *Qubit® dsDNA BR Assay Kit*, e a concentração foi ajustada para 1 ng/ μ L.

A amplificação da sequência do gene 24Sa do RNAr foi realizada como descrito por Souto *et al.* (1996) e revisado por Macedo *et al.* (2004). Cada reação de amplificação foi feita no termociclador (Techne, TE-512) em um volume final de 12,5 μ L. Os iniciadores utilizados foram o D71 (5'AAGGTGCGTCGACAGTGTGG3') e o D72 (5'TTTTCAGAATGGCCGAACAGT3'). Os produtos amplificados de 110 pb e 125 pb que são característicos

de TcI e TcII, respectivamente, foram visualizados em géis de poliacrilamida a 6% após revelação com sais de prata. A presença de ambos os produtos é característico de *T. cruzi* I/II de acordo com Souto *et al.* (1996).

A amplificação da subunidade 2 do gene mitocondrial Citocromo Oxidase (COII) foi realizada como descrito por Freitas *et al.* (2006) com modificações (ABOLIS *et al.*, 2011). Cada reação de amplificação foi realizada com 3,1 pmol de cada iniciador, 2 ng de DNA total em um volume final da reação de 15,0 μ L. Os iniciadores utilizados foram Tcmit-10 (5'-CCATATATTGTTGCATTATT-3') e Tcmit-21 (5'-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3') gerando fragmentos de 450pb para TcI e de 400 pb para TcII. A amplificação foi realizada em um termociclador (Techne, TE-512) e dez microlitros dos produtos amplificados do DNA do maxicirculo de *T. cruzi* foram digeridos com a enzima de restrição *AluI* (Biolabs, New England) por 16 horas. A análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) do gene de COII foi feita em gel de poliacrilamida a 6% após revelação com sais de prata. No sítio *AluI* polimórfico a banda de aproximadamente 280 pb é característica de TcI e a banda de 250 pb de TcII.

3. RESULTADOS

O cultivo prolongado em fase exponencial das cepas PR-150 (DTU-I) e PR-1256 (DTU-II) individualmente e nas misturas artificiais nas razões 9:1, 3:1, 1:1, 1:3 e 1:9 e das cepas referência Sylvio (DTU-I) e Esmeraldo (DTU-II) até 6 meses (R54) mostrou a presença de DTU-I e DTU-II como no início do cultivo (R1). Após 9 meses (R77) e 12 meses (R104) de cultivo, os produtos de RFLP-COII após digestão enzimática com *AluI* mostraram uma redução de DTU-I na proporção 1: 9. Após 15 meses (R131), a quantidade de DTU-I diminuiu gradualmente de 3:1 até 1:3, com eliminação total no 1:9 e uma predominância de DTU-II (Figura 1). Após 18 meses (R158) e 21 meses (R185) em cultura, a DTU-I foi eliminada em todas as proporções, com exceção da razão 1:1, com discreta presença dessa população e predominância total de DTU-II em todas as proporções aos 24 meses (R212) (dados não mostrados).

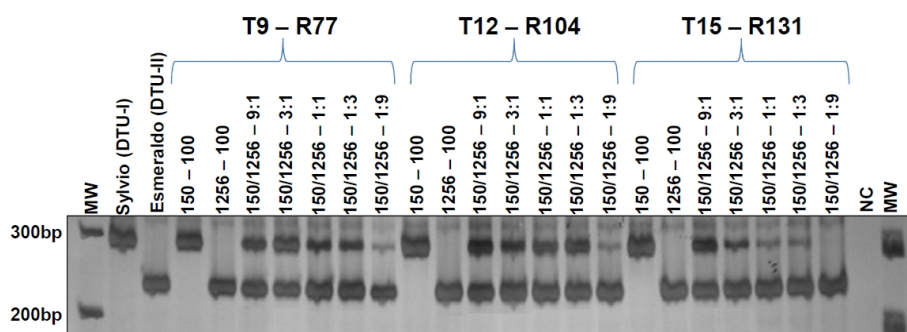
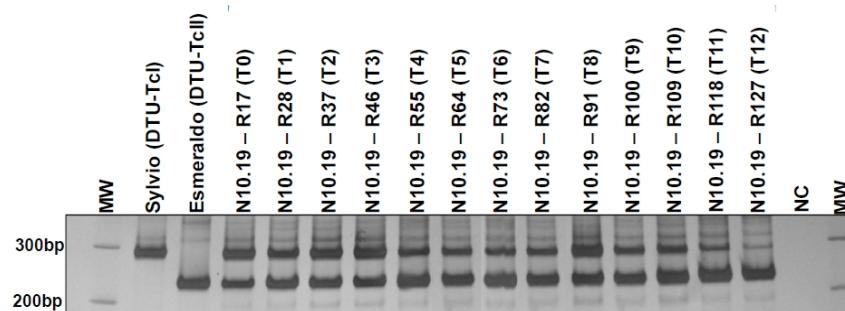


Figura 1. Padrões de bandas em gel de poliacrilamida a 6% de genes da citocromo oxidase II (COII) das misturas artificiais de

Trypanosoma cruzi I e II cultivadas em meio acelular em fase exponencial após digestão com Enzima de restrição *AluI*. As linhas 1 e 2 são as amostras de referência (DTU-I: Sylvio; DTU-II: Esmeraldo); As linhas 3 e 4 são amplificações de 2 ng de DNA (1,175 x 10⁶ flagelados) de DTU-I (PR-150) e DTU-II (PR-1256), respectivamente; As linhas 5 a 9 são amplificações de 1,175 x 10⁶ parasitas a partir de misturas em diferentes proporções 9:1, 3:1, 1:1, 1:3 e 1:9 correspondentes a 90%, 75%, 50%, 25% e 10 % da quantidade de DTU-I (PR-150) em relação à DTU-II (PR-1256) em T9-R77, 9 meses; T12-R104, 12 meses; T15-R131, 15 meses. NC, Controle negativo; MW, Marcador de Peso Molecular - 100 pb DNA Ladder; T, tempo de cultivo; R, número de passagens.

Após 8 meses de cultivo, a análise de RNAr revelou que a DTU-II estava mais uniformemente presente em todas as proporções e a DTU-I foi fracamente observada nas proporções com uma quantidade igual ou superior de DTU-I (9:1, 3:1, e 1:1), semelhante ao início da cultura. Aos 9 meses, ambas as populações estavam presentes na proporção de 3:1 e dos meses 15 até 24 apenas a DTU-II foi observada em todas as proporções (dados não apresentados).

Na fase de crescimento estacionário o comportamento das misturas artificiais foi semelhante ao da fase exponencial, tanto pela análise do gene COII como pela análise do RNAr com a presença de apenas DTU-II aos 24 meses de cultivo (dados não



apresentados).

Figura 2. Perfil de amplificação do gene da Citocromo Oxidase II (COII) da mistura natural (DTU-I + DTU-II) da cepa PR-N10.19 de *Trypanosoma cruzi* cultivada em meio acelular na fase exponencial (DTU-I: Sylvio, DTU-II: Esmeraldo) em gel de poliacrilamida a 6% após digestão com a enzima de restrição *AluI*. T0-R1, Tempo zero da cultura inicial; T12-R127, 12 meses. NC, controle negativo; MW, Marcador de Peso Molecular - 100 pb DNA Ladder; T, tempo de cultivo; R, número de passagens.

As populações naturalmente misturadas (PR-N10.19) aos 10 meses (R109) em cultura exponencial e 12 meses (R44) em cultura estacionária mostraram a presença de DTU-I e DTU-II como o início do cultivo.

A redução da DTU-I começou a ocorrer a partir de 11 meses (R118) na cultura exponencial, que foi mais evidente aos 12 meses (R127) após a digestão enzimática (Figura 2). A partir de 13 meses, a DTU-I foi completamente eliminada, e a DTU-II predominou até 18 meses nas duas fases do crescimento. A análise de RNAr revelou a presença apenas de

DTU-II em ambas as fases de cultivo (dados não

apresentados).

4. DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi mostrado que o cultivo acelular de 18-24 meses seleciona DTU-II em populações naturais ou misturas artificiais de DTU-I / DTU-II como evidenciado pelas análises dos genes de rRNA e COII. A seleção de uma população depende da proporção de parasitas na mistura, do tempo de cultivo e da fase do crescimento.

A proporção de parasitas em uma mistura é fator importante para selecionar ou eliminar uma população. Em misturas artificiais, a redução de DTU-I começou a ocorrer nas proporções em que a relação DTU-I / DTU-II era igual ou quando DTU-I estava presente numa quantidade inferior até ser completamente eliminada. Estes resultados indicam que, num tempo determinado do cultivo, a presença de DTU-I na mistura atingiu uma quantidade crítica que limitou a sua manutenção, e este fato pode estar relacionado com um maior tempo de duplicação de DTU-I (19,5 h) em comparação com DTU-II (9,6 h) (ARAUJO *et al.*, 2007). Pena *et al.* (2011) também observaram diferenças comportamentais entre DTU-I e DTU-II, que podem estar relacionadas a presença de imunoglobulina G em soro de pacientes com doença de Chagas, as cepas dos parasitos e a proporção de cada população (DTU-I / DTU-II) nas misturas.

O tempo de cultivo e fase de crescimento também são fatores determinantes na seleção de uma população em misturas artificiais. Na fase estacionária, a redução de DTU-I iniciou no terceiro mês e na fase exponencial no nono mês ocorrendo nas proporções 3:1 e 1:1, respectivamente. Aos 15 meses a DTU-I ainda foi observada na fase estacionária e na fase exponencial, sendo esta população totalmente eliminada, com predomínio de DTU-II. Esta DTU na fase estacionária foi selecionada aos 18 meses na proporção que representou 90% (1: 9) da mistura e em todas as proporções aos 24 meses para ambas as fases. Na fase exponencial, as manipulações e as mudanças do meio são frequentes fornecendo mais nutrientes para os parasitos em intervalos de tempo mais curtos. Isso favorece o crescimento de ambas as populações, mas a que estiver mais adaptada, no caso a DTU-II será predominante no cultivo, devido as suas características biológicas como maior capacidade de multiplicação e menor tempo de duplicação (ARAUJO *et al.*, 2007; PENA *et al.*, 2011). As culturas estacionárias com intervalos de manutenção mais longos fornecem menos nutrientes, levando a uma seleção mais precoce e determinante, com eliminação de populações com menor capacidade metabólica e maior tempo de duplicação.

A seleção da DTU-II observada no presente estudo e por Pena *et al.* (2011) corroboram com os resultados de outros autores, em que DTU-II predomina em isolados de sangue humano na fase crônica da infecção, pelo menos no Brasil (MACEDO *et al.* 2004; FREITAS *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram

obtidos com análise de tecido direto (FREITAS *et al.*, 2005) indicando que o hospedeiro vertebrado pode funcionar como um filtro biológico para esta população.

As culturas acelulares simulam o desenvolvimento de *T. cruzi* em hospedeiros invertebrados, podendo esses hospedeiros exercerem pressão seletiva que favoreça a predominância de uma determinada DTU em populações mistas. Araújo *et al.* (2007) relataram a predominância de DTU-I em infecção mista (DTU-I/DTU-II) em *Triatoma brasiliensis*. Sá *et al.*, (2016) evidenciaram em *Rhodnius prolixus* experimentalmente infectados seleção dinâmica em direção a uma DTU específica na presença de infecções mistas com as seis DTU de *T. cruzi*.

A comparação entre cultivo acelular de misturas artificiais e população naturalmente mista enfatiza a importância da proporção de cada população em uma mistura, a fase e o tempo de cultivo. Na fase exponencial, DTU-I e DTU-II estavam presentes como no início do cultivo até 8 meses na mistura artificial e até 10 meses na população naturalmente mista. Na fase estacionária, até os 3 meses a cultura misturada artificialmente mostrou a presença de ambas as populações (DTU-I /DTU-II), com redução da DTU-I nas razões 1:3 e 1:9, principalmente aos 6 meses e na população naturalmente mista DTU-I/DTU-II permaneceu até 12 meses como no início do cultivo. A seleção completa de DTU-II ocorreu de 18-24 meses na mistura artificial e de 13-18 meses na população naturalmente mista para ambas as fases de crescimento.

5. CONCLUSÃO

A seleção de uma DTU em populações artificialmente misturadas ou naturalmente mistas depende da proporção DTU-I/DTU-II na mistura, do tempo de cultivo e da fase de crescimento. TcII foi a população selecionada após manutenção de longo período de tempo no laboratório, sugerindo que as características biológicas, como alta capacidade de multiplicação e menor tempo de duplicação podem favorecer esta seleção. A análise de RFLP-COII mostrou maior poder de discriminação no estudo da dinâmica de populações artificialmente misturadas e naturalmente mistas. Estes achados podem proporcionar uma melhor compreensão do comportamento dessas populações durante o curso da infecção em humanos, reservatórios e triatomíneos.

6. FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pela Fundação Araucária (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Paraná), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

7. REFERÊNCIAS

- [01] ABOLIS N.G., ARAÚJO S.M., TOLEDO M.J.O., FERNANDEZ M.A., GOMES M.L. *Trypanosoma*

- cruzi* I, II, and III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. *Acta Trop.*, v.120, p.167-72, 2011.
- [02] ANDRADE L.O., GALVÃO L.M.C., MEIRELLES M.N.S.L., CHIARI E., PENA S.D.J., MACEDO A.M. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.105, p.834-37, 2010.
- [03] ARAÚJO C.A.C., CABELLO P.H., JANSEN A.M. Growth behavior of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: In vitro and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. *Acta Trop.*, v.101, p.225-31, 2007.
- [04] BARNABÉ C., BRISSE S., TIBAYRENC M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology*, v.120, p.513-26, 2000.
- [05] BRENER Z. *Trypanosoma cruzi*: Taxonomy morphology and life cycle. In: Chagas disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine in São Paulo (Eds. S. Wendel, Z. Brener, M. E. Camargo and A. Rassi). Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia p.13-29, 1992.
- [06] BURGOS J.M., DIEZ M., VIGLIANO C., BISIO M., RISSO M., DUFFY T. *et al.* Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and reactivation after heart transplantation. *Clin. Infect. Dis.*, p.51, p.485-95, 2010.
- [07] CHIARI E. Diferenciação do *Trypanosoma cruzi* em cultura. Belo Horizonte, 1981. 91f. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais.
- [08] DEANE M.P., SOUSA M.A., PEREIRA N.M., GONÇALVES A.M., MOMEN H., MOREL C.M. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. *J. Protozool.*, v.31, p.276-80, 1984.
- [09] DIAS, J.C.P., RAMOS, A.N.J., GONTIJO, E.D., LUQUETTI, A., SHIKANAI-YASUDA, M.A., COURA, J.R. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde*. v.25, p.7-86, 2016.
- [10] FREITAS J.M., PINTO L.A., PIMENTA J.R., RODRIGUES L.B., GONÇALVES V.F., TEIXEIRA S.M.R. *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Plos Pathogens*, v.3, p.01-10, 2006.
- [11] FREITAS J.M., SILVA E.L., CREMA E., PENA S.D.J., MACEDO A.M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int. J. Parasitol.* v.35, p.411-17, 2005.
- [12] GOMES M.L., MACEDO A.M., PENA S.D., CHIARI E. Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. *Acta Trop.* v. 69, p.99-109, 1998.
- [13] GOWER M., WEBSTER J.P. Intraspecific competition and the evolution of virulence in a parasitic trematode. *Evolution*, v.59, p.544-53, 2005.
- [14] LANA M., PINTO A.S., BARNABÉ C., QUESNEY V., NOËL S., TIBAYRENC M. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.*, v.89, p.1-5, 1998.
- [15] LLEWELLYN M.S., RIVETT-CARNAC J.B., FITZPATRICK S., LEWIS M.D., YEO M., GAUNT M.W. *et al.* Extraordinary *Trypanosoma cruzi* diversity within single mammalian reservoir hosts implies a mechanism of diversifying selection. *Int. J. Parasitol.*, p.41, p.609-14, 2011.
- [16] MACEDO A.M., MACHADO C.R., OLIVEIRA R.P., PENA S.D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.99, p.1-12, 2004.
- [17] MACEDO A.M., MARTINS M.S., CHIARI E., PENA S.D.J. DNA Fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.55, p.147-54, 1992.
- [18] MARCILI A., VALENTE V.C., VALENTE S.A., JUNQUEIRA A.C., SILVA F.M., PINTO A.Y. *et al.* *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol.*, v.39, p.615-23, 2009.
- [19] MILES M.A., CEDILLOS R.A., POVOA M.M., DE SOUZA A.A., PRATA A., MACEDO V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? *Lancet*, v.1, p.1338-40, 1981.
- [20] MILES MA, LLEWELLYN MS, LEWIS MD, YEO M, BALEELA R, FITZPATRICK S. *et al.* The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*, v.136, p.1509-28, 2009.
- [21] MORTARA R.A., ANDREOLI W.K., TANIWAKI N.N., FERNANDES A.B., SILVA C.V., FERNANDES M.C.D.C. *et al.* Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. *An. Acad. Bras. Cienc.* v.77, p.77-94, 2005.
- [22] OLIVEIRA R.P., MACEDO A.M., CHIARI E., PENA S.D.J. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. *Parasitol. Today*, v.13, p.196-200, 1997.
- [23] PENA D.A., EGER I., NOGUEIRA L., HECK N., MENIN A., BÁFICA A., STEINDEL M. Selection of TcII *Trypanosoma cruzi* Population Following Macrophage Infections. *J. Infect. Dis.*, v.204, p.478-86, 2011.
- [24] RAMÍREZ J.D., GUHL F., RENDÓN L.M., ROSAS F., MARIN-NETO J.A., MORILLO C.A. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.4, p.1-9, 2010.
- [25] SÁ A.R.N., DIAS G.B.M., KIMOTO K.Y., STEINDEL M., GRISARD E.C., TOLEDO M.J.O., GOMES M.L. Genotyping of *Trypanosoma cruzi* DTUs and *Trypanosoma rangeli* genetic groups in experimentally infected *Rhodnius prolixus* by PCR-RFLP. *Acta Trop.*, v.156, p. 115-121, 2016.
- [26] SOUTO R.P., FERNANDES O., MACEDO A.M., CAMPBELL D.A., ZINGALES B. DNA Markers define two major phylogenetic lineages of

- Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., v83, p.141-52, 1996.
- [27] SPITZNER F.L., FREITAS J.M., MACEDO A.M., TOLEDO M.J.O., ARAÚJO S.M., PRIOLI A.J., GOMES M.L. *Trypanosoma cruzi* - triatomine associations and the presence of mixed infections in single triatomine bugs in Paraná state, Brazil. Acta Parasitol., v.52, p.74-81, 2007.
- [28] STEINDEL M., PACHECO L.K., SCHOLL D., SOARES M., MORAES M.H., EGER I. *et al.* Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diag. Microbiol. Inf. Dis., v.60, p.25-32, 2008.
- [29] TOLEDO M.J.O., BAHIA M.T., CARNEIRO C.M., MARTINS-FILHO O.A., TIBAYRENC M., BARNABÉ C. *et al.* Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrob. Agents Chemother., v.47, p.223-30, 2003.
- [30] WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso 03 janeiro de 2017.
- [31] WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Weekly Epidemiological Record. v.90, n.6, p.33-44, 2015.
- [32] ZINGALES, B., MILES, M.A., CAMPBELL, D.A., TIBAYRENC, M., MACEDO, A.M., TEIXEIRA, M.M. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect. Genet. Evol., v.12, p.240-253, 2012.