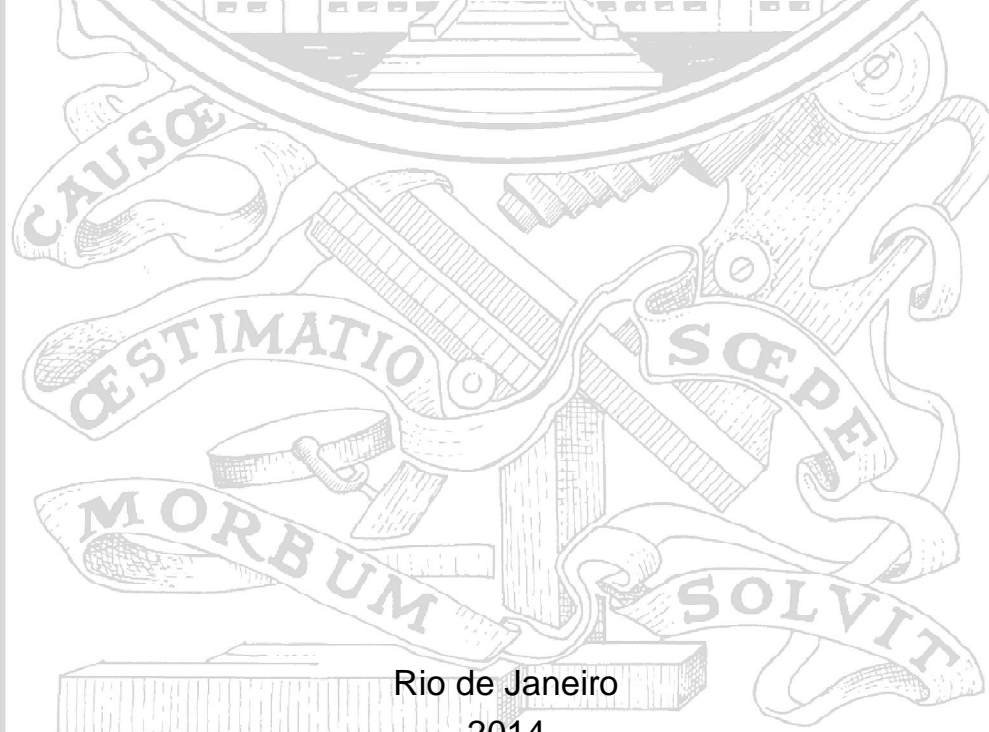


MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Pós-Graduação em Biologia Parasitária

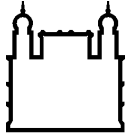
**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DAS SUBPOPULAÇÕES DE  
*TRYPANOSOMA CRUZI* ISOLADAS DO GÊNERO *DIDELPHIS* NO  
BRASIL BASEADO NO MULTI LOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)**

**IRENE FABIOLA ROMAN MALDONADO**



Rio de Janeiro

2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***IRENE FABIOLA ROMAN MALDONADO***

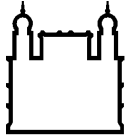
Estudo da diversidade genética das subpopulações de *Trypanosoma cruzi* I isoladas do gênero *Didelphis* no Brasil baseado no Multilocus Sequênce Typing (MLST)

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

**Orientadora:** Prof. Dra. Ana Maria Jansen-Franken

**RIO DE JANEIRO**

Fevereiro de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: IRENE FABIOLA ROMAN MALDONADO***

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DAS SUBPOPULAÇÕES DE  
TRYPANOSOMA CRUZI I ISOLADAS DO GÊNERO DIDELPHIS NO BRASIL  
BASEADO NO MULTI LOCUS SEQUÊNCIA TYPING (MLST)**

**ORIENTADORA: Prof. Dr. Ana Maria Jansen-Franken**

**Aprovada em: 28/02/2014**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brasil (IOC/FIOCRUZ) - Presidente**

**Prof. Dr. Marcelo Salabert (UFF) - Membro**

**Prof. Dr. Adeilton Alves Brandão (IOC/FIOCRUZ) - Membro**

**Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas (IOC/FIOCRUZ) - Suplente**

**Prof. Dr. Fatima Madeira (IPEC/FIOCRUZ) - Suplente**

Rio de Janeiro, 28 fevereiro de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M244 Maldonado, Irene Fabiola Roman

Estudo da diversidade genética das subpopulações de *Trypanosoma cruzi* / isoladas do gênero *Didelphis* no Brasil baseado no Multilocus Sequênce Typing (MLST) / Irene Fabiola Roman Maldonado. – Rio de Janeiro, 2014.

xv, 95 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 81-92

1. *Trypanosoma cruzi* l. 2. MLST. 3. Bioacumulador. 4. *Didelphis spp.*  
I. Título.

CDD 616.9363

***Dedicado a meu esposo Carlos  
Meus pais, Perla e Ireneo  
Amo vocês***

## AGRADECIMENTOS

Nestes dois anos no LabTrip, além de trabalhar na dissertação de mestrado, posso dizer que ganhei bons amigos. Amigos que me acompanharam na minha chegada e no meu dia a dia. Eu quero dizer a todos vocês OBRIGADA pela amizade e por ser excelentes colegas no trabalho. Vou tentar citar vocês, mas eu sei que aqueles que fizeram e fazem a minha estância no Brasil confortável são muitos mais dos que eu consigo nomear.

Eu quero dizer *GRACIAS*, a minha orientadora, a Dra Ana Maria Jansen por ter aberto as portas a meu aprendizado no LABTRIP e ser um exemplo de pesquisadora para mim. Pela paciência e o amor a ciência que ela mostra cada dia. Obrigada por dizer “SIM” naquele primeiro email.

A meus pais que me apoiam sempre nas minhas escolhas, pela companhia desde longe e por celebrar comigo cada logro. *Papi Mami muchas gracias porque son unos padres excelentes. Los quiero mucho.*

A meu esposo Carlos. Obrigada por me mostrar a beleza da vida, por me alentar a fazer as coisas que eu achava impossíveis. Obrigada porque você é meu esposo, amigo, colega e parceiro e por me ajudar muito mais nos últimos meses. Eu adoro a minha vida contigo e o caminho que escolhimos. *TE AMO, vamos por mas!*

A Valdirene (Val), que me ajudou e me ensinou com toda a paciência do mundo. A Dani que está sempre para esclarecer minhas dúvidas da coleção. A Bia que é um amor de pessoa, com um coração enorme, obrigada também pela carona!!. Amo vocês. Às minhas colegas da sala: Sam (obrigada pelos mapas!), Jul, Renata, Lucélia, Laurem, Bel, Valquiria, Lipo e Kamilla, Marcão, Cris, André Roque, foram uma família para mim. Obrigada.

À Dra Ana Carolina Paulo Vicente, por abrir as portas do seu laboratório para mim. Ao Michel, por me ajudar com paciência nas análises genéticas, *Gracias!*

A minhas professoras do Paraguai a Dra Antonieta Rojas de Arias que me ajudou a dar o primeiro paso na aplicação do mestrado. Às Dras Celeste Vega e Miriam Rolón, porque com vocês no CEDIC me sinto como em casa, obrigada por confiar em mim. A minha querida profe Perla, que desde a faculdade foi mais que uma professora, foi a minha amiga.

A Josefina Rios, por me acompanhar desde longe e me ajudar a ver com clareza as coisas. *Gracias!*

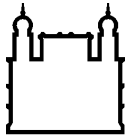
Aos amigos Andrés Mojoli, Danilo Fernández, Francisco Brusquetti porque me ajudaram sempre esclarecendo duvidas, manejar programas informáticos e obter artigos. A minha querida Silvia Sánchez por mi ajudar com o Zotero... *Gracias amigos!*

À *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* – CNPq pelo auxílio financeiro.

***...science and everyday life cannot and  
should not be separated.***

***Rosalind Franklin***





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

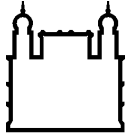
### ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DAS SUBPOPULAÇÕES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* ISOLADAS DO GÊNERO *DIDELPHIS* NO BRASIL BASEADO NO MULTI LOCUS SEQUENCING TYPING (MLST)

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Irene Fabiola Roman Maldonado

O genótipo TcI é a subpopulação de *Trypanosoma cruzi* mais amplamente distribuída no Brasil e nas Américas, tanto em relação ao número de espécies hospedeiras quanto à sua distribuição geográfica. Classicamente considerado como sendo homogêneo, estudos mais recentes vem demonstrando o contrário na medida em que na Colômbia já se descreveu a heterogeneidade desta população. Inclusive uma subpopulação denominada T<sub>C<sub>DOM</sub></sub>, associada ao ciclo doméstico naquele país. Com o objetivo de estudar a variabilidade genética do *T. cruzi* I, trinta e três amostras isoladas de espécies do gênero *Didelphis*, provenientes de quatro biomas do Brasil, foram analisadas mediante árvores filogenéticas, usando quatro genes constitutivos e utilizando a técnica de Tipagem por Sequências de Multilocus (MLST). As espécies do gênero *Didelphis* se caracterizam por seus hábitos silvestres/sinantrópicas, por serem nômades, amplamente distribuídos por todos os biomas do Brasil e ecléticos, tanto em relação aos habitats que podem ocupar quanto à alimentação, ou seja expostos a todos os ciclos de transmissão. Por estas características e por ser um dos hospedeiros mais antigos de *T. cruzi* foi escolhido como espécie hospedeira para a análise. Os resultados mostraram a existência de uma micro heterogeneidade presente nos isolados examinados, onde a maior diversidade foi observada no bioma Amazônia e a menor diversidade no bioma Caatinga. Observou-se uma correspondência entre a diversidade genética de *T. cruzi* I e a diversidade faunística das áreas onde foram realizadas as coletas correspondentes a cada bioma. O gene *LYT1* apresentou o maior número de sítios polimórficos nos isolados de *T. cruzi* I, corroborando que ele constitui um gene recomendável para estudar variabilidade em TcI. O gênero *Didelphis* confirmou sua competência como bioacumulador da diversidade da DTU TcI de *T. cruzi*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY OF SUBPOPULATIONS OF *TRYPANOSOMA CRUZI* ISOLATED FROM THE DIDELPHIS GENUS IN BRAZIL BASED IN MULTILOCUS SEQUENCING TYPING (MLST)

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Irene Fabiola Roman Maldonado

TcI genotype is the most widespread subpopulation of *Trypanosoma cruzi* in Brazil as well as in the Americas. This is so, in terms of the number of host species as well as of its geographic distribution. Traditionally considered as homogeneous, this genotype has been shown by recent studies not to be so, since in Colombia its heterogeneity of population has already been described. This includes the so called T<sub>CDOM</sub>, which is linked to the domestic cycle in that country. In order to study the current genetic variability of *T. cruzi* I, thirty three samples isolated from species of the *Didelphis* spp genus acquired from four different biomes of Brazil were analyzed by means of phylogenetic trees using four constitutive genes and the Multilocus Sequencing Typing (MLST) technique. Species of the *Didelphis* genus are characterized by their silvatic/sinanthropic habits, for being nomads that are widely distributed across Brazil, and for being eclectic in terms of their habitats as well as their feeding; i. e. exposed to all the transmission cycles. Because of these traits and also for being one of the most ancient hosts of *T. cruzi* they were selected as the host species for analysis. Results show the existence of a micro heterogeneity in the examined isolates, where the highest diversity was observed in the Amazonia biome, and the lowest in the Caatinga biome. A correspondence between the genetic diversity of *T. cruzi* I and the faunal diversity of the areas where the corresponding captures took place. The gene LYT1 displayed the highest number of polymorphic sites in the *T. cruzi* I isolates, corroborating that it constitutes an adequate gene for studying the variability of TcI. The *Didelphis* genus confirmed its aptitude as a bioaccumulator for the diversity of the DTU TcI of *T. cruzi*.

## INDICE

<b>1. Introdução</b>	1
1.1. O parasita: <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.3. O cenário atual da Doença de Chagas	4
1.4. Heterogeneidade de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.5. Tipagem por Sequências de Multilocus	8
1.6. Ecologia das DTUs de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.5.1 DTUs <i>T cruzi</i> V e VI	9
1.5.2 DTUs <i>T cruzi</i> III e IV	10
1.5.3 DTU <i>T cruzi</i> II	11
1.5.4 DTU <i>T cruzi</i> I	11
1.5.5 Tc Bat	13
1.6 Hospederos e reservatórios	14
1.6.1 Um hospederos ancestral	14
<b>2. Justificativa</b>	21
<b>3. Objetivos</b>	23
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
<b>4. Materiais e Métodos</b>	25
4.1 Obtenção das amostras de DNA de <i>T cruzi</i> I	26
4.1.1 Amostras de DNA utilizadas para o estudo da diversidade de TcI	26
4.2 Procesamiento do DNA de <i>T cruzi</i> isolados de espécies do genero <i>Didelphis</i> spp	29
4.3 Contexto ecológico	29
4.3.1 Bioma Amazônia	30
4.3.2 Bioma Caatinga	30
4.3.3 Bioma Cerrado	31
4.3.4 Bioma Mata Atlântica	31
4.4 Criterio de escolha dos genes para a analise da Tipagem por Sequências de Multilocus (MLST)	32
4.5 Reação em Cadeia da Polimerase	32
4.6 Visualização no gel de agarose dos isolados de <i>T cruzi</i> obtidos por PCR	35
4.7 Purificação dos produtos obtidos por PCR dos isolados de <i>T cruzi</i> I	35
4.8 Sequenciamento do DNA de <i>T cruzi</i> I	36
4.9 Edição e análise das sequências obtidas	37
4.10 Caracterização dos isolados de <i>T cruzi</i> I utilizando a Tipagem por Sequências de Multilocus (MLST)	38

<b>5. Resultados</b>	39
5.1 O gênero <i>Didelphis</i> spp. como mantenedor e amplificador da diversidade de TcI	40
5.2 Contexto ecológico	40
5.3 Amplificação das amostras de DNA dos isolados mediante a técnica da PCR	41
5.4 Avaliação dos polimorfismos genéticos entre as sequências dos isolados de <i>T cruzi</i> I	44
5.4.1 Polimorfismo para o gene <i>DHFR-TS</i> e análise da árvore filogenética	44
5.4.2 Polimorfismo para o gene <i>RB19</i> e análise da árvore filogenética	47
5.4.3 Polimorfismo para o gene <i>MetIII</i> e análise da árvore filogenética	50
5.4.4 Polimorfismo para o gene <i>LYT1</i> e análise da árvore filogenética	53
5.4.5 Análise dos genes concatenados	57
5.5 Tipagem por Sequências de Multilocus	61
5.5.1 Perfis alélicos e Complexos Clonais	61
<b>6 Discussão</b>	65
6.1 Considerações sobre os aspectos do parasita de <i>T cruzi</i>	66
6.2 Diversidade de <i>T cruzi</i> I	67
6.3 O Polimorfismo de TcI encontrados em isolados de <i>T cruzi</i> I de <i>Didelphis</i> spp	69
6.4 Padrão de distribuição dos grupos de TcI a partir da análise das árvores filogenéticas e Tipagem por Sequências de Multilocus	71
<b>7. Conclusão</b>	78
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	81
<b>9. Anexos</b>	

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> e estágios de desenvolvimento no inseto vetor e no hospedeiro vertebrados	3
<b>Figura 1.2.</b> As duas hipóteses de eventos de hibridação dos Tc V e TcVI	10
<b>Figura 1.3.</b> Árvore filogenética mostrando a origen dos Didelphimorphia	15
<b>Figura 1.4</b> Distribuição das espécies do gênero <i>Didelphis</i> spp	16
<b>Figura 1.5</b> Fotografia da espécie <i>Didelphis albiventris</i>	19
<b>Figura 1.6</b> Fotografia da espécie <i>Didelphis marsupialis</i>	20
<b>Figura 1.7</b> Fotografia da espécie <i>Didelphis aurita</i>	20
<b>Figura 4.1.</b> Locais de origem dos 34 isolados de <i>T. cruzi</i> DTU TcI derivados de amostras de <i>Didelphis</i> spp	23
<b>Figura 5.1.</b> Gel de agarose que mostra a amplificação do gene Rb19	41
<b>Figura 5.2.</b> Gel de agarose que mostra a amplificação do gene Met III	41
<b>Figura 5.3.</b> Gel de agarose que mostra a amplificação do gene LYT1	42
<b>Figura 5.4.</b> Gel de agarose que mostra a amplificação do gene DHFR-TS	42
<b>Figura 5.5</b> Árvore filogenética construída com o gene <i>DHFR-TS</i>	45
<b>Figura 5.6.</b> Árvore filogenética construída com o gene <i>RB19</i>	48
<b>Figura 5.7.</b> Árvore filogenética construída com o gene <i>MetIII</i> .	51
<b>Figura 5.8.</b> Árvore filogenética construída com o gene <i>LYT1</i>	54
<b>Figura 5.9.</b> Árvore filogenética construída com os quatro genes concatenados	58
<b>Figura 5.10</b> Distribuição geográfica das DTUs de <i>Trypanosoma cruzi</i> no Brasil dos isolados pertencentes à COLTRYP	59
<b>Figura 5.11</b> Representação dos Complexos Clonais obtidos com o eBURTS	62
<b>Figura 6.1</b> Número de espécies e número de espécies exclusivas a cada bioma no Brasil	70
<b>Figura 6.2</b> Fotografia do bioma Amazônia	74
<b>Figura 6.3</b> Fotografia do bioma Cerrado	74
<b>Figura 6.4</b> Fotografia do bioma Mata Atlântica	75
<b>Figura 6.5</b> Fotografia do bioma Caatinga	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1.</b> Classificação dos genótipos do <i>Trypanosoma cruzi</i> , segundo a nomenclatura de 2009	8
<b>Tabela 4.1.</b> Amostras de DNA obtidas de isolados de <i>T cruzi</i> I de <i>Didelphis</i> spp	24
<b>Tabela 4.2.</b> Número de espécies coletadas, hemocultivo positivo e número de espécimes coletados no bioma Amazônia	26
<b>Tabela 4.3.</b> Número de espécies coletadas, hemocultivo positivo e número de espécimes coletados no bioma Caatinga	26
<b>Tabela 4.4.</b> Número de espécies coletadas, hemocultivo positivo e número de espécimes coletados no bioma Cerrado	27
<b>Tabela 4.5.</b> Número de espécies coletadas, hemocultivo positivo e número de espécimes coletados no bioma Mata Atlântica.	27
<b>Tabela 4.6.</b> Lista de genes seleccionados para a análise da Tipificação por Sequências de Multilocus (MLST)	30
<b>Tabela 5.1.</b> Representação dos sítios polimórficos observados no alinhamento do gene <i>DHFR-TS</i>	44
<b>Tabela 5.2.</b> Representação dos sítios polimórficos observados no alinhamento do gene <i>RB19</i>	47
<b>Tabela 5.3.</b> Representação dos sítios polimórficos observados no alinhamento do gene <i>MetIII</i>	50
<b>Tabela 5.4.</b> Representação dos sítios polimórficos observados no alinhamento do gene <i>LYT1</i>	53
<b>Tabela 5.5.</b> Características dos genes seleccionados das 33 amostras do estudo	55
<b>Tabela 5.6.</b> Sequências Tipo (STs) para os quatro genes seleccionados para a análise	61

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
°C	Graus Celsius
CE	Ceará
DC	Doença de Chagas
DCA	Doença de Chagas Aguda
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	dNTP dinucleotídeo trifosfato
DTU	<i>Discrete Typing Units</i> – Unidade Discreta de Tipagen
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
Kb	quilo base
Mg	Magnésio
mL	mili litro
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLMT	<i>Multilocus Microsatelite Typing</i>
MLST	<i>Multilocus Sequencing Typing</i> ou Tipificação por Sequências de Multilocus
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
µg	micro gramas
ng	nano gramas
nt	Nucleotídeo
OPAS	Organização Panamericana da Saúde
Pb	Pares de base
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PI	Piauí
<i>P. megistrus</i>	<i>Pastrongilus megistus</i>
pMol	pico mol
Q.s.p.	quantidade suficiente para

RAPD	<i>Random Amplified Polimorphic DNA</i> ou amplificação ramdômica de DNA polimórfico
RJ	Rio de Janeiro
<i>R. proxilus</i>	<i>Rodnius prolixus</i>
rRNA	Ácido Ribonucléico ribosomal
SL-IR	<i>Spliced Lider- Intergenic region</i>
ST	Sequencing Typing ou Sequência Tipo
TBE	Tris-Ácido Bórico-EDTA
<i>T cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TcI	<i>Trypanosoma cruzi I</i>
TcII	<i>Trypanosoma cruzi II</i>
TcIII	<i>Trypanosoma cruzi III</i>
TcIV	<i>Trypanosoma cruzi IV</i>
TcV	<i>Trypanosoma cruzi V</i>
TcVI	<i>Trypanosoma cruzi VI</i>
<i>T. dimidiata</i>	<i>Triatoma dimidiata</i>
UV	Luz Ultravioleta
Z	Zimodema
Z3	Zimodema 3
Z1	Zimodema 1



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O parasita : *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), é um protista flagelado da família **Tripanosomatidae** e ordem **Kinetoplastida** (Simpson *et al.*, 2006) descrito por Carlos Ribeiro Justiano das Chagas em 1909. *T. cruzi* está amplamente distribuído no continente americano desde a região sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina (Falla *et al.*, 2009). A tripanossomíase por *T. cruzi* no homem, pode resultar em uma síndrome que recebeu o nome de “doença de Chagas” em homenagem a seu descobridor. É considerada atualmente como uma doença negligenciada embora ainda seja uma importante infecção parasitária na América Latina. A tripanossomíase por *T. cruzi* caracteriza-se como uma zoonose complexa, transmitida por cerca de 130 espécies de triatomíneos vetores da família **Reduviidae**, subfamília **Triatominae** (insetos hemípteros que são exclusivamente hematófagos em todos os estágios de vida) (Yeo *et al.* 2005; PAHO, 2009; Jiménez-Coello *et al.* 2012). Inclui em seu ciclo evolutivo centenas de espécies de hospedeiros mamíferos distribuídos em oito ordens respectivamente **Artiodactilia**, **Carnívora**, **Quiróptera**, **Didelphimorphia**, **Perissodactilia**, **Primates**, **Rodentia** e **Cingulata** (Lisboa *et al.*, 2009). *T. cruzi* se caracteriza por ser generalista uma vez que é capaz de infectar em seus hospedeiros os tecidos, incluindo aí sítios pouco ortodoxos como é o caso das glândulas de cheiro de marsupiais didelfídeos. Este ecletismo de hospedeiros e habitats se expressa na complexidade dos ciclos de transmissão na natureza que podem ou não acontecer de modo independente nos diferentes estratos florestais, mesmo considerando um mesmo fragmento (Pinho *et al.*, 2000; Lisboa *et al.*, 2006).

Uma das hipóteses sugere a origem do *T. cruzi* como tendo ocorrido entre 100 e 150 milhões de anos quando da separação da América do Sul da África, tendo o parasita sido mantido há milhões de anos como uma exclusiva enzootia na fauna endêmica local, constituída basicamente por mamíferos das ordens Didelphimorphia, Cingulata e Pilosa. Foram sendo incorporadas ao ciclo de transmissão do *T. cruzi* a taxa de mamíferos que posteriormente chegaram às Américas em diferentes levadas migratórias, a saber, os roedores caviomorfos e primatas (35 ma) carnívoros (2.2 ma)

e finalmente o homem, há aproximadamente 30,000 anos ( Schofield 2000)( Briones *et al.* 1999).

## 1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida de *T. cruzi* é complexo, com quatro estágios de desenvolvimento em insetos vetores e hospedeiros mamíferos (Rassi *e.t al.*, 2010) (Figura 1.1). Das quatro formas evolutivas do *T. cruzi*, três (tripomastigota sanguícola, tripomastigota metacíclica e amastigota) são capazes de infectar e essa infecção se dá por diferentes vias (vetorial contaminativa ou oral, congênita, transfusional e por transplante de órgão), mostrando quão efetivo são os mecanismos de dispersão desse parasito (Mortara *et. al.* 2008; Fernandes *et. al.* 2012).

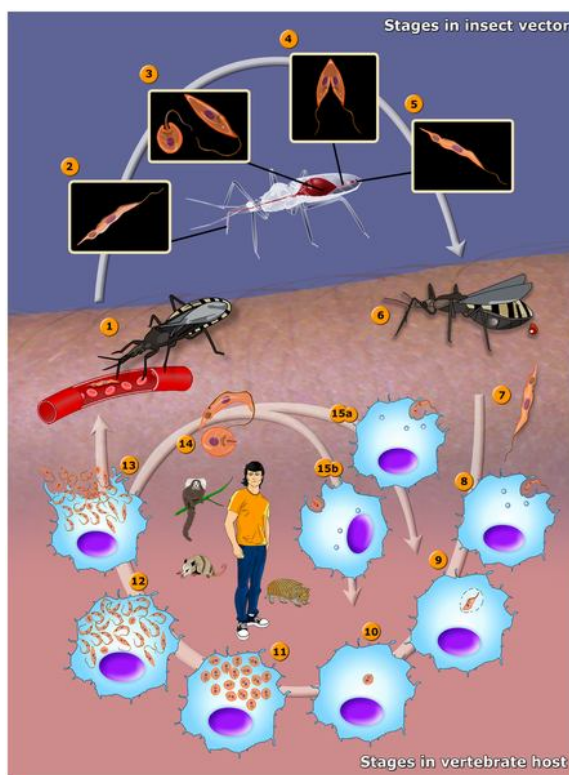


Figura 1.1 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* e estágios de desenvolvimento no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado. Teixeira *et. al.*, (2012).

A forma vetorial contaminativa, descrita como a forma clássica de transmissão do *T. cruzi* ao homem, ocorre quando o inseto vetor, ao realizar seu repasto sanguíneo, elimina formas tripomastigotas metacíclicas junto com as fezes. Esses parasitos penetram pelo local da picada ou mucosas quando a pessoa se coça ou esfrega o local da picada. No hospedeiro mamífero, esses parasitos invadem as células nucleadas de praticamente todos os tecidos, onde se diferenciam na forma multiplicativa, amastigota. A saída da célula, após nova diferenciação celular para a forma tripomastigota, se dá pelo rompimento celular que ocorre tanto na forma ativa (desencadeada pela multiplicação parasitária intra-celular) quanto passiva (desencadeada pela própria célula). A transmissão para o inseto vetor ocorre quando formas tripomastigotas circulantes no sangue do hospedeiro vertebrado são ingeridas por outro triatomíneo em um novo repasto sanguíneo. No hospedeiro invertebrado, os parasitos diferenciam-se para a forma epimastigota, que é a forma replicativa no trato digestivo do inseto vetor. Na porção final do intestino do inseto, há nova diferenciação para a forma tripomastigota metacíclica (metaciclogênese), que é a forma infectiva eliminada nas fezes do barbeiro, completando assim o ciclo do parasita (Brenner 1971; Tyler e Engman 2003; Rassi *et al.* 2009; Teixeira *et al.* 2012).

### **1.3 O cenário atual da Doença de Chagas.**

Após a bem sucedida campanha da iniciativa do cone Sul, cujo objetivo era controlar as populações intradomiciliares de *Triatoma infestans*, em 2006 o Brasil foi certificado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) como estando livre de transmissão domiciliar vetorial de *T. cruzi* por esta espécie de triatomíneos. De fato, atualmente são muito raras as notificações de ocorrência de *T. infestans* como também casos novos de infecção humana por via contaminativa. No entanto, um novo perfil da DC vem emergindo. Casos de infecção humana por via oral, por ingestão de alimentos contaminados por formas tripomastigotas metacíclicas do parasita, vêm aumentando significativamente. Como característica, esses casos são recorrentes e podem acontecer na forma de surtos e resultar em forma aguda grave com sintomatologia exuberante bastante distinta dos quadros clássicos. O caráter recorrente e sob forma de surtos de doença de Chagas aguda (DCA) acontece em vários outros países das

Américas além do Brasil , entre eles Argentina, Equador, Colômbia e Venezuela. Este novo cenário epidemiológico é completamente distinto da transmissão por via contaminativa por vetor domiciliado, com destaque para a espécie *T. infestans* (Silveira 2007 e Toso *et al.* 2011). No Brasil, esses surtos orais têm ocorrido com maior frequência na região amazônica, com destaque para o estado do Pará (Nóbrega *et al.* 2009, Monteiro *et al.* 2010 e Toso *et al.* 2011). Embora já venham ocorrendo há mais de duas décadas, medidas efetivas de controle da transmissão de *T. cruzi*, no atual cenário, ainda estão longe de ser definidas, o que sinaliza que esta zoonose deve ser analisada sob uma nova perspectiva epidemiológica, sendo infrutífero tentar adaptar à situação atual, medidas de controle utilizadas no passado.

#### **1.4 Heterogeneidade de *T. cruzi***

Chagas e Brumpt já haviam notado a heterogeneidade do *T. cruzi* (formas largas e finas). A partir daí, paralelamente com o aumento do poder resolutivo e a disponibilidade de ferramentas metodológicas, continuou-se com os estudos para determinar marcadores biológicos, bioquímicos e moleculares e realizar estudos para entender a epidemiologia da doença de Chagas (Miles *et al.* 1980; Rassi *et al.* 2010). O objetivo básico era tentar estabelecer possíveis associações entre subtipos e a doença humana, vetores e/ou hospedeiros.

Em 1974, Andrade agrupou a população de *T. cruzi* em tipos ou biodemas, I, II, III. (Andrade 1974, 1983). Essa classificação foi baseada nas diferenças nas características morfológicas e biológicas do parasita no sangue periférico de camundongos experimentalmente infectados. Toyé *et al.*, em 1974 realizou o primeiro tratado de estudo da variabilidade de subpopulações de *T. cruzi* utilizando Electroforese de Enzima Multilocus (MLEE) que é baseada na mobilidade eletroforética de um número de enzimas metabólicas de mesma função em géis de acrilamida ou amido.

Posteriormente, Miles *et al.* (1977), estudando perfis de enzimas isofuncionais (isoenzimas) de amostras de *T. cruzi* derivados de humanos e animais do Estado da Bahia, Brasil, separaram bioquimicamente pela primeira vez, duas subpopulações do parasita. O primeiro grupo denominado zimodema Z1, era procedente de ambientes silvestres; o segundo grupo, denominado zimodema Z2, foi encontrado em pacientes

com a doença de Chagas e animais domiciliados em casas infestadas pelo vetor doméstico *Pastrongylus megistus*. Os autores associaram portanto o Zimodema 1 ao ciclo silvestre e o Zimodema 2 ao ciclo domiciliar. Ainda, Miles *et al.* (1978) analisando o perfil isoenzimático de amostras de *T cruzi* de pacientes chagásicos de Belém, Pará, Brasil, encontraram um terceiro grupo de flagelados que não se adequava a nenhum dos dois zimodemas anteriormente descritos, que denominaram zimodema Z3 (Llewellyn *et al.*, 2009). Este zimodema, embora mais raro, foi também associado pelos autores ao ciclo de transmissão silvestre. Assim, foi confirmada, por meio de estudos isoenzimáticos, a heterogeneidade bioquímica do *T cruzi* e formulada uma hipótese de associação entre subpopulações e a epidemiologia da doença de Chagas.

Tybayrenc *et al.*, (1986) mediante a análise da genética de populações e por um sistema de eletroforese de 15 enzimas isofuncionais, descreveu 43 diferentes grupos isoenzimáticos entre um grupo de 121 amostras de diversos ambientes e biomas e propôs a hipótese da estrutura clonal de *T cruzi* Tibayrenc, 1990 com escassa ou ausência de recombinação genética.

O mesmo autor propôs denominar as linhagens como Unidades Discretas de Tipagem ou DTU que o autor definiu como “conjuntos que são geneticamente mais relacionados entre si do que com qualquer outro grupo, e que são identificáveis, por meio de marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos comuns” Tibayrenc 1998). Atualmente tem sido observado que fenômenos de recombinação em Kinetoplastida são muito mais frequentes do que admitido até o presente e que a heterogeneidade observada em *T. cruzi* é em parte atribuível a este fenômeno.

A amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de marcadores genéticos específicos, como o gene rRNA 24S $\alpha$  e da Região Intergênica do Gene de Mini-exon permitiu agrupar as subpopulações isoenzimáticas de *T. cruzi* em dois grandes grupos ou genótipos. Souto *et al.* 1996; Fernandes *et al.* 1999). Em uma reunião Satélite realizada na Fiocruz em 1999, um comitê de especialistas analisou o conhecimento disponível sobre a variabilidade genética de *T cruzi*, propondo uma unificação da nomenclatura. Assim foram propostos dois grupos principais: *T cruzi I* e *T. cruzi II* Anonymous, 1999) . Ainda assim, permanecia como Z3 um grupo de subpopulações de *T. cruzi* que não se encaixava em nenhum dos dois genótipos

propostos por Fernandes *et al.*, (1999). A classificação de grupos híbridos e grupos equivalentes a zimodemas 3 (Miles *et al.*, 1978, 1981) e Biodema Tipo I (Andrade 1974) seria decidida mais tarde, após estudos posteriores (Zingales *et al.*, 2009).

Posteriormente, a comunidade científica avançou no conhecimento da diversidade do *T. cruzi* e retomou-se a nomenclatura proposta por Tibayrenc (Unidade Discreta de Tipagem) para denominar dois grandes grupos nos quais foi incluída a maioria das subpopulações de *T. cruzi* – respectivamente as DTUs I e II. Esta última, por sua vez, foi subdividida em cinco subgrupos, Ila-e, com base em informações filogenéticas de MLEE e marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). As DTUs I e IIb corresponderam, respectivamente, a *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. (2000 Brisse *et al.*, 2001)

Atualmente dois grupos de pesquisa reconheceram quatro subdivisões em isolados de DTU I, embora estes não tenham sido integrados à revisão da nomenclatura. (Herrera *et al.* De 2007, Falla *et al.* 2009)

Um consenso realizado em 2009 modificou a nomenclatura dos genótipos de *T. cruzi*, em seis Unidades Discretas de Tipagem (DTUs), conforme Tabela 1.1 (Zingales *et al.*, 2009, 2012).

Recentemente tem sido proposta a análise de microssatélites (unidades de repetição de pares de base de DNA que apresentam taxas de mutação mais altas) como uma ferramenta efetiva no esclarecimento da estrutura genética de *T. cruzi*. Llewellyn *et al.* (2009) realizaram uma análise genética por Tipagem com Microssatélites (MLMT) de 135 amostras de *T. cruzi* e concluíram que as populações de TCI derivadas de animais silvestres das Américas do Norte, Central e do Sul, apresentavam expressiva diversidade além de estruturação espacial em nível continental. (Llewellyn *et al.*, 2009, Ramírez *et al.*, 2011)

**Tabela 1.1. Classificação dos genótipos do *Trypanosoma cruzi*, segundo a nomenclatura de 2009 (Zingales *et. al*, 2009).**

DTU	Abreviação	Nomenclatura anterior
T. cruzi I	TcI	DTU I
T. cruzi II	TcII	DTU IIb
T. cruzi III	TcIII	DTU IIc
T. cruzi IV	TcIV	DTU IIa
T. cruzi V	TcV	DTU II d
T. cruzi VI	TcVI	DTU II e

### 1.5 Tipagem por Sequências de Multilocus ou *Multilocus Sequencing Typing*.

Uma das técnicas recentes realizadas para o estudo de variabilidade genética das populações de *T. cruzi* é a Tipificação de Sequências Multilocus ou *Multilocus Sequencing Typing* (MLST) (Maiden *et al.*, 1998). O esquema de MLST foi desenvolvido originalmente para a análise da diversidade genética de populações de bactérias (Dingle *et al.*, 2001; Enright *et al.*, 2000; Nallapareddy *et al.*, 2002), Posteriormente foi usado para a tipagem de organismos diplóides como *Candida spp* (Robles *et al.*, 2004), *Apergillus fumigatus* (Bain *et al.*, 2007) complexos de espécies *Fusarium solani* (Debourgogne *et al.*, 2010) *Leishmania spp.* (Mauricio *et al.*, 2006) e *Trypanosoma cruzi* (Yeo *et al.*, 2011; Lauthier *et al.*, 2012) entre outros. O MLST avalia a variação genética de fragmentos internos de genes constitutivos. Diferentes sequências de cada locus são consideradas como distintos alelos. A combinação de alelos de vários loci gera um perfil de alelos para cada cepa (também denominado ST ou Sequência Tipo) (Tomasini *et al.*, 2013). As sequências para todos os loci são usualmente concatenadas para produzir um único perfil alélico. É citada como sendo a maior vantagem da análise por MLST, uma vez que os dados das sequências são inequívocos e adequados para estudos da epidemiologia e estrutura das populações. Os resultados são descritos como sendo objetivos, claros e facilmente acessíveis,



podendo-se formar uma base de dados internacional construída como *MLST.net*. A metodologia de MLST está sendo aplicada por alguns autores no estudo da diversidade e estrutura genética de *T. cruzi*. Assim, Yeo *et al* (2011) utilizaram 9 genes constitutivos para avaliar a diversidade das DTUs de diversos isolados de *T. cruzi*; Lauthier *et al* (2012) utilizaram 10 genes constitutivos e, recentemente, Ramirez *et al* (2013) utilizou 13 genes constitutivos para analisar a variabilidades do TcI na Colômbia

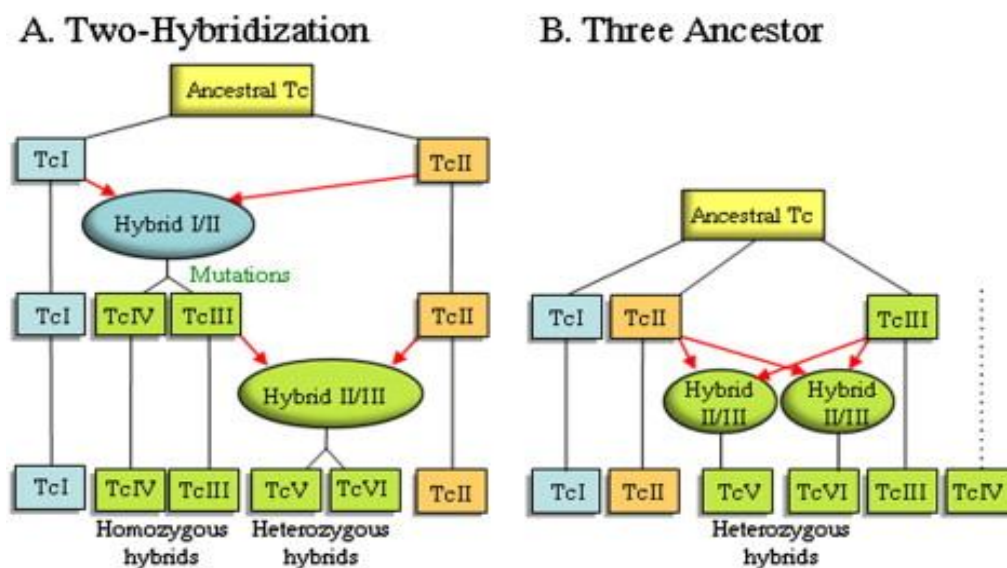
## 1.6 Ecologia das DTUs de *Trypanosoma cruzi*

Embora a existência de associação entre as 6 DTUs de *T. cruzi* com as diferentes formas de infecção humana, espécies vetoras e hospedeiros mamíferos, que vem sendo proposta por vários autores, a ecologia das DTUs na natureza está longe de um esclarecimento. Na medida em que amostras mais representativas, provenientes de espécies de mamíferos e vetores de diversos habitats e biomas são estudadas, as clássicas propostas de associação entre subpopulações de *T. cruzi* espécies hospedeiras, doença humana, distribuição geográfica vêm sendo revistas. Além disso, o aumento do poder resolutivo das ferramentas utilizadas para a análise mostra que a complexidade dos ciclos de transmissão é muito maior do que reconhecido até aqui e que são vários os aspectos das estratégias de dispersão das DTUs e a sua interação com cada espécie de hospedeiro mamífero e triatomíneo vetor que ainda não são compreendidos .

### 1.6.1 DTUs *Tcruzi V e VI*

São propostas duas hipóteses para explicar a origem dos DTUs híbridos; o modelo “*Two Hybridization model*” e o modelo “*Three Ancestor*” . No modelo de “*Three Ancestor*” dois eventos de intercâmbio genético recente entre TcII e TcIII resultam em TcV e TcVI. O modelo de “*Two Hybridization model*” propõe um antigo evento de troca genética entre TcI e Tc II, com perda de heterozigosidade entre progênie para produzir TcIII e TcIV, seguido por um segundo a mais recente evento de hibridização entre TC II e TcIII para produzir tanto TCV e TcVI. (Fig 1.1) (Zingales *et. al.*, 2012)

Os hospedeiros silvestres DTUs das híbridas TcV e TcVI, são pouco conhecidos e foi proposto que estão associados ao ciclo doméstico, circulando predominantemente no sul do Brasil e associadas à transmissão congênita de *T. cruzi* em humanos (Zingales *et al* 2012). No entanto, Araujo *et al* (2011) genotipou como TcV um isolado proveniente de *Thrichomys laurentius* do Piauí, no bioma Caatinga.



**Figura 1.2** Comparação entre os modelos (A) *Two-hibridação* e (B) *Three Ancestor* explicando os papéis de intercâmbio genético durante a evolução clonal de *T. cruzi*. Figura: Zingales *et al* (2012)

:

### 1.6.2 DTU TcIII e TcIV

As DTUs TcIII e TcIV (anteriormente Z3) também são pouco conhecidas em relação a sua distribuição na natureza. Atualmente são descritos como sendo quase exclusivamente associados a hospedeiros silvestres. Os ciclos de transmissão para essas DTUs ocorrem mais restritamente, embora já tenham sido observados em surtos orais por estas DTUs na Amazônia (Monteiro *et al.* 2012). No caso do DTU TcIII é associado classicamente ao bioma Amazônia, embora venha demonstrando uma distribuição mais ampla no Brasil. (Lisboa *et al* 2009). O DTU TcIV é descrito nas regiões Norte e Nordeste brasileiras (Zingales *et al* 2012).

### 1.6.3 DTU *T cruzi* II

A DTU TcII foi classicamente associada à infecção humana e ao assim denominado, ciclo doméstico de transmissão. De acordo com a sua distribuição conhecida até o momento, é proposto que a DTU TcII predomina abaixo da Bacia Amazônica e foi responsável pela grande maioria dos casos humanos nas antigas áreas endêmicas do país (Zingales *et al.* 2012). No entanto, o encontro de animais silvestres infectados por esta DTU tem sido cada vez mais frequente, confirmando que muitos aspectos da ecologia das DTUs ainda são desconhecidos. O encontro cada vez mais frequente de TcII em animais silvestres não chega a ser surpreendente, uma vez que *Trypanosoma cruzi* é primariamente uma enzootia silvestre e é uma cepa parental, cuja separação de TcI precede em muito a entrada do homem nas Américas. Foi também observado que a DTU TcII além de um amplo espectro de hospedeiros, ocorre em ciclos de transmissão focais em vários biomas (Lisboa *et al.* 2006, 2008, Rocha *et al.* 2013). Este genótipo é o segundo mais frequente na natureza, porém aparentemente em ciclos de transmissão mais focais (Fernandes *et al.* 1998; Jansen *et al.* 1999; Miles *et al.* 2003; Rassi *et al.* 2010; Zingales *et al.* 2012).

### 1.6.4 DTU *T cruzi* I

A DTU TcI corresponde ao genótipo descrito como o mais abundante e mais amplamente disperso de todos os DTUs de *T. cruzi* nas Américas. Ele pode ser encontrado em toda a gama de distribuição de triatomíneos vetores e foi descrito que pode estar associado com os ciclos silvestres e domésticos na região acima da Amazonia. A literatura revelou 52 gêneros de mamíferos infetados naturalmente com *T. cruzi* I, incluídos em representantes de todas as ordens de mamíferos de ocorrência de *T. cruzi* Didelphimorphia, Rodentia, Primata, Chiróptera, Cingulata, Pilosa, Carnivora e Artiodactyla em ordem de abundancia bem como os principais gêneros de triatomíneos (Llewellyn M., dados não publicados até o 2010).

Durante algumas décadas, TcI foi considerado como um grupo bastante homogêneo e o primeiro reconhecimento da heterogeneidade de TcI foi proposto por Tibayrenc *et al.* (1986). Estes autores utilizaram como ferramenta a análise do perfil eletroforético de enzimas isofuncionais (isoenzimas), que permitiu a discriminação de onde 25 genótipos em TcI, um número muito mais baixo em comparação com as demais DTUs. Os primeiros trabalhos que observaram a heterogeneidade genética em TcI foram realizados na Colômbia, em isolados de humanos, hospedeiros mamíferos e vetores utilizando como alvo a região intergênica do gene mini-exon (Fernandez *et al* 1998). O gene mini-exon está relacionado com eventos pós-transcricionais como o processamento do mRNA e foi proposto como um importante alvo devido a sua participação essencial no mecanismo de controle da expressão diferencial de proteínas, sendo ele altamente variável nas populações de *T. cruzi*. (Tomas *et al* 2005). Herrera *et al* (2007) propuseram quatro haplótipos no grupo *T. cruzi* I utilizando a região intergênica do gene mini-exon: o haplótipo Ia, relacionado com infecções humanas e em *Rhodnius prolixus* domiciliados; Ib e Ic correspondente ao ciclo peridoméstico, e associado a *Triatoma dimidiata* para Ib; e o haplótipo Id, associado ao ciclo silvestre de isolados de *T. cruzi*. Mais tarde, Falla *et al* (2009) do mesmo grupo de pesquisa confirmaram os haplótipos de TcI da Colômbia, mas não encontraram o haplótipo Ic, e classificaram em três grupos: Ia, relacionado ao ciclo doméstico, incluindo isolados humanos e espécies vetoras domiciliados; Ib, relacionado ao ciclo peridoméstico relacionado a humanos, vetores (*T. dimidiata*) e animais domésticos reservatórios (*Canis familiaris*); Id relacionado às populações silvestres de *R. prolixus* capturados em palmeiras (*Althalea butyracea*) e reservatórios silvestres (*Didelphis marsupialis* e roedores não identificados) (Falla *et al* 2009; Herrera *et al* 2009). Ramirez *et al* (2012) estudando isolados de *T. cruzi* descreveram um novo genótipo Tcle associado ao ciclo doméstico no Chile e no ciclo silvestre na Bolívia. De acordo ao proposto por Ramirez *et al* (2011) tem sido confirmada a variabilidade intra TcI e propôs um novo genótipo que denominou TcI<sub>DOM</sub> (anteriormente TcIa / VEN<sub>DOM</sub>) e que foi associado ao ciclo de transmissão doméstico.

Com o objetivo continuar a análise dos subgrupos observados na DTU TcI, Ramirez *et al.*, 2013 utilizando um conjunto de 13 genes constitutivos analisou isolados

de *T. cruzi* I mediante a técnica de MLST. Os resultados mostraram a existência de dois grupos separados correspondentes a isolados obtidos de humanos e, triatomíneos e hospedeiros mamíferos, onde o primeiro grupo corresponderia ao genótipo TcI<sub>DOM</sub>, obtido de amostras isoladas de pacientes com fenótipos clinicamente diferentes.

Esta subdivisão intra TcI ainda é assunto controverso e , alguns autores sugeriram desenvolver estudos mais aprofundados para evitar realizar agrupamentos artificiais (Tomasini *et al.*, 2011; Herrera *et al.*, 2007; Cura *et al.*, 2010. Tomasini *et al.* (2011) realizaram uma análise de isolados e clones de TcI mediante o sequenciamento do gene mini-exon detectando múltiplos alinhamentos ambíguos na região microsatélite desse gene, afetando a topologia da árvore. Considerando que existem múltiplas cópias do gene mini-exon e que possuem arranjos em tandem, o SL-IR deve considerar-se ao alvo SL-IR com cuidado para evitar forçar agrupamentos intra-DTU I só porque é observada diversidade.

### 1.6.5 Tc Bat

Considerando ser a tripanossomíase americana por *T. cruzi* primariamente uma enzootia silvestre que inclui qualquer espécie de hospedeiro mamífero, muito provavelmente, os grupos de subpopulações do parasita hoje descritas, não contemplam todo o universo de subpopulações *T. cruzi*. Essa lacuna no conhecimento se deve às dificuldades do trabalho com amostras de animais silvestres representativas da diversidade faunística dos principais biomas, o que resulta em subamostragens do parasita. De fato, recentemente foi descrito um grupo de isolados de *T. cruzi* restritos à ordem Chiroptera e totalmente distintos das demais DTUs. Os autores (Marcilli *et al.*, 2009; Cavazzana *et al.*, 2010) denominaram este grupo TcBat, e uma caracterização definitiva provavelmente vai ratificar o sétimo grupo de DTU: TcVII.

## 1.7 Hospedeiros e reservatórios

Desde a descrição de Carlos Chagas de “ *Tatusia novemcinctus* – depositário do *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909 ) “ (sic) o conceito de que é um reservatório vem mudando bastante nas últimas décadas . De fato, definir o que

constitui um hospedeiro reservatório ainda é um desafio tanto em relação ao marco teórico quanto empírico.

De acordo com Ashford (1997), considera-se reservatório como “a espécie, ou conjunto de espécies, capaz de manter uma determinada espécie de parasita na natureza, em um espaço de tempo suficiente de ser transmitido ao vetor, em um determinado recorte tempo-espacial. “A importância de uma determinada espécie de mamífero na manutenção de um determinado táxon parasitário depende de suas (i) estratégias de vida e ciclos reprodutivos, (ii) habitat natural e mudanças climáticas anuais, (iii) peculiaridades inerentes àquele sistema hospedeiro-parasita (ABDUSSALAM, 1959 e Ashford, 1997). O papel de cada espécie de hospedeiro na transmissão de uma espécie de parasita varia no tempo, no espaço e é modulada por sua abundância relativa, demografia populacional, composição da comunidade, de espécies do local, suas características comportamentais e fisionomia da paisagem onde se encontram (Noireau *et al.* 2009; Mas Coma S. 2008)

### **1.7.1 Um hospedeiro ancestral : *Didelphis spp* , marsupial da família Didelphidae**

A ordem Didelphimorphia é a única ordem de marsupiais existentes no continente Americano. Sua extrema adaptabilidade a diferentes nichos, inclusive ambientes degradados pelo homem, resulta na ampla distribuição dos representantes desta ordem.

Estima-se a origem dos marsupiais tendo ocorrido há 100 milhões de anos no novo mundo. Didelphoidea é o táxon considerado a mais antigo e que sobreviveu até o presente (Figuras 1.2) (Seven Austad 1988).

A família Didelphidae conta, atualmente, com mais de 70 espécies distribuídas pelas Américas. O gênero *Didelphis*, é um dos gêneros de mamíferos de maior distribuição nas Américas, sendo encontrado desde o Canadá até a Argentina. *Didelphis spp* inclui quatro espécies: *D. marsupialis*, *D. aurita*, *D. albiventris* e *D. virginiana* , esta última encontrada apenas nos Estados Unidos.(Figuras 1.4, 1.5, 1.6) (Cerqueira e Lemos, 2000)

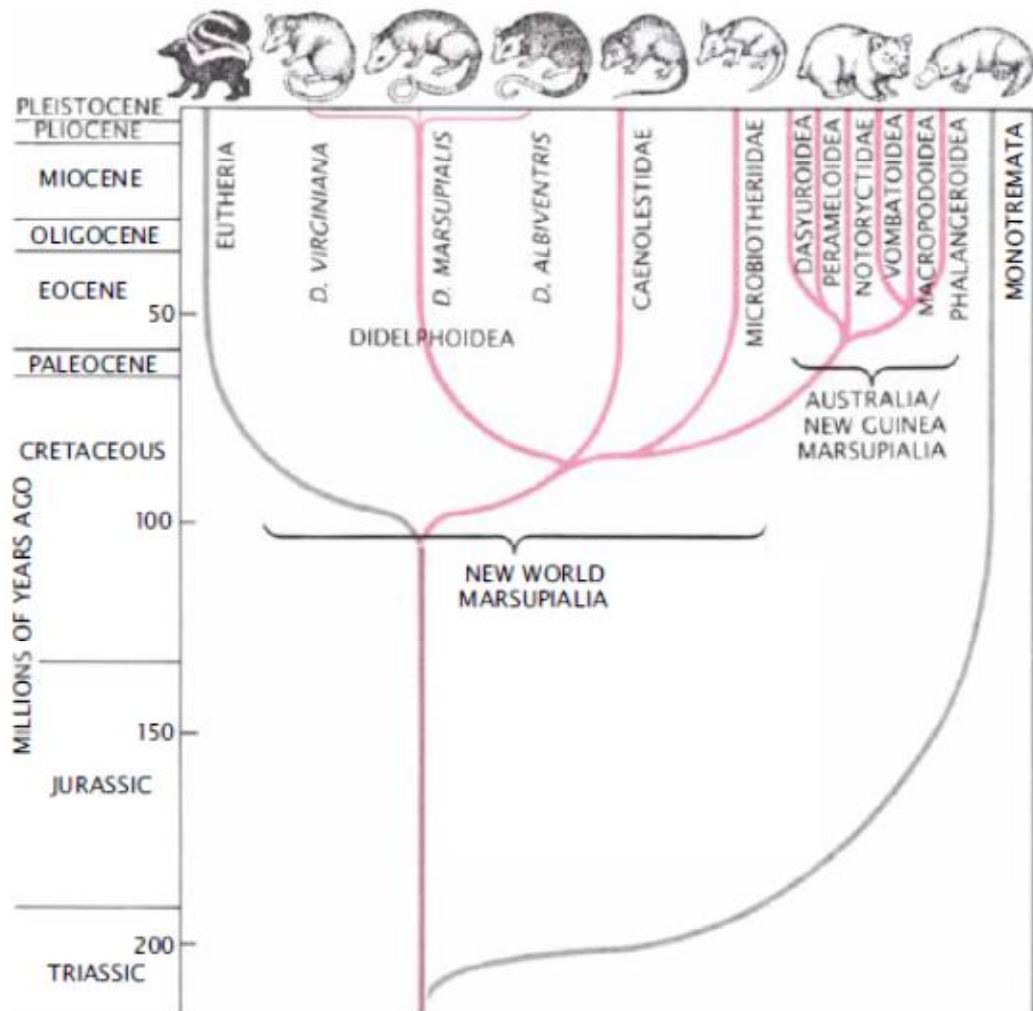
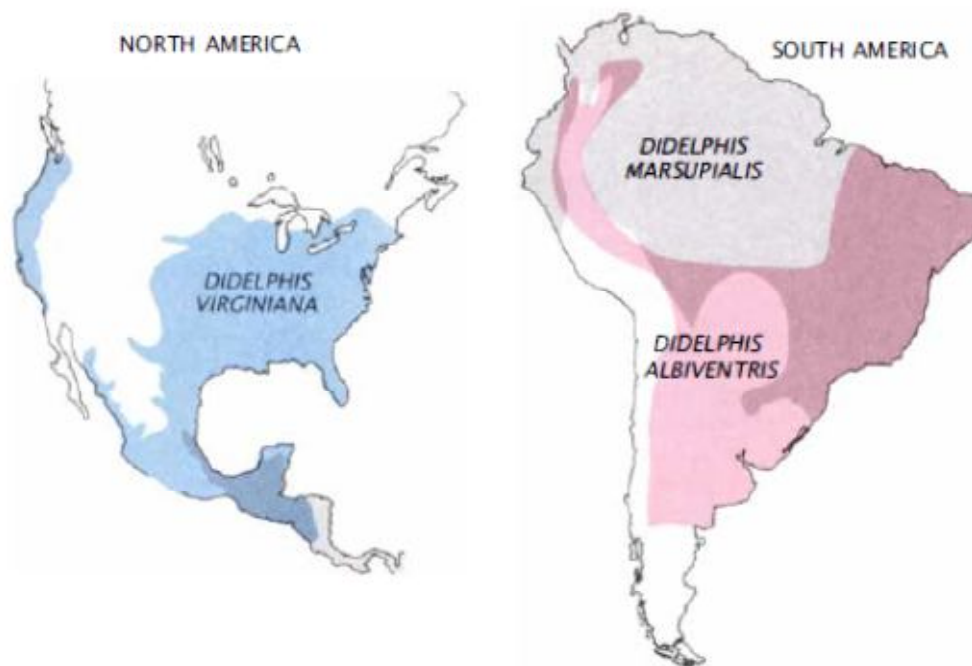


Figura 1.3 Arvore filogenética que mostra a data da origem de Marsupialia. (Austad et al 1988)



**Figura 1.4 .Distribuição das espécies do *Didelphis* spp nas Américas baseada na classificação de Steven Austad 1988.**

O gênero *Didelphis* pode ser encontrado em praticamente todos os habitats de todos os biomas brasileiros (Cerqueira and Lemos 2000). Embora vários autores tenham proposto e relatado outras classificações para o gênero *Didelphis*, para nosso estudo foram utilizadas as classificações de Steven Austad 1988 que considera três espécies *D. virginiana*, *d. marsupialis* *D. albiventris* e Rui Cerqueira, que inclui uma quarta espécie *Didelphis aurita*. (Figura 1.3) (Cerqueira R. et al., 2000).

São considerados mamíferos muito bem sucedidos, verdadeiros fósseis vivos cuja morfologia atual não difere significativamente da dos fósseis mais antigos, datados de 55 MA (Austad, 1988)

A espécie *D. marsupialis* está distribuída desde o México até a região amazônica (inclusive ). *D. albiventris* é encontrado na região central da América do Sul, da Colômbia e ao norte da Argentina. No Brasil, é encontrado no Nordeste, Centro-Oeste e Região Sul. *Didelphis aurita* é encontrado basicamente na Região Sudeste do Brasil. Pode ser encontrado em simpatria com *D.aurita* na Região Sul do Brasil.



O primeiro caso de infecção natural por *T. cruzi* em marsupiais foi reportado por Robertson (1929) em *D. marsupialis*. Vários estudos confirmaram a importância deste reservatório mostrando níveis de infecção natural que vão de 17% a 100% (Rodrigues & Melo, 1942, Guimarães & Jansen, 1943, Jansen *et al* 1999). Em vários habitats parecem ser excelentes reservatórios deste parasita, uma vez que apresentam alta abundância relativa e competência infectiva, como expresso por hemoculturas positivas (Roque *et al.* 2008). Adicionalmente, parasitemias de *Didelphis aurita* naturalmente infectados por *T. cruzi* são estáveis como demonstrado por altas prevalências de hemocultivo positivo durante um tempo de acompanhamento que chegou a um ano (Jansen *et al* 1999). Estes marsupiais são capazes de controlar a parasitemia por *T. cruzi* a níveis subpatentes desde muito jovens, ainda dependentes do marsúpio (aproximadamente 50 dias de idade) (Jansen *et al* 1999). Vale mencionar que as lesões tissulares nos animais experimentalmente infectados são bastante brandas, caracterizando-se por infiltrados de células mononucleares. Animais naturalmente infectados tendem a apresentar lesões mais severas provavelmente em função de infecções concomitantes com outros taxa parasitários e mesmo por diferentes DTUs de *T. cruzi*.

Marsupiais da família Didelphidae, são citados como alguns dos principais e mais antigos reservatórios de *T. cruzi*. O gênero *Didelphis* é o único táxon de mamífero capaz de manter os dois ciclos de multiplicação de *T. cruzi*, tanto em condições naturais como experimentais. Na luz da glândula de cheiro, o parasita pode se multiplicar na forma epimastigota e se diferenciar a tripomastigota metacíclico, podendo o animal ter o papel tanto como reservatório como vetor. (Deane *et al* 1984). Embora vários foram os relatos sobre a possível presença de *T. cruzi* na glândula de cheiro naturalmente infectados, a capacidade vetorial é desconhecida.

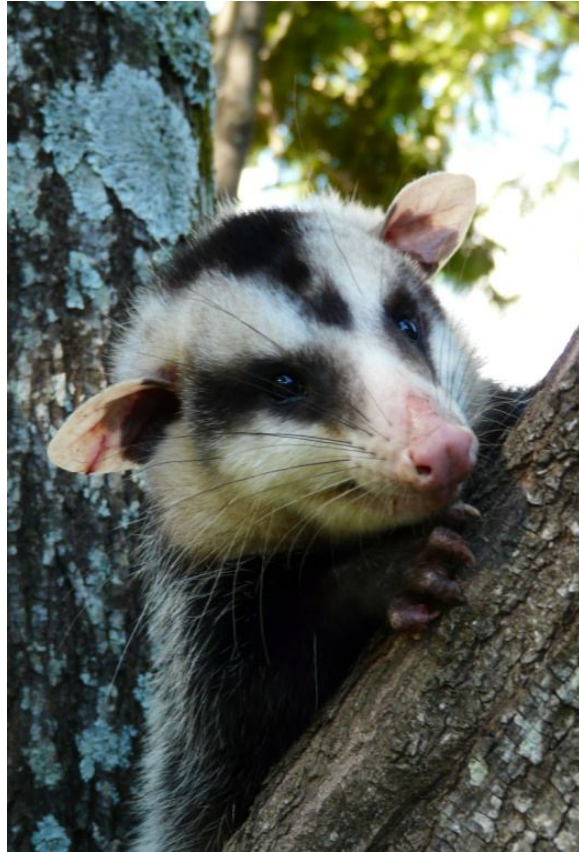
A importância epidemiológica desses mamíferos é incrementada devido a que os mesmos são reconhecidos animais sinantrópicos e podem se aproximar dos domicílios das pessoas, atuando como união entre ciclos de transmissão silvestre e áreas peridomésticas (Roque *et al* 2008)

As espécies do gênero *Didelphis* sp possuem hábitos generalistas e são tolerantes aos ambientes degradados pelo homem. São solitários e noturnos, com uma dieta muito ampla sendo eles oportunistas (Brito *et al.*, 2008). Ocorrem em áreas com características ambientais distintas, em relação ao regime de chuvas, umidade, balanço hídrico e temperatura. (Cerqueira, 1985) Embora seja considerada uma espécie silvestre, como foi dito, frequente e mesmo coloniza domicílios do homem podendo atuar como vínculo entre os ciclos silvestres e domésticos, (Pinho *et al.*, 2000)

Os *Didelphis* spp apresentam hábitos noturnos e passam o dia dormindo em abrigos naturais ou artificiais (Nowark Ronald M., 1991). Através da sua presença em grande variedade de habitats e adaptabilidade a áreas perturbadas, manifestam a capacidade de conviver com os impactos ambientais causados pela exploração humana dos espaços naturais. São encontrados com frequência no solo, sendo considerados semi-terrestres, considerados oportunistas, ágeis e habilidosos. Os Didelfídeos, principalmente os machos, são nômades e solitários e apresentam uma expressiva área de vida. Exploram todos os estratos florestais, o que significa que estão expostos a todos os ciclos de transmissão do *T. cruzi*.

Gambás do gênero *Didelphis* spp são classicamente associados a DTU TcI de *T. cruzi*. Isto porque é de fato a DTU mais frequentemente isolada desta espécie. TcI excetuando-se algumas situações enzooticas peculiares é a DTU mais frequentemente isolada na natureza não apenas de *Didelphis* spp, mas também dos demais mamíferos silvestres.

Considerando as características ecológicas de gambás do gênero *Didelphis* spp, a antiguidade de sua interação com *Trypanosoma cruzi*, suas altas taxas de infecção e sua expressiva competência infectiva, decidimos avaliar a heterogeneidade de isolados DTU TcI derivados desta espécie de mamífero, hipotetizando atuar o gênero *Didelphis* spp como bioacumulador da diversidade de TCI .



**Figura 1.5 *Didelphis albiventris*.**

**Foto: Ana Maria Jansen**



**Figura 1.6 *Didelphis marsupialis***

Foto: ©[Steve Creek Outdoors](#)



**Figura 1.7 *Didelphis aurita***

Foto: Leonardo Machado (2011)

## **2. JUSTIFICATIVA**

O genótipo TcI é a subpopulação do *Trypanosma cruzi* mais amplamente distribuída de no Brasil, em relação ao número de espécies hospedeiras quanto a sua distribuição geográfica. No Brasil, pouco se sabe sobre a variabilidade genética de TcI, pois a atenção foi sempre mais focada no estudo do genótipo Tc II que é considerado o principal responsável pela infecção e doença humana. No entanto na Amazônia, onde a doença de Chagas é emergente e onde a infecção humana ocorre na forma de surtos por ingestão de alimentos contaminados com as formas metacíclicas (ou mais raramente casos esporádicos por via contaminativa), TcI é o genótipo mais prevalente. Clasicamente considerando como sendo homogêneo, estudos mais recentes vem demonstrando o contrario na medida em que na Colômbia já se descreveo a heterogeneidade desta população. Assim, foram descritos 4 haplotipos de *T. cruzi* I, inclusive un genotipo que recebeu a denominação *T. cruzi* dom porque foi relacionado ao ciclo doméstico naquele pais. No Brasil nada se conhece ainda sobre a heterogeneidade genética desta subpopulação do *T. cruzi*.

As espécies do genero *Didelphis* são considerados os mais antigos hospedeiros reservatórios de T cruzi. São espécies silvestres/sinantrópicas nomades e amplamente distribuídos por todos os biomas do Brasil. São animais ecléticos tanto em relação aos habitats que podem ocupar quando a alimentação; apresentam uma ampla competencia para se adaptar aos ambientes degradados pelo homem e são clasicamente associados ao genotipo Tc I de *T. cruzi*. Esse conjunto de características sugere ser essa espécie de marsupial um possivel bioacumulador das subpopulações de Tc I caso elas existam. Assim sendo uma eventual correlação dos perfis genéticos de Tc I com os ambientes no Brasil, ira se refletir nos isolados obtidos de Tc I dessa espécie de marsupial.

## **3. OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo geral**

Verificar a variabilidade genética das populações de *Trypanosoma cruzi* I isoladas de amostras de marsupiais do gênero *Didelphis* pertencentes a quatro biomas do Brasil.

## **2.2. Objetivos Específicos**

Avaliar:

- O poder de discriminação intra DTU de quatro genes constitutivos de isolados de *T. cruzi*.
- O padrão de dispersão no Brasil dos grupos polimórficos do genótipo TcI nos diferentes habitats estudados.
- Se existe associação entre diversidade de *T. cruzi* I e diversidade faunística das áreas de coleta. .



# **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 Obtenção das amostras de DNA de *T cruzi*

Neste estudo foram selecionadas um total de 34 amostras de DNA de *Trypanosoma cruzi* I (Tcl) disponíveis como parte da Coleção de Trypanosomas de mamíferos silvestres, domésticos e vetores (**CoITryp**) do Laboratório de de Biologia de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (**Tabela 4.1**).

As amostras de DNA dos parasitas correspondem a isolados derivados de mamíferos de origem silvestre e sinantrópica do gênero *Didelphis* spp. As espécies do gênero *Didelphis* spp. foram capturadas em diferentes localidades de quatro biomas do Brasil: Mata Atlântica, Amazônia, Cerrado e Caatinga (**Figura 4.1**) e correspondem as espécies *Didelphis aurita*, *Didelphis marsupialis* e *Didelphis albiventris*.

#### 4.1.1 Amostras de DNA utilizadas para o estudo de diversidade de Tcl

O DNA de Tcl utilizado neste trabalho foi obtido e caracterizado previamente pela CoITryp, pela Reação em cadeia da Polimerase PCR-multiplex (gene Mini-Exon), seguindo o protocolo de Fernandez *et. al.*, (1998) como abaixo explicado.

A massa celular de parasitas foi a partir de cultivo axênico dos isolados de *T cruzi* I estocada em freezer a  $-20^{\circ}$  C e devidamente etiquetados. Posteriormente foi retirada do freezer para a realização da extração de DNA genômico pela técnica de Fenol/Cloroformio. Uma vez extraído o DNA genômico do parasita foi guardado na geladeira adicionando o tampão Tris 10nM EDTA 1mM (TE) por dois dias. O DNA utilizado estava estocado a  $-20$  por no máximo quatro anos.



FIGURA 4.1 Locais da origem dos 34 isolados de *T. cruzi* DTU TcI derivados de amostras de mamíferos da espécie *Didelphis*. São mostradas na figura o número total de amostras (n) de DNA de TcI selecionadas por bioma.

Tabela 4.1 Amostras de DNA de *T. cruzi* I isoladas de *Didelphis* spp utilizadas no estudo da variabilidade genética de *T. cruzi* I. São indicadas as espécies do genero *Didelphis* spp onde foi obtido o isolado. Cada amostra é indicada pelo código correspondente no banco de dados da ColTryp

ID	Gênero	Espécie	Estado	Bioma
D7	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	RJ	Mata Atlântica
G05	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	RJ	Mata Atlântica
G15	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	RJ	Mata Atlântica
G45	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	RJ	Mata Atlântica
LBCE G41	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	RJ	Mata Atlântica
762	<i>Didelphis</i>	<i>sp</i>	RJ	Mata Atlântica
LBCE 7313	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	SC	Mata Atlântica
LBCE 7301	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	SC	Mata Atlântica
D8	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	RJ	Mata Atlântica
LBCE 10285	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	PA	Amazônia
LBCE 12640	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	PA	Amazônia
LBCE 10272	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	PA	Amazônia
LBCE 12625	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	PA	Amazônia
LBCE 10290	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	PA	Amazônia
LBCE 6737	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	PA	Amazônia
LBCE 12628	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	PA	Amazônia
LBCE 12964	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	PA	Amazônia
LBCE 12667	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	PA	Amazônia
LBCE 12668	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	PA	Amazônia
LBCE 6716	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	PA	Amazônia
LBCE 8648	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	CE	Caatinga
LBCE 8622	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	CE	Caatinga
LBCE 11639	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	CE	Caatinga
M3	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	PI	Caatinga
LBCE 6824	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	CE	Caatinga
LBCE 3510	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	CE	Caatinga
LBCE 6812	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	CE	Caatinga
LBCE 6813	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	CE	Caatinga
M1	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	PI	Caatinga
LBCE 10171	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	PI	Caatinga
LBCE 9149	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	GO	Cerrado
LBCE 9425	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	GO	Cerrado
LBCE 8552	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	GO	Cerrado
LBCE 5574	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	MG	Cerrado

## **4.2 Procesamento do DNA de *T. cruzi* I isolados de especies do genero *Didelphis*.**

As amostras de DNAs de Tci foram descongeladas aliquotando-se um total de 50 µL de cada amostra em tubos de 2.5 ml. E foram mantidas a -20. Foi realizada a dosagem do DNA utilizado o Espectofotômetro (*Eppendorf® BioPhotometer*), para assim preparar o protocolo de Amplificação em Cadeia da Polimerase (PCR). utilizando um total de 50ng.de cada amostra.

## **4.3 Contexto ecológico**

Para a análise do cenario ecológico foi realizado um levantamento das informações dos livros de registro da ColTryp considerando as seguintes variáveis: area de estudo, número de espécimens capturados, riqueza faunística e a taxa de animais com hemocultura positiva para *T cruzi* .

### 4.3.1 Amazônia

As amostras resultaram de um total de quatro viagens num período de 5 anos, que incluíam áreas com surto e sem surto de *T. cruzi*. No bioma Amazônia foram examinados um total de 98 espécimens das ordens Rodentia, Didelphimorphia, Quiróptera e Cingulata. (Tabela 4.2)

**Tabela 4.2. Especímenes procedentes do bioma Amazonia e número de Hemocultivos positivos (H+). O número total de *Didelphis marsupialis* utilizados no estudo da variabilidade genética foi de 11.**

Ordem	Espécie	Nº de espécimes examinados	H+ Total
Rodentia		50	3
Didelphimorphia		20	7
	<i>D. marsupialis</i>	18	16
Quiróptera		9	3
Cingulata		1	1
<b>Total</b>		<b>98</b>	<b>30</b>

### 4.3.2 Caatinga

As amostras do bioma Caatinga resultaram de um total de 5 viagens num período de 7 anos. Foram examinados um total de 176 espécimes das ordens Rodentia e Didelphimorphia (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3. Especímenes procedentes do bioma Caatinga e número de Hemocultivos positivos (H+). O número total de *Didelphis albiventris* utilizados no estudo da variabilidade genética foi de 10.**

Ordem	Espécie	Nº de espécimes examinados	H+ Total
Rodentia		120	33
Didelphimorphia		2	-
	<i>D. albiventris</i>	51	34
<b>Total</b>		<b>173</b>	<b>67</b>

### 4.3.3 Cerrado

As amostras do bioma Cerrado resultaram de um total de 3 viagens realizadas num período de 3 anos. Foram examinados um total de 197 espécimens correspondentes às ordens Rodentia, Didelphimorphia e Quiróptera. (Tabela 4.4)

Tabela 4.4 Especímenes procedentes do bioma Cerrado e número de Hemocultivos positivos (H+). O número total de *Didelphis sp* utilizados no estudo da variabilidade genética foi de 4.

Ordem	Espécie	Nº de especímenes examinados	H+ Total
Rodentia		64	2
Didelphimorphia		38	-
	<i>D. albiventris</i>	16	4
	<i>D. aurita</i>	14	2
Quiróptera		3	0
Outras espécies		-	-
<b>Total</b>		<b>135</b>	<b>8</b>

### 4.3.4 Mata Atlântica

As amostras do bioma Mata Atlântica resultaram de um total de 4 viagens num período de 4 anos (2001-2005). Foram examinados um total de 30 espécimens correspondentes às ordens Rodentia e Didelphimorphia. (Tabela 4.5)

Tabela 4.5 Especímenes examinados do bioma Mata Atlântica e número de hemocultivo positivo (H+). O número total de *Didelphis sp* utilizados no estudo da variabilidade genética foi de 8.

Ordem	Espécie	Nº de especímenes examinados	H+ Total
Rodentia		8	-
Didelphimorphia		-	-
	<i>D. albiventris</i>	9	2
	<i>D. aurita</i>	13	5
<b>Total</b>		<b>30</b>	<b>7</b>

#### 4.4. Critério da escolha dos genes para a análise do Multilocus Sequencing Typing (MLST).

Para o estudo do MLST foram selecionados 4 fragmentos de genes nucleares constitutivos de *T. cruzi*. A escolha desses genes foi baseada no estudo previo conduzido por Yeo *et. al.*, (2011) onde mostraram a capacidade de discriminação para a linhagem TcI, de acordo com 9 de genes nucleares. Os quatro genes selecionados foram: **LYT1** gene que participa na lise celular e a infectividade do parasita; **Rb19** (*RNA-binding protein-19*), proteína citoplasmática de baixa expressão que participa na regulação da expressão génica; **MetIII** (*metacyclin-III*) localizado no núcleo do parasita e participa na diferenciação de epimastigotas a trypomastigotas; e o **DHFR-TS** (dihydrofolate reductase-thymidylate synthase) enzimas essenciais no metabolismo dos parasitas protozoos. As sequências dos iniciadores e as temperaturas de anelamento são mostradas na Tabela 4.6

#### 4.5. Reação em cadeia da Polimerase – PCR

A PCR foi realizada no termociclador *Mastercycle Personal®* (Eppendorf) em diferentes temperaturas de anelamento de acordo com o protocolo de trabalho de Yeo *et al* (cita) para cada gene utilizado. Para o gene *DHFR-TS* os ciclos de amplificação foram realizados conforme ao seguinte programa de temperaturas: temperatura de desnaturação inicial 94° C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto, 72° C por 2 minutos) com uma temperatura de anelamento de 58°C. As condições da reação para amplificação para a região parcial dos genes *Rb19*, *Met III* e *LYT1* foram: 94°C 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos) sendo que a temperatura de anelamento para *Met III* e *LYT1* foram de 51° C e 56° C respectivamente. Todas as reacões tiveram uma extensão final de 72° C por 10 minutos.



Foram realizadas modificações das temperaturas das ciclagens para os genes *LYT1* e *DHFR-TS* devido à presença de bandas inespecíficas. Para o gene *LYT1* foi utilizada uma temperatura de anelamento de 60°C e para o gene *DHFR-TS* a temperatura de 53°C

As reações foram realizadas num volume final de 25µL: 1µL de cada iniciador (20 pmol/µL), 1 ul de dNTPs (2 mM), 1 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 5U *Taq DNA (Polymerase, Recombinant 5U/µL - Invitrogen Cat N° 11615-010)*, água Milli-Q q.s.p. 25µL e 50 ng de DNA.

Gene	Nº de cromosomo	Sequencia do <i>Primer</i> (5'--3')	Tº de anelamento (C)	Tamanho do amplicom	Longitude do Fragmento
<i>LYT1</i>	22	CAACTTGCCCTTTTGCTCTC (20)	56	804	691
		GTTGTTGTTGTTGCCCTGTG (20)			
<i>Met III</i>	36	GTGGCTCCAAAGGCATAAGA (20)	51	824	619
		CCCCCTTCTTTGCCAATTAT (20)			
<i>Rb19</i>	29	GCCTACACCGAGGAGTACCA (20)	53	408	350
		TCTCCAATCCCCAGACTTG (20)			
<i>DHFR-TS</i>	27	CGCTGTTTAAGATCCGNATGCC (22)	58	1473	715
		CGCATAGTCAATGACCTCCATGTC (24)			

**Tabela 4.6. Genes selecionados para a análise do Multilocus Sequence Typing com as seqüências de cada iniciador, o número de cromosomo em que se encontram, as temperaturas de anelamento e o tamanho dos amplicons gerados após a PCR. As longitudes dos fragmentos O critério de seleção dos genes foi de acordo aos resultados obtidos por Yeo *et al* (2011).**

#### **4.6. Visualização do produto dos isolados de *T cruzi* I obtidos pela PCR**

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% utilizando como tampão de corrida o TBE (tampão Tris-EDTA) 0.5% corado com brometo de etídio. Foram misturados 8 µL de produto amplificado com 2 µL de tampão de corrida *Blue/Orange 6X Loading Dye* (Lote 0000043043) totalizando um volume de 10 µL. Foi utilizado como marcador de peso molecular na escala de 100 pb PROMEGA (Lote 0000042496). Os resultados foram documentados utilizando fotodocumentador *Gel Logic 2012 PRO Imaging System*®. O tamanho das bandas eram: 804 pb para o *LYT1*, 824 pb para o *MetIII*, para o *Rb19* 408 pb e para o *DHFR-TS* 1473 pb.

#### **4.7. Purificação dos produtos obtidos por PCR dos isolados de *T cruzi***

Os produtos amplificados foram purificados seguindo o protocolo do Kit de purificação *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare code 28903471): foram adicionados 500µL do Tampão de Captura tipo 3 aos tubos contendo o produto de PCR. A mistura foi homogeneizada. Em seguida, o conteúdo da mistura foi transferido para a micro coluna (fornecido pelo kit de purificação), que estava dentro de um tubo coletor. Centrifugou-se em uma micro centrífuga *Eppendorf 5415C*, cada tubo a 16 000 x g por 30 segundos. Foi retirada a micro coluna e o líquido restante foi desprezado. O material acima obtido foi lavado três vezes. A micro coluna foi colocada de novo no mesmo tubo coletor. Posteriormente foram adicionados 500µL de Tampão de Lavagem fornecido pelo fabricante. e foram centrifugados por 16 000 x g por 30 segundos. O tubo coletor foi esvaziado e desprezado e a micro coluna colocada num novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 50 µL do Tampão de Eluição fornecido pelo Kit, incubando-se 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugou-se por 1 minuto e descartou-se a micro coluna. O produto de DNA purificado foi estocado a -20° C. Para

a visualização dos produtos purificados foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio seguida de exposição com à luz Ultravioleta (UV).

#### 4.8. Sequenciamento de DNA de *Tcl* de *T cruzi*.

Para a reação de sequenciamento das 34 amostras de DNA desse estudo, foi utilizado o Kit Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (*Applied Biosystems*). Na reação, foram utilizados entre 3 a 20 ng de produto purificado da PCR. Um total de 15 amostras foi processada no laboratório de Biologia Molecular de Microorganismos do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) onde foi realizada a reação de sequêciamento em placas de 96 poços. Os reagentes utilizados para a reação de sequenciamento foram: *Sequencing Buffer 5X*, *Big Dye Terminator v 3.1* e os iniciadores *forward Rb19* (5'-GCCTACACCGAGGAGTACCA-3') e *reverse Rb19* (5'-TCTCCAATCCCCAGACTTG-3'); *forward Met III* (5'-GTGGCTCCAAAGGCATAAGA-3') e *reverse Met III* (5'-CCCCCTTCTTTGCCAATTAT 3'); *forward LYT1* (5'-CAACTTGCCCTTTTGCTCTC-3') e *reverse LYT1* (5'-GTTGTTGTTGTTGCCCTGTG-3') e *forward DHFR-TS* (5'-CGCTGTTTAAGATCCGNATGCC-3) e *reverse DHFR-TS* (5'-CGCATAGTCAATGACCTCCATGTC-3), numa concentração de 3,2 pM de cada iniciador específico para cada produto de PCR.

A reação na placa foi a seguinte: adicionou-se 1 µL de Big Dye Terminator, protegido da luz; 1,5 µL do Tampão Big Dye, 1 µL do iniciador na concentração 3,2 pM, o produto purificado que depende da quantificação do produto de DNA (3 a 20 ng). Finalmente a reação foi completada a 10 µL com água própria para sequenciamento.

A reação foi continuada no termociclador *Eppendorf* Master Cycle®, conforme o seguinte programa de temperaturas: 96 °C por 15 segundos; 50 °C por 10 segundos e 60 °C por 4 minutos, um total de 25 ciclos.

Foi realizada a precipitação do DNA adicionando isopropanol 75%, 15 minutos a temperatura ambiente; centrifugou-se 49 minutos a 2.250 x g numa centrifuga refrigerada marca *Eppendorf*. Foi descartado o isopropanol 75% invertendo a placa cuidadosamente. Em seguida, foi realizada uma centrifugação com a placa invertida em cima de um papel toalha por 1 minuto a 900 rpm e na temperatura de 21°C. Deixou-se

a placa secar por 5 minutos a 75 C e a etapa de adição da *Hi-Di Formamida* foi realizada pelo serviço de sequenciamento da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, sequenciador de DNA automático (*Applied Biosystems 3730 XL*)

As restantes 19 amostras foram enviadas em tubos individuais para a reação de sequenciamento realizada na Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ. Cada tubo continha: DNA purificado (3 a 10 ng), 1 µL de cada iniciador (3.2 pmol) e água Milli-Q q.s.p. até completar o volume final de 7,5 µL. A eletroforese dos produtos foi realizada pelo serviço da plataforma.

#### 4.9. Edição e análise das sequências obtidas

Para comparar as similaridades existentes entre as sequências de estudo e as sequências do banco de sequências do *National Library of Medicine National Institutes of Health (NCBI)*, foi utilizada a ferramenta *Basic Local Alignment Tool (BLASTn)*.

Em seguida, realizou-se a edição manual dos nucleotídeos gerados em ambas fitas das sequências e foi gerada uma sequência consenso, produto das leituras do sequenciamento, utilizando o programa *DNA STAR (Lasergene v 7.0.0)*. Considerando que *Trypanosoma cruzi* é um parasita diplóide, foi utilizada a nomenclatura da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) para identificar aqueles sítios onde era observada a presença de picos duplos.

O alinhamento de todas as sequências obtidas foi realizado mediante o programa *Clustal W* inserido dentro do pacote do programa BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall 1999). Para o alinhamento das sequências de todos os genes foi utilizada a sequência C8 TcI, *Triatoma infestans* de La Paz Bolívia, de acordo ao trabalho de Yeo *et al* (2011). A sequência do *Trypanosoma cruzi* IV (TcIV) foi utilizado como grupo externo para as análises de todas as árvores geradas com os fragmentos de genes constitutivos.

As distâncias genéticas interespecíficas e intraespecíficas foram calculadas aplicando o modelo evolutivo *Hasegawa, Kishino and Yano (HKY)* de acordo com Model Test do programa *MEGA v.5*. Utilizando o programa *SEAVIEW*, as sequências

foram examinadas em duas vias: gerando árvores com os genes individuais e gerando árvores MLST mediante os múltiplos fragmentos de genes concatenados. Para as duas análises foi utilizado o modelo evolutivo *HKY* sugerido pelo MEGA v.5, e foram gerados árvores de Maxima Verossimilhança

### **3.10. Caracterização dos isolados utilizando a Tipificação por Sequências de Multilocus (*Multilocus Sequencing Typing* - MLST)**

Para cada amostra de *T. cruzi* isolado de *Didelphis* sp um número de Sequência Tipo (ST) foi definido com cada gene. Combinações de dados STs foram analisados no e-BURST v.3 [http://eburst.mlst.net/v3/enter\\_data/single/](http://eburst.mlst.net/v3/enter_data/single/) para definir os complexos clonais (CC), sendo eles grupos de cepas relacionadas contendo pares de cepas que compartilham pelo menos (L-2) idênticos alelos em L loci com pelo menos outro membro do CC.

# 5. RESULTADOS

### 5.1. O gênero *Didelphis* spp como mantedor e amplificador da diversidade de TcI

O parasita *T cruzi* é mantido pelas três espécies de *Didelphis* e os resultados mostraram a existência de uma micro-heterogeneidade, evidenciada com o gene *LYT1*, que apresentou maior número de sítios polimórficos (11)

Essa micro-heterogeneidade não foi possível associar a nenhum bioma nem habitat. Assim mesmo, não foi observada correlação de micro-heterogeneidade com áreas de surto. Apenas no bioma Caatinga foi observada a formação de um clado onde todas as amostras desse bioma foram agrupadas, tanto na árvore do gene *LYT1* como na árvore dos genes concatenados. Quanto às amostras isoladas no bioma Amazônia, estes mostraram maior heterogeneidade, em comparação aos demais biomas do estudo. A variabilidade descrita acima esteve relacionada com a biodiversidade local de área de captura.

A presença de picos duplos no cromatograma foi observada nas sequências exceto no gene *DHFR-TS*. Os picos duplos no cromatograma indicam a presença de amostras mistas ou amostras heterozigotas. De acordo com a nomenclatura IUPAC, os picos duplos observados foram: **R** (presença de nucleotídeos C e T), **Y** (presença de nucleotídeos T e C), **W** (presença de nucleotídeos A e T), **S** (presença de nucleotídeos G e C).

### 5.2. Contexto ecológico

Em todos os biomas, espécies da ordem Rodentia apresentaram maior porcentagem de animais examinados. Mesmo assim, as espécies do gênero *Didelphis* apresentaram maior competência infectiva para *T cruzi*, indicando que as espécies do gênero *Didelphis* são importantes mantedores de *T cruzi*.

De acordo com a Tabela 4.2, no bioma Amazônia a ordem Rodentia correspondeu a 51% de animais examinados, no entanto a ordem Didelphimorphia correspondeu a 20%. Quanto à infectividade, *D. marsupialis* apresentou maior competência infectiva com 88% de animais com hemocultura positiva, para TcI mostrando que para esse bioma essa espécie é um importante reservatório dessa DTU. A riqueza de espécies de acordo com as viagens para o bioma Amazônia foi de 23.

No bioma Caatinga, as espécies de *Didelphis albiventris* apresentaram o 29% de



animais examinados, onde o 66% apresentaram hemocultivo positivo para Tcl. No entanto, espécies da ordem Rodentia apresentaram 69% de animais examinados onde só o 27% apresentaram hemocultura positiva (Tabela 4.3) Analisando o total de animais coletados observa-se que a riqueza de espécie foi de 8.

No bioma Cerrado as espécies da ordem Rodentia apresentaram o 47% de animais examinados onde só o 3% apresentaram hemocultivo positivo. As espécies do gênero *D. albiventris* representaram 11% de animais examinados e para *D. aurita*, 10% de animais examinados. Com relação ao hemocultivo positivo, *Didelphis spp* correspondeu a 20%, indicando uma alta infectividade de Tcl para as espécies do gênero *Didelphis sp* (Tabela 4.4). A riqueza de espécies no bioma Cerrado foi de 29, de acordo com essas tres viagens.

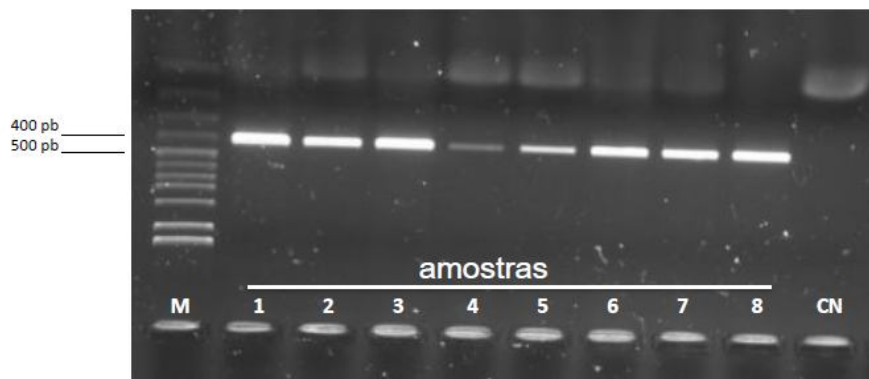
No bioma Mata Atlântica, a ordem Rodentia representou 27% de animais examinados, no entanto a ordem Didelphimorphia representou 73%. Foi o único bioma onde o número de animais examinados foi maior para a ordem Didelphimorphia. Com respeito à taxa de hemocultivo positivo, espécies do gênero *D. aurita* apresentaram um 38% e *D. albiventris* apresentaram um 22%, para hemocultivo positivo. A riqueza de espécie do bioma Mata Atlântica foi de 6, correspondente a essas viagens (Tabela 4.5)

Com esses resultados, as espécies do gênero *Didelphis* demonstraram ser um mantedor e amplificador, uma vez que comparece com a taxa de hemocultivo positivo com um mínimo de 25%.

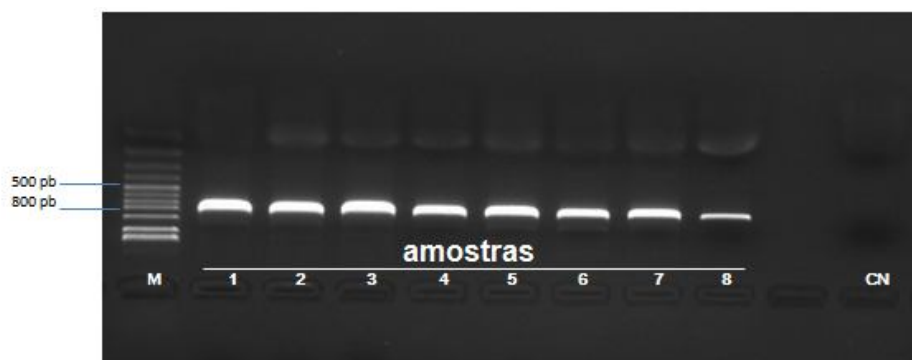
### **5.3. Amplificação das amostras de DNA dos isolados mediante a técnica da PCR.**

Mediante a técnica da PCR foram amplificadas com sucesso 33 das 34 amostras na amplificação parcial dos genes *RB19*, *MetIII*, *LYT1* e *DHFR-TS* escolhidos para a análise do MLST. A amostra D8 não foi possível amplificar e foi excluída da análise.

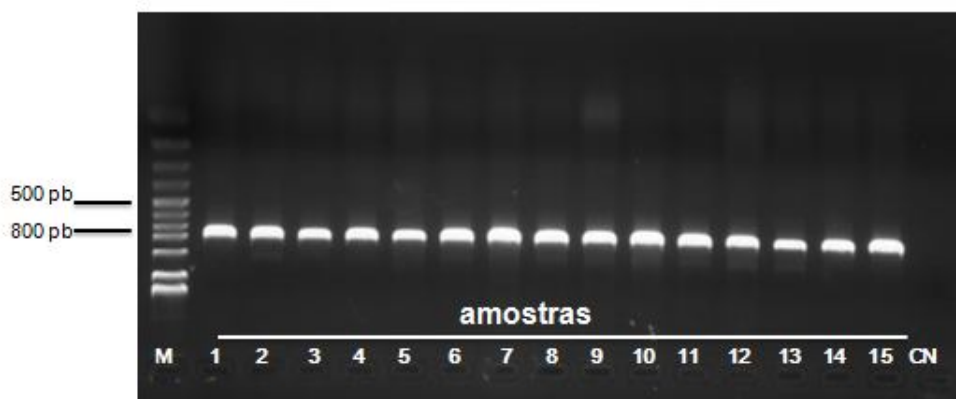
Para o gene *Rb19*, o tamanho do fragmento obtido foi de aproximadamente 408 pb (Figura 5.1) e para o gene *MetIII* aproximadamente 824 pb (Figura 5.2). Para os genes *LYT1* e *DHFR-TS*, foram obtidos, depois das modificações indicadas em materiais e métodos, fragmentos de tamanho ~824 pb e ~1573 pb, respectivamente (Figuras 5.3 e 5).



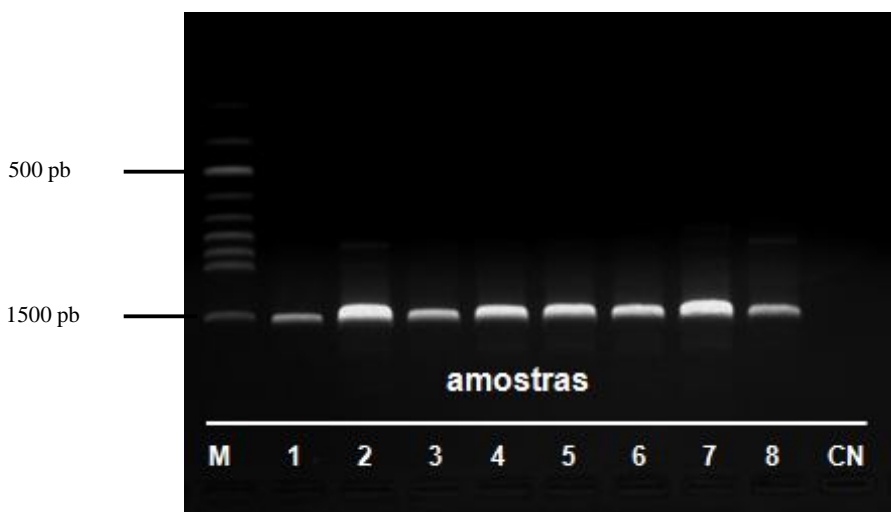
**Figura 5.1.** Electroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando ampliações de 408 pb para o gene *Rb19*. **M:** marcador de peso molecular 100 *Invitrogen*; **Linhas 1-8** amostras com aproximadamente 408 pb; **CN:** controle negativo.



**Figura 5.2.** Electroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando ampliações do tamanho de aproximadamente 824 pb com o gene *MetIII*. **M:** marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen*. **Linhas 1-8** amostras amplificadas com o gene MET III. **CN:** controle negativo



**Figura 5.3:** Electroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando o resultado da ciclagem modificada para o *LYT1*, onde se observa a ausência de bandas inespecíficas. **M:** marcador de peso molecular. Os números correspondem aos números de identificação das amostras. **CN:** controle negativo.



**Figura 5.4** Electroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando o resultado da ciclagem modificada para o *DHFR-TS*, onde se observa a ausência de bandas inespecíficas. **M:** marcador de peso molecular. Os números correspondem aos números de identificação das amostras. **CN:** controle negativo.

## 5.4. Avaliação do polimorfismo genético entre as sequências dos isolados de *T cruzi*

Um total de 132 sequências, correspondente a 33 amostras com quatro genes estudados foram obtidas. Para o fragmento de gene *LYT1*, foram obtidas somente sequências *reverse*, seguindo a análise com as sequências nessa direção para todas as amostras para esse gene.

Para o fragmento de gene *DHFR-TS* ambas fitas, *forward* e *reverse* foram obtidas, mas devido ao tamanho do amplicon (1473 pb), foram obtidos fragmentos de 715 pb. Foi utilizada a fita com sentido *forward*, para todas as amostras.

### 5.4.1 Polimorfismo para o gene *DHFR-TS*

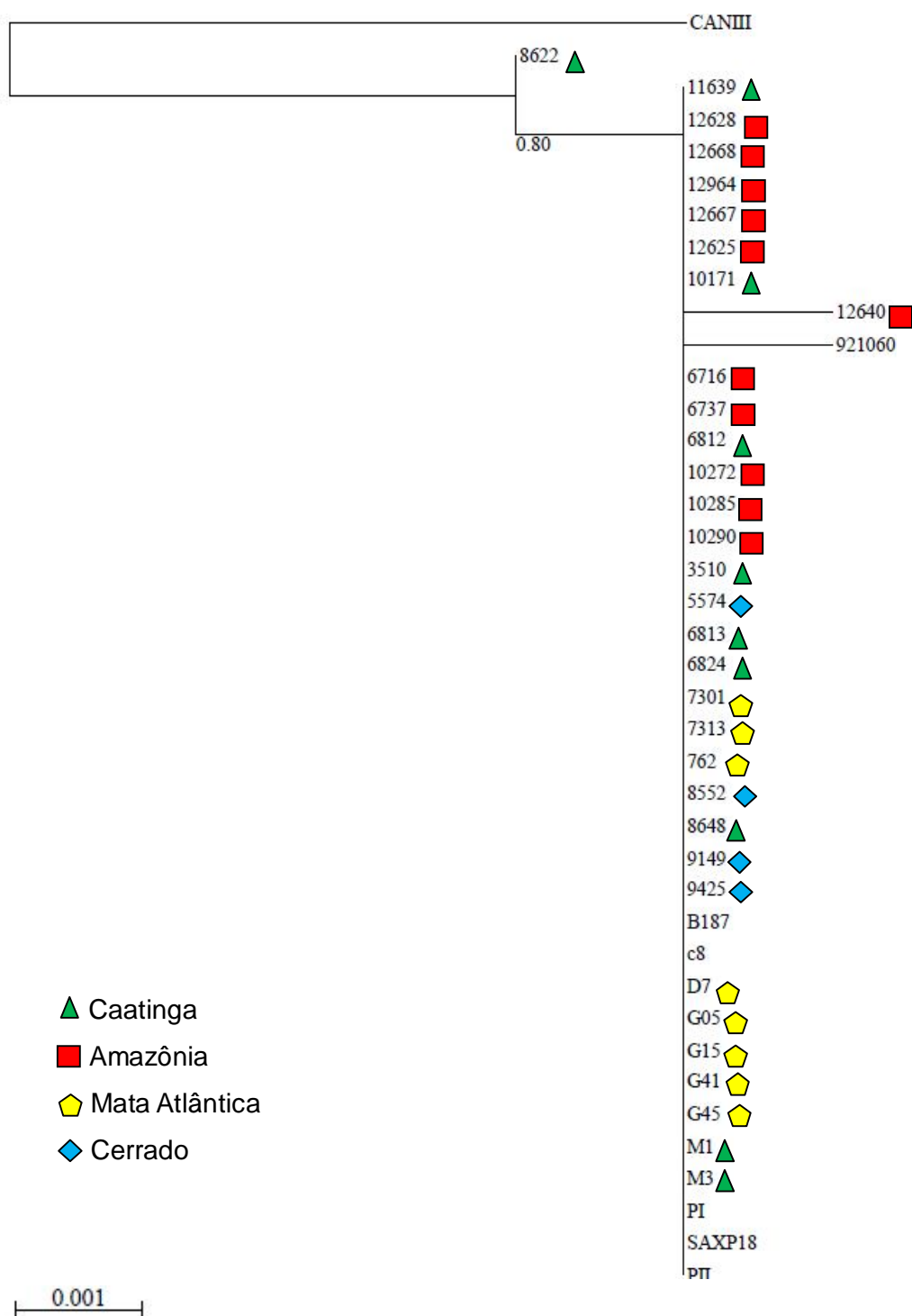
O fragmento de gene *DHFR-TS*, com um total de 715 pb apresentou três sítios polimórficos (Tabela 5.1). Considerando a análise com o MEGA, e não foram encontrados sítios parsimônicos informativos. (Tabela 5.5)

A árvore T92 Máxima Verossimilhança (Figura 5.5) mostrou a formação de um grupo só onde todas as amostras foram incluídas exceto a amostra 8648. A árvore evidenciou que para o gene *DHFR-TS*, não foram encontrados sítios parsimônicos informativos que possibilitem agrupamentos ou clados entre sequências.

**Tabela 5.1** Representação dos sítios polimórficos observados no alinhamento e as posições de cada sítio para o fragmento de gene *DHFR-TS* das 33 amostras estudadas com as amostras utilizadas como referência. O grupo externo foi excluído da tabela.

\*Amostras de referência

Amostra	Posições dos nucleotídeos		
	357	444	471
*C8 Bolívia <i>T. infestans</i>	T	A	C
*x10/1 TcI Consensus			
*JR Venezuela <i>H. sapiens</i>			
*PI Carajás/Brasil <i>D. marsupialis</i>			
*PII Carajás/Brasil <i>triatomineo</i>			
*B187 Para/Brasil <i>D. marsupialis</i>			
*SAXP18 Peru <i>D. marsupialis</i>			
*92101601 Georgia/USA <i>D. marsupialis</i>		G	
8622 CA	C		
12640 AM			T



**Figura 5.5.** Arvore ML inferida a partir do gene *DHFR-TS* de *T. cruzi*. As análises foram conduzidas no MEGA5.1 usando o modelo TN93 e 1000 replicatas de *bootstrap*. O tamanho do fragmento foi de 715 pb. O grupo externo é *T. cruzi* IV (CANIII). Só valores de *bootstrap* superiores a 50% são mostrados.

### 5.4.2 Polimorfismo para o gene *RB19*

Para um total de 350 pb, foram observados 9 sítios polimórficos, onde não houve relação dos sítios com o bioma de origem de cada uma das 33 amostras. (Tabela 5.2)

Um total de 16 amostras apresentaram picos duplos no cromatograma em coincidência com as sequências e referência (Tabela 5.2). A análise do programa MEGA mostrou 6 sítios variáveis e 0.85% de sítios parsimônicos (Tabela 5.5).

Na análise da árvore filogenética, foi observada a presença de cinco grupos com valores de *bootstrap* consistentes que se mostram na Figura 5.6.

O Grupo I foi o grupo mais coeso, composto basicamente por amostras do bioma Amazônia, exceto pela presença de uma amostra do bioma Mata Atlântica. O Grupo II agrupou amostras da Caatinga (8), Amazônia (3) e Mata Atlântica (1). Vale mostrar que a presença dos quatro isolados do bioma Cerrado está distribuído nos Grupos IV e V. Note-se que isolados do bioma Mata Atlântica são encontrados em 4 dos 5 grupos; não comparece só no Grupo 3.

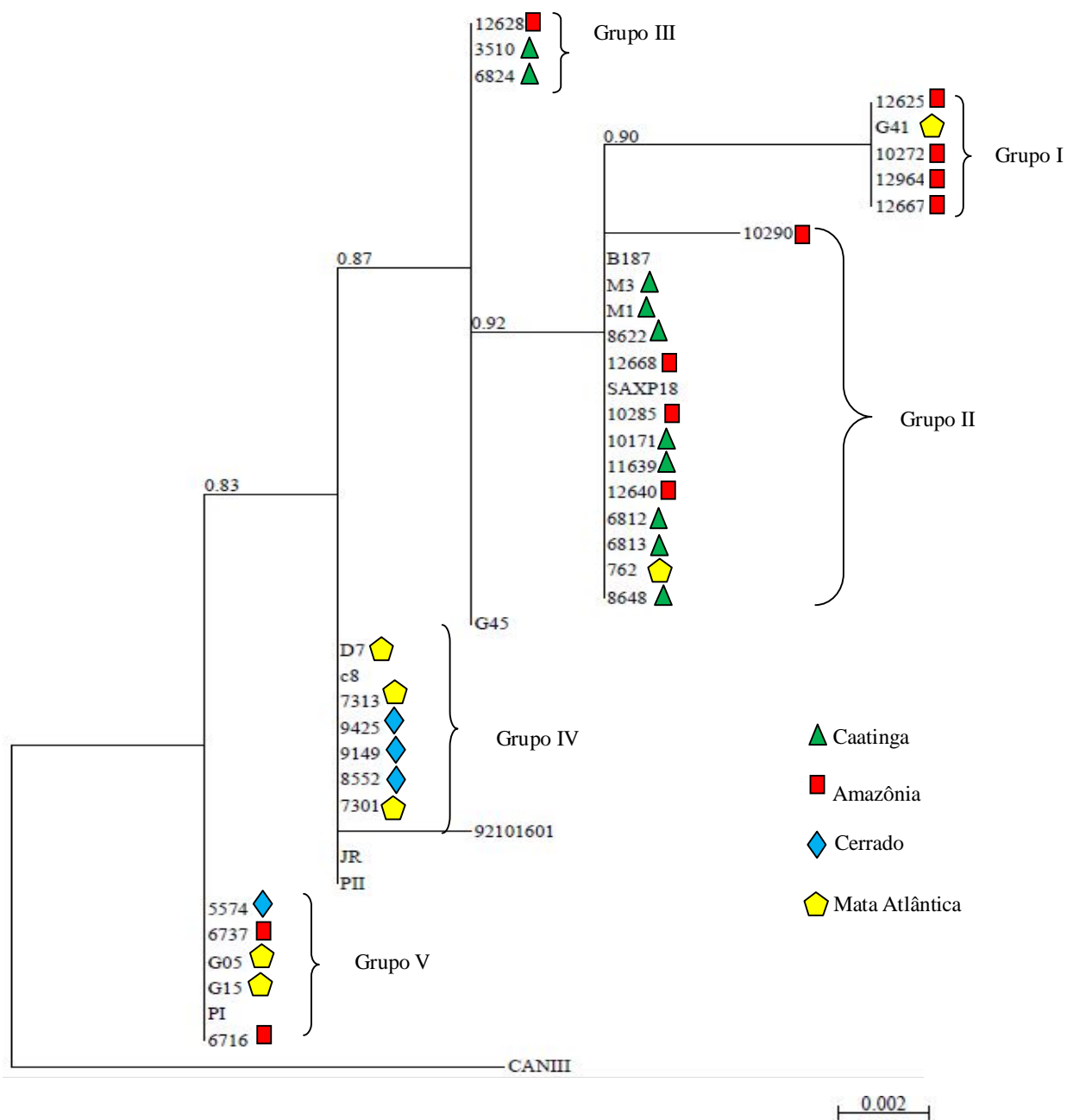
A árvore construída com o gene *RB19* mostra que não houve coerência entre os grupos formados e os biomas de origem dos isolados.

**Tabela 5.2.** Representação dos sítios polimórficos observados no alinhamento do gene *Rb19* e as posições de cada sítio para o fragmento de gene das 33 amostras estudadas. O grupo externo não foi considerado nesta análise.

\*Amostras de referência

Amostra	Posição dos nucleotídeos								
	48	72	92	105	189	237	288	304	311
*c8 Bolívia <i>T. infestans</i>	C	T	T	G	G	G	G	G	A
*x10/1 Tcl Consensus	C				A			A	G
*JR Venezuela <i>H. sapiens</i>			Y						
*PI Carajás/Brasil <i>D. marsupialis</i>		Y							
*PII Carajás/Brasil triatomíneo									
*B187 Pará/Brasil <i>D. marsupialis</i>	C				R				G
*SAXP18 Peru <i>D. marsupialis</i>	Y						R		R
*92101601 Georgia/USA <i>D. marsupialis</i>									
M3 CA		Y							G
M1 CA	Y	Y							G
8648 CA		C							G
6824 CA									G
6813 CA		C							G
8622 CA		Y				R			G
6812 CA		C							G
3510 CA									G
11639 CA		C							G
10171 CA		C							G
G45 MA									R
G41 MA		C			A			A	G
G15 MA		C							
G05 MA		C							
D7 MA		Y							
762 MA		C							G
9425 CE					R				
9149 CE					R				
8552 CE					R				
5574 CE		C							
6737 AM		C							
6716 AM		Y							
12964 AM		C			R			R	G
12668 AM		Y							G
12667 AM		C			R			R	G
12640 AM		C							G
12628 AM									G
12625 AM		C			R			A	G
10290 AM		Y		C					G
10285 AM		Y							G
10272 AM		Y		S	R			A	G





**Figura 5.6.** Árvore de ML inferida a partir do gene *RB19* de *T. cruzi*. As análises foram conduzidas no MEGA5.1 usando o modelo TN93 e 1000 replicatas de *bootstrap*. O tamanho do fragmento foi de 344 pb. O grupo externo é *T. cruzi* IV (CANIII)

### 5.4.3 GENE *Met III*

Das 33 amostras analisadas para o fragmento de gene METIII, 22 amostras apresentaram 8 sítios polimórficos para um total de 619 pb (Tabela 5.3). Não foram observadas relações entre os sítios polimórficos e os biomas estudados para esse fragmento de gene.

Em relação à presença de picos duplos no cromatograma, 4 amostras apresentaram entre um e dois nucleotídeos ambíguos (Tabela 5.3)

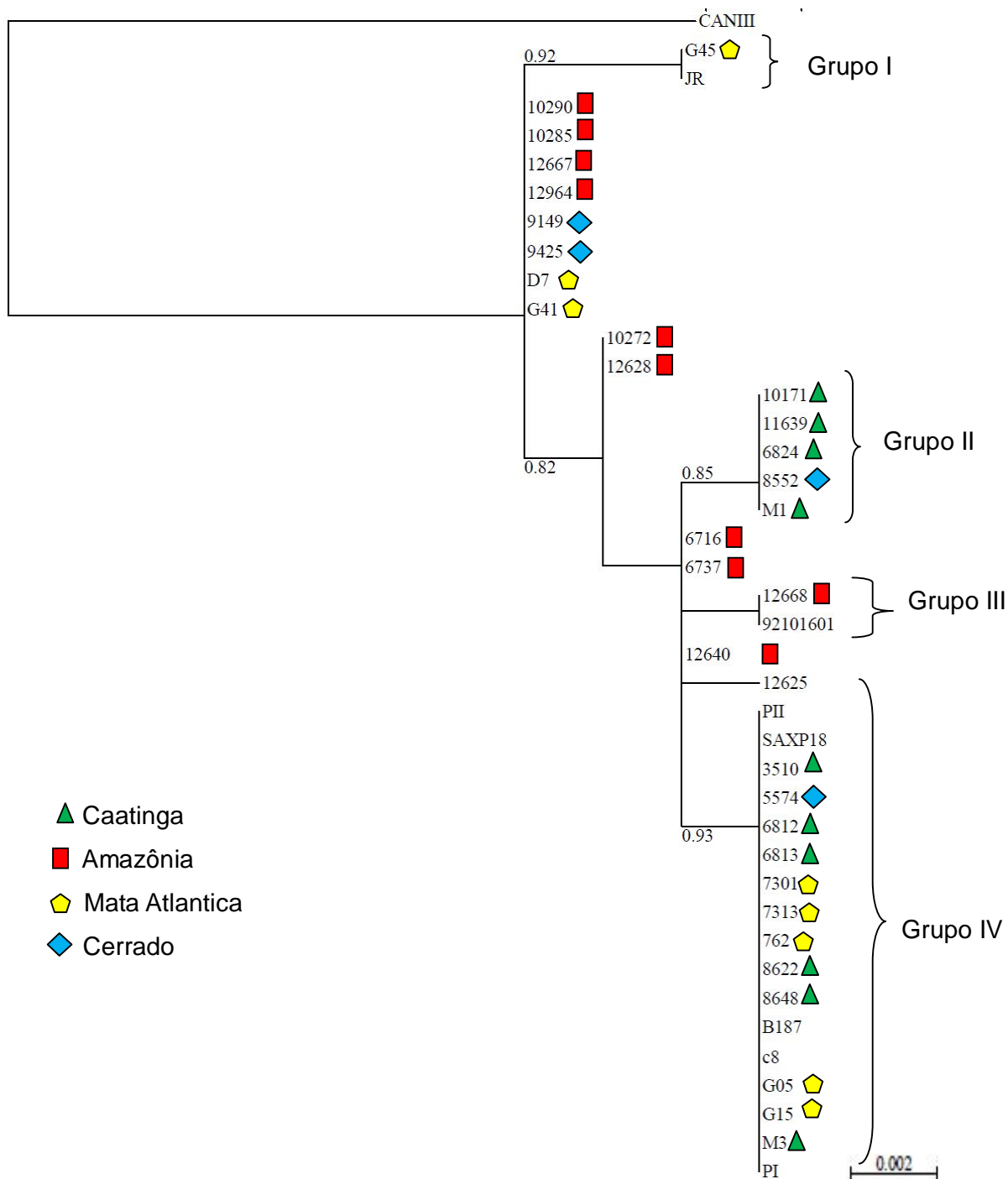
A análise realizada no programa MEGA, mostrou que para 619 pb foram observados 6 sítios variáveis e 0.80% de sítios parsimônicos. Sítios ambíguos não foram considerados na análise. (Tabela 5.5)

Na árvore de Máxima Verossimilhança para *MetIII* foram observados 4 grupos e os valores de *bootstrap* se mostram na Figura 5.7. O Grupo II esteve integrado por amostras pertencentes ao bioma Caatinga, exceto para a amostra 8552 pertencente ao bioma Cerrado.

O grupo IV esteve integrado por 12 amostras, pertencentes aos biomas Caatinga (6), Mata Atlântica (5) e Cerrado (1). Observa-se a presença de amostras que não integraram nenhum grupo.

**Tabela 5.3** Representação dos sítios polimórficos observados no alinhamento e as posições de cada sítio para o fragmento de gene *MetIII* das 33 amostras estudadas com as amostras utilizadas como referência. O grupo externo foi excluído da tabela. \*Amostras de referência

Amostras	Posição dos nucleotídeos							
	4	48	75	177	261	384	429	603
*C8 Bolívia <i>T. infestans</i>	A	G	T	T	T	C	C	A
*X10/1 Tcl Consensus								
*JR Venezuela <i>H. sapiens</i>	C	A	G	C			T	
*PI Carajás/Brasil <i>D. marsupialis</i>								
*PII Carajás/Brasil triatomíneo				K				
*B187 Pará/Brasil <i>D. marsupialis</i>								
*SAXP18 Peru <i>D. marsupialis</i>								
*92101601 Georgia/USA <i>D. marsupialis</i>								
M1 CA	C		G					
6824 CA	C		G					
11639 CA	C		G					
10171 CA	C		G					
G45 MA	C	A	G				Y	
G41 MA	C	A	G					
G15 MA				C				
D7 MA	C	A	G					
9425 CE	C	A	G					
9149 CE	C	A	G					
8552 CE	C		G					
6737 AM	C							
6716 AM	C					Y		
12964 AM	C	A	G					
12668 AM	C						T	
12667 AM	C	A	G		W			
12640 AM	C						Y	R
12628 AM	C	A						
12625 AM	C							G
10290 AM	C	A	G					
10285 AM	C	A	G					
10272 AM	C	A						



**Figura 5.7.** Arvore de ML inferida a partir do fragmento de gene *Met III* de *T. cruzi*. As análises foram conduzidas no MEGA 5.1 usando o modelo TN93 e 1000 replicatas de *bootstrap*. O tamanho do fragmento foi de 617 pb. O grupo externo é *Tc IV*. Só valores de *bootstrap* superiores a 50% são mostrados.

#### 5.4.4 Polimorfismo para o gene *LYT1*

O fragmento de gene *LYT1*, apresentou em 682 pb um total de 16 sítios polimórficos como se indica na Tabela 5.4. Os sítios polimórficos não mostraram relação com as localidades de origens das amostras.

Os nucleotídeos ambíguos observados estiveram presentes em 5 posições do cromatograma, onde algumas amostras apresentaram mais de um pico duplo. Mediante a análise com o MEGA, foram encontrados 21 sítios variáveis, 1.17% de sítios parsimônicos para um total de 682 pb. (Tabela 5.5)

A árvore de Máxima Verossimilhança TN93 com o fragmento de gene *LYT1*, mostrou IV grupos, Na Figura 5.8 se mostram os grupos e os valores de *bootstrap*.

O Grupo I agrupou duas amostras, ambas pertencentes ao bioma Amazônia, as duas correspondentes aos municípios de Cachoeira do Arari (10285) de ano de coleta 2006 e Curralinho (12964) de ano de coleta 2009 (Anexo 1)

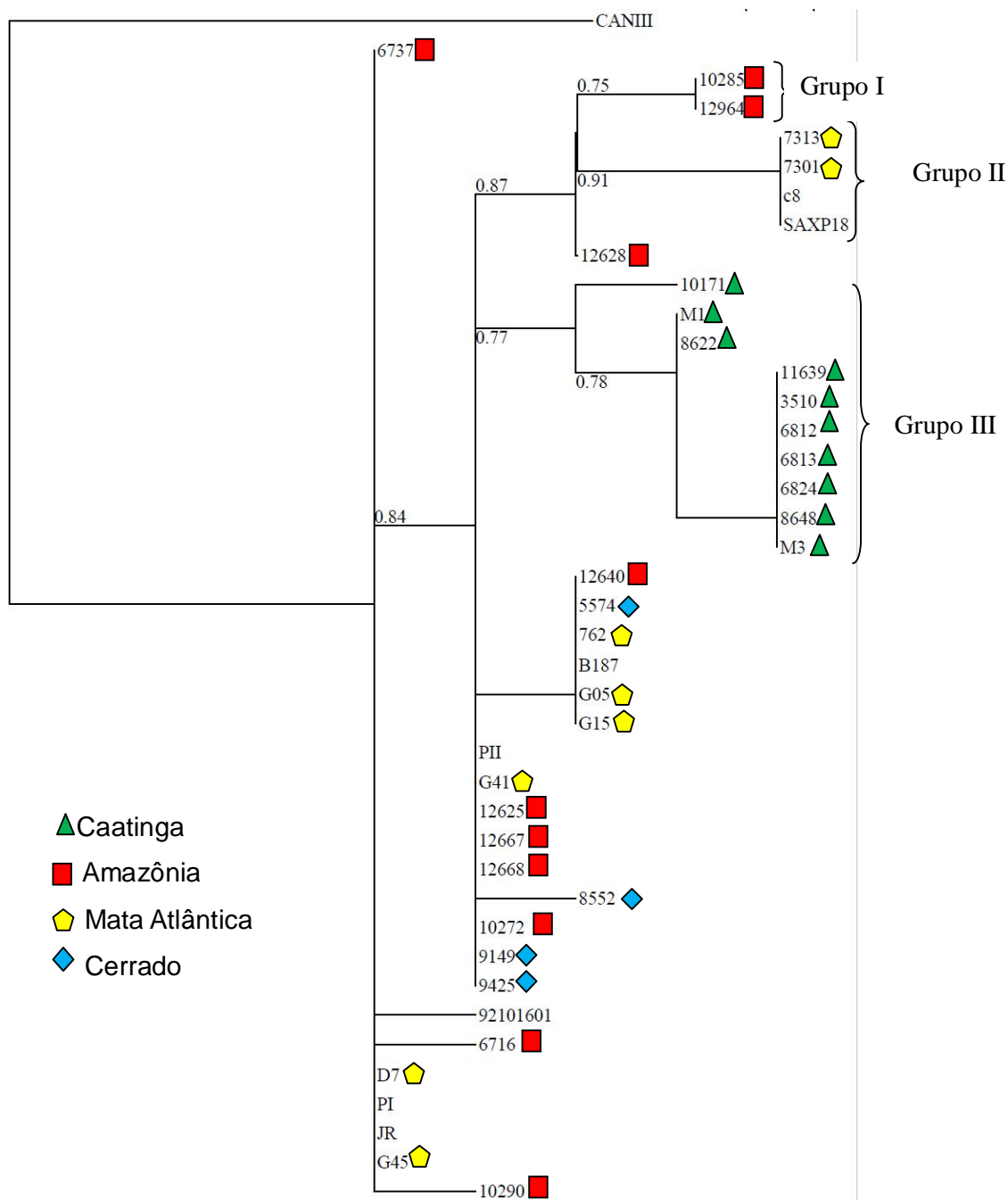
O grupo II agrupou duas amostras ambas do bioma Mata Atlântica. As duas amostras correspondem ao mesmo ano de coleta e pertencentes aos municípios de Navegantes (7313) e Camboriú (7301).

O Grupo III, integrado por amostras do bioma Caatinga, foi o único clado que agrupou amostras que pertencem ao mesmo bioma.

As demais amostras que não pertencem aos grupos citados, não mostraram uma posição definida na árvore, e o valor de *bootstrap* foi menor que 50%.

**Tabela 5.4.** Representação dos sítios polimórficos observados no alinhamento e as posições de cada sítio para o fragmento de gene *LYTI* das 33 amostras estudadas com as amostras utilizadas como referência. O grupo externo foi excluído da tabela. \*Amostras de referência

Amostras	Posição de nucleotídeos para LYTI															
	5 8	8 5	11 2	16 2	17 7	17 0	17 1	17 2	23 1	37 3	38 8	42 5	45 0	46 4	60 1	67 8
*c8 Bolívia <i>T. infestans</i>	C	A	A	C	A	-	-	-	T	G	C	G	C	A	C	A
*X10/1 Tcl Consensus					A	A	A									
*JR Venezuela <i>H. sapiens</i>				C	A	A	A				A					G
*PI Carajás/Brasil <i>D. marsupialis</i>				C	A	A	A				A					G
*PII Carajás/Brasil <i>triatomineo</i>				C	A	A	A				Y	A				R
*B187 Pará/Brasil <i>D. marsupialis</i>				C	A	A	A				T	A				
*SAXP18 Peru <i>D. marsupialis</i>				-	-	-										
*92101601 Georgia/USA <i>D. marsupialis</i>		T			A	A	A		R							
M3 CA	T			T	C	A	A	A			A					T
M1 CA	T			T	C	A	A	A			A					
8648 CA	T			T	C	A	A	A			A					T
6824 CA	T			T	C	A	A	A			A					T
6813 CA	T			T	C	A	A	A			A					T
8622 CA	T			T	C	A	A	A			A				Y	R
6812 CA	T			T	C	A	A	A			A					T
3510 CA	T			T	C	A	A	A			A					T
11639 CA	T			T	C	A	A	A			A					T
10171 CA	T		T		C	A	A	A			A					
G45 MA					C	A	A	A			A					G
G41 MA					C	A	A	A			A					
G15 MA					C	A	A	A			T	A				
G05 MA					C	A	A	A			T	A				
D7 MA					C	A	A	A			Y	A				G
762 MA					C	A	A	A			T	A				
7313 MA								A							R	R
7301 MA								A							R	
9425 CE					C	A	A	A			A					
9149 CE					C	A	A	A	Y		A					
8552 CE					C	A	A	A	C		A					
5574 CE					C	A	A	A			T	A				
6737 AM					C	A	A	A			A					R
6716 AM					C	A	A	A			T	A				R
12964 AM					G	A	T	A			A					
12668 AM					C	A	A	A			A					
12667 AM					C	A	A	A			A					
12640 AM					C	A	A	A			T	A				
12628 AM					G	A	A	A			Y	A				R
12625 AM					C	A	A	A			A					
10290 AM					C	A	A	A			A	T				G
10285 AM					G	A	T	A			A					
10272 AM					C	A	A	A			A					



**Figura 5.8.** Árvore ML inferida a partir do gene *LYT1* de *T. cruzi*. As análises foram conduzidas no MEGA5.1 usando o modelo TN93 e 1000 replicatas de *bootstrap*. O tamanho do fragmento foi de 682pb. O grupo externo é *T. cruzi* IV (CANIII). Só valores de *bootstrap* superiores a 50% são mostrados.

Na Tabela 5.5 se descrevem os níveis de diversidade observados para cada fragmento de gene representado como os sítios variáveis (SV), os sítios parsimônicos (SP) e os sítios ambíguos encontrados em cada fragmento de gene. Os genes *LYT1* com 21 e *MetIII* com 19 apresentaram o maior número de sítios polimórficos em relação aos quatro genes escolhidos para a análise.

Em relação ao número de sítios com nucleotídeos ambíguos o gene *Rb19* (2.6%) mostrou um maior número, seguido do gene *MetIII* (1.13%)

**Tabela 5.5.** Características dos genes sequenciados das 33 amostras analisadas neste estudo. Para a análise de V e SP foram excluídos os sítios a que apresentam ambiguidades. Os nucleotídeos ambíguos foram analisados por separado. **SV:** sítio variável. **SP:** sítio parsimônico.

<b>Gene</b>	<b>Fragmento (Pb)</b>	<b>SV (pb)</b>	<b>SP (pb) (% do fragmento)</b>	<b>Sítios ambíguos Número de sítios (% do fragmento)</b>
<b>RB19</b>	344	6	3 (0.87 %)	9 (2.62%)
<b>METIII</b>	617	6	5 (0.81%)	7 (1.13%)
<b>LYT1</b>	682	12	8 (1.17%)	5 (0.73%)
<b>DHFR-TS</b>	695	3	Nenhum	1 (0.14%)



## 5.5 Análise dos genes concatenados

Os quatro genes escolhidos foram concatenados resultando um total de 2338 pb correspondentes a 33 amostras sequenciadas. Foram observados um total de 2279 sítios conservados, 59 sítios variáveis e 17 sítios informativos parsimônicos. A distância genética foi calculada dentro de cada bioma mostrando valores que iam de 0.000 a 0.004 (Anexo 2).

As distâncias genéticas obtidas na análise não apresentaram relação quando foram analisadas as distâncias geográficas entre as amostras deste estudo.

A construção da árvore concatenada mostrou a presença de 6 grupos e confirma o que foi observado no resultado do gene *LYT1*, onde amostras pertencentes ao bioma Amazônia possuíram uma maior diversidade, seguido do bioma Mata Atlântica. Apenas um único grupo de isolados de *T. cruzi* I pode ser relacionado com o bioma de origem, a saber Caatinga. Os demais grupos não se corresponderam com os biomas de origem (Figura 5.9).

Amostras pertencentes ao bioma Mata Atlântica estavam presente em 4 dos 6 grupos.

Não houve relação de distância geográfica na formação dos grupos. O grupo II da Figura 5.9, agrupou as duas amostras de Amazônia (10285 e 12964), com um *bootstrap* de 83%, pertencentes aos municípios de Curalinho e Cachoeira do Arari, apresentando uma distância entre elas de 130 km em linha reta. (Figura 5.10).

O grupo III, agrupou todas as amostras pertencentes ao bioma Caatinga com um *bootstrap* de 77%. De acordo com a distância genética obtida para esse bioma, os valores vão de 0.000 e 0.003 (Anexo 2). Apresentaram distância genética 0.000 as amostras 8622, 6812, 6813, 8648, 3510 e M3, distância que se reflete na árvore mostrando a formação de um grupo com 91% de *bootstrap* para essas amostras (Figura 5.9).

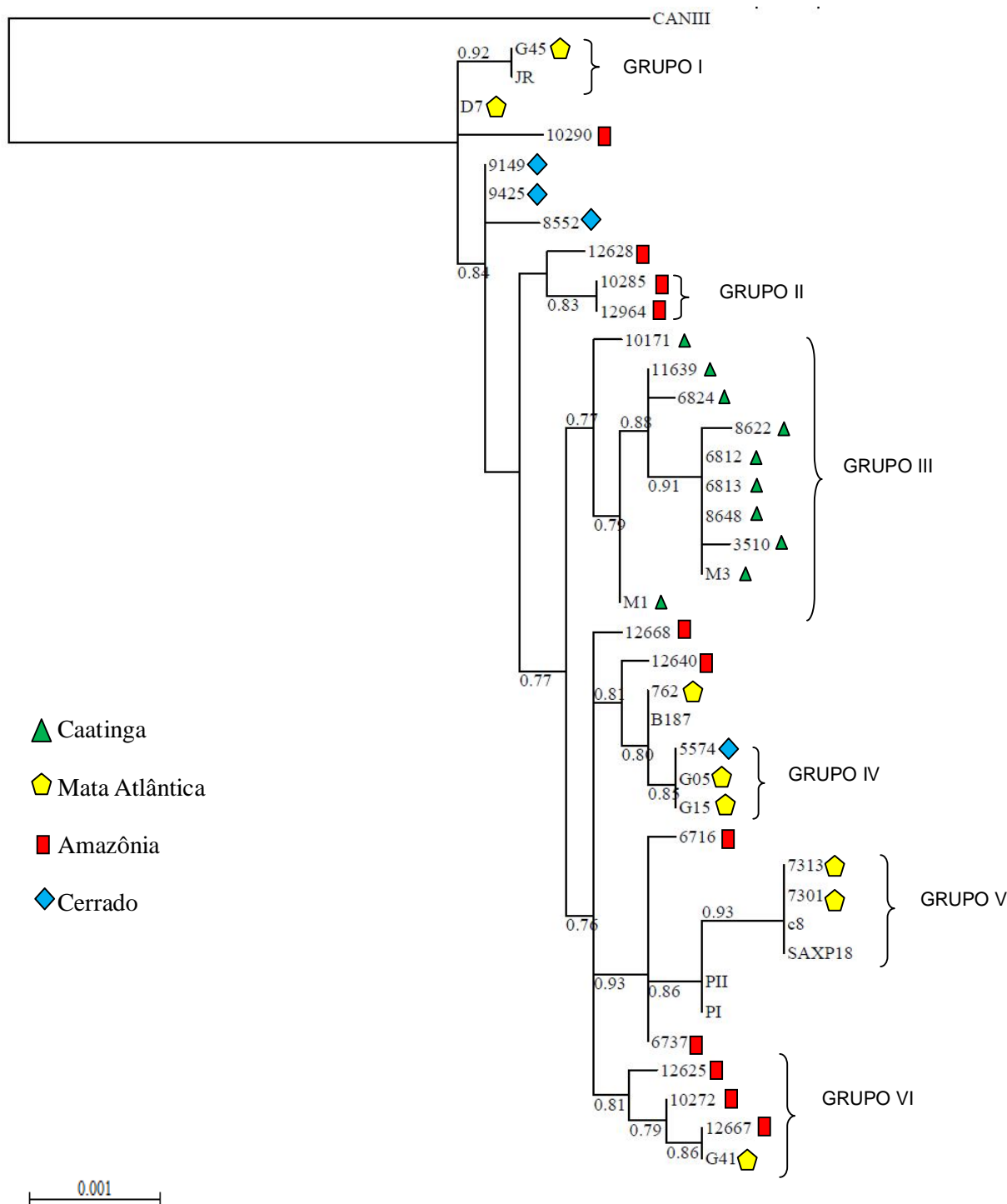
O Bioma Caatinga foi o único bioma que se mostrou homogêneo, agrupando todas as amostras deste bioma num clado só. Considerando a topologia das árvores construídas com os genes individuais, se observou que com o gene *LYT1* as amostras do bioma Caatinga foram agrupadas num mesmo clado (Figura 5.8) suportado por um valor de *bootstrap* de 77% mostrando congruência na estrutura para esse clado com a árvore com os genes concatenados (Figura 5.8)

O grupo IV esteve integrado por amostras de Mata Atlântica (G05 e G15) do município de Silva Jardim, e do Cerrado (5574) do município de Capitão Andrade, Minas

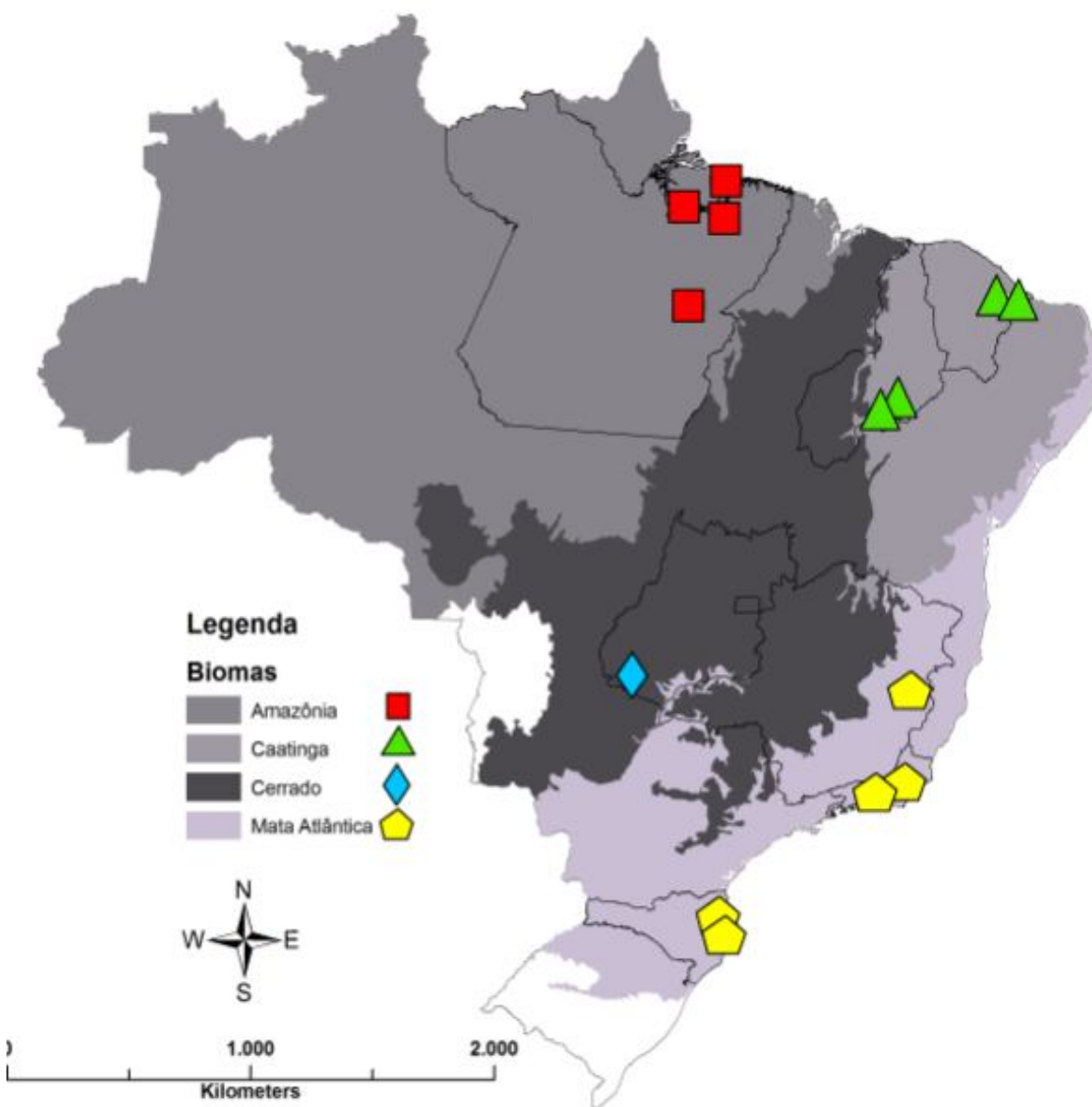
Gerais com uma distância de 400 Km aproximadamente. A similaridade entre as amostras foi de 98% entre as amostras da Mata Atlântica e 96% comparando as amostras de Mata Atlântica com a amostra do Cerrado. As amostras G05 e G15, mostraram uma distância genética de 0.000 como se reflete na árvore. Ambas amostras correspondem ao mesmo município e a mesma data de colecta (Anexo 1)

O grupo V agrupou a duas amostras de Mata Atlântica pertencentes ao município de Santa Catarina e à mesma viagem, mostrando uma similaridade de 99% entre elas. As duas amostras agruparam com as sequências de referência C8 e SAXP18, correspondentes a *Triatoma infestans* (La Paz, Bolívia) e *D. marsupialis* (Majes Peru). Em relação às árvores dos fragmentos de genes individuais, foi observado o mesmo grupo com um *bootstrap* de 91% na árvore construída com o gene *LYT1* (Figura 5.8).

O grupo VI formado por quatro amostras, onde as amostras 12667 (Currálinho - Amazonia) e G41 (Guapimirim - Mata Atlântica) formaram um subgrupo mostrando com uma similaridade de 99% e um *bootstrap* de 85%. A amostra 10272 mostrou uma similaridade de 94% com as amostras 12667 e G41; a amostra 12625 (Abaetetuba - Amazônia) mostrou uma similaridade de 99% comparando com as amostras do subgrupo. (Figura 5.9)



**Figura 5.9.** Árvore MV inferida a partir dos quatro genes concatenados de *T. cruzi* (2338 pb). As análises foram conduzidas no MEGA 5.1 usando o modelo TN93 e 1000 replicatas de *bootstrap*. O grupo externo é Tc IV. Só valores de *bootstrap* superiores a 50% são mostrados.



**Figura 5.10** Distribuição geográfica dos isolados utilizados no estudo da diversidade genética da DTUI de *T. cruzi*.

## 5.6 Análise de Tipificação por Sequências de Multilocus.

### 5.6.1 Perfis alelicos e Complexos Clonais

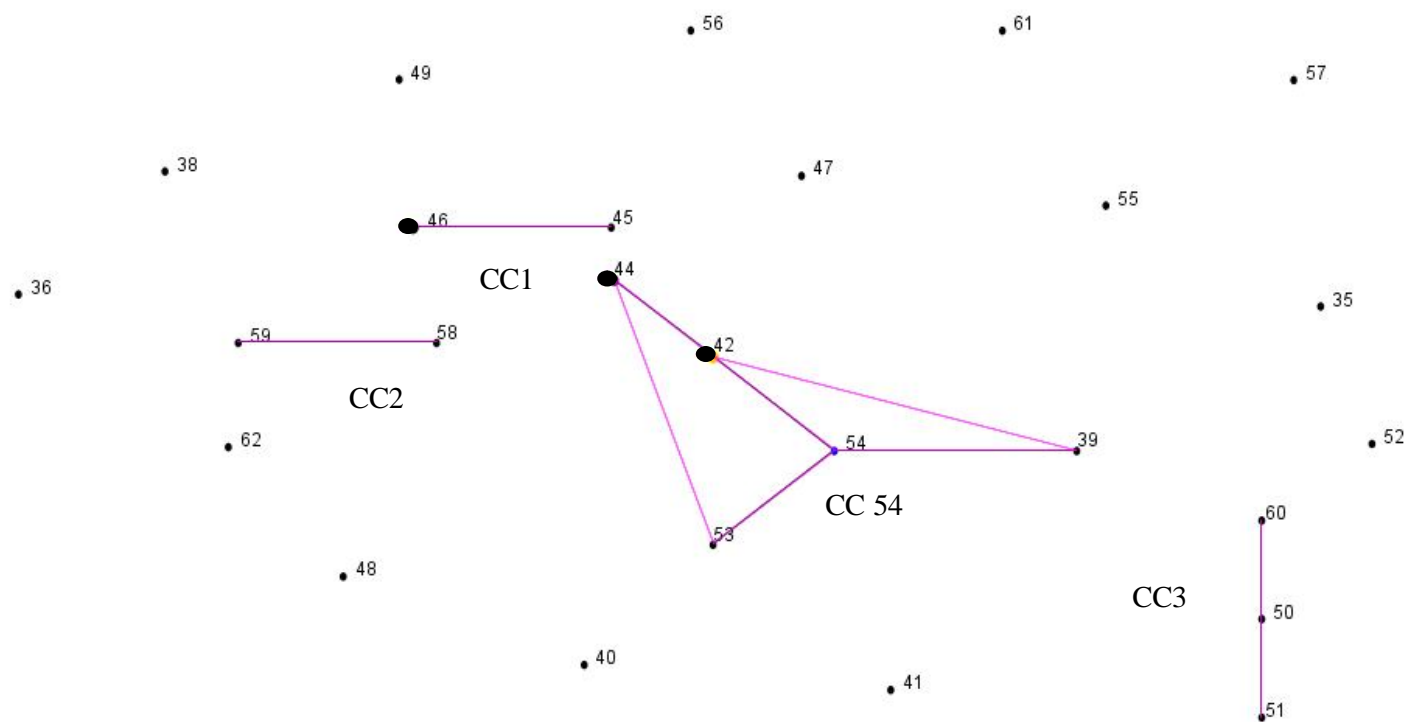
Empregando a técnica da Tipagem por Sequências de Multilocus (MLST) foram definidas um total de 28 STs correspondentes a 33 amostras analisadas. A ordem dos fragmentos de genes utilizada na análise foi a seguinte: *LYT1*, *MetIII*, *Rb19* e *DHFR-TS*. Na tabela 5.6 se mostram os códigos de tipificação de sequências diplóides (DST) estabelecidos para as 33 amostras deste estudo em relação aos quatro alelos, mostrando que praticamente cada isolado é uma individualidade.

De acordo com a análise das STs, três STs estiveram formados por mais de um isolado (Tabela 5.6), sendo eles a ST H42 (3 isolados), a ST L46 (3 isolados) e a ST J44 (dois isolados).

No entanto, 26 das 28 STs se corresponderam a um isolado só. Os 28 STs gerados foram separados por eBURST em Complexos Clonais (CC). Na análise do diagrama produzido no eBURST, se observa a presença de quatro CC. (Figura 5.11)

**Tabela 5.6.** Sequencia Tipo (ST) e Sequencia Tipo Diploide (DST) para os quatro genes constitutivos utilizados neste estudo.

ID	Bioma	DST	LYT1 (ST)	Met-III	RB19	DHFR-TS
M1	Caatinga	A35	24	25	25	1
10290	Amazônia	B36	32	26	26	1
8622	Caatinga	C37	23	1	27	20
10272	Amazônia	D38	35	27	28	1
M3	Caatinga	E39	38	1	29	1
12668	Amazônia	F40	35	32	29	1
10285	Amazônia	G41	33	26	29	1
8648	Caatinga	H42	38	1	30	1
6813	Caatinga	H 42	38	1	30	1
6812	Caatinga	H42	38	1	30	1
12640	Amazônia	I43	37	31	30	21
11639	Caatinga	J44	38	25	30	1
10171	Caatinga	J44	38	25	30	1
762	Cerrado	K45	37	1	31	1
G15	Mata Atlântica	L46	37	1	32	1
G05	Mata Atlântica	L46	37	1	32	1
5574	Cerrado	L46	37	1	32	1
6737	Amazônia	M47	36	1	33	1
12964	Amazônia	N48	34	26	34	1
12667	Amazônia	O49	35	30	34	1
9425	Cerrado	P50	35	26	35	1
9149	Cerrado	Q51	29	26	35	1
8552	Cerrado	R52	28	25	35	1
6824	Caatinga	S53	38	25	36	1
3510	Caatinga	T54	38	1	36	1
12628	Amazônia	U55	27	27	36	1
12625	Amazônia	V56	35	33	37	1
G45	Mata Atlântica	W57	36	28	38	1
7313	Mata Atlântica	X58	26	1	1	1
7301	Mata Atlântica	Y59	25	1	1	1
G41	Mata Atlântica	Z60	35	26	2	1
6716	Amazônia	A1 61	30	29	4	1
D7	Mata Atlântica	A2 62	31	26	4	1



**Figura 5.11.** Representação dos Complexos Clonais mediante o eBURST. A área de cada círculo corresponde com ao número de isolados que se agrupam em cada ST. As linhas conectam STs que se diferenciam em um alelo só (SLV)

De acordo a Figura 5.11 o CC1 corresponde aos STs K45 e L 46. O ST L46 está integrado pelos isolados G15 e G05 do município de Silva Jardim, e pelo isolado 762, todos pertencentes ao bioma Mata Atlântica e isolados de *D. marsupialis*. O ST K45 corresponde à amostra 5574 que pertence ao bioma Cerrado, isolado de *Didelphis aurita*. Esse complexo mostra que os agrupamentos se realizaram independentemente da origem geográfica e habitats.

O CC2, formado pelos STs X58 e Y59 os quais estão integrados pelos isolados 7303 e 7313, ambos correspondentes ao bioma Mata Atlântica. As duas amostras foram isolados de *D. aurita* mostrando que para esse complexo os isolados que se relacionaram pertencem à mesma área geográfica e ao mesmo hospedeiro.

O CC3 está integrado pelos STs Z60, P50 e Q51 e correspondem às amostras G41, 9425 e 9149, respectivamente. As amostras 9425 e 9149 pertencem ao bioma Cerrado e G41 pertence ao bioma Mata Atlântica. Os isolados foram obtidos dos hospedeiros *D. marsupialis* para o G41 e *D. albiventris* para os isolados 9425 e 9149. Com esses resultados se observa que a formação de complexos clonais não está directamente relacionada nem a área geográfica nem ao gênero do hospedeiro

O CC54 corresponde aos STs E39, H42, J44, S53 e T54. O ST 39 corresponde ao isolado M3; o ST 42 aos isolados 8648, 6812 e 6813; o ST 44 aos isolados 11639 e 10171; o ST 53 ao isolado 6824 e o ST 54 ao isolado 3510. O CC54 está integrado por amostras pertencentes só ao bioma Caatinga mostrando que os isolados desse grupo se encontram directamente relacionadas genotipicamente entre eles.



# **6. DISCUSSÃO**

## 6.1 Considerações sobre os aspectos do parasita *T cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* se caracteriza por sua heterogeneidade, ampla distribuição na natureza e grande quantidade de espécies de hospedeiros incluídas em oito ordens de mamíferos com as quais estabelece interações peculiares. Atualmente são reconhecidos nesse taxon seis DTUs cuja ecologia representa até hoje um quebra-cabeça, pois a dispersão das DTUs na natureza, sua associação com os hospedeiros e doença humana são ainda assuntos em discussão.

A DTU TcI é descrita como sendo o genótipo mais abundante e disperso nas Américas (Miles et al 1977, Tibayrenc y Ayala 1988, Souto et al 1996, , Zingales 1998). Vários estudos vem demonstrando a presença desse genótipo na Argentina, Bolívia, Chile, Colômbia, México, Panamá, Paraguai, Guayana Francesa, Brasil, Venezuela e Estados Unidos (Cura et al 2010; Tomazini et al 2010). Dos isolados pertencentes à COLTRYP do Brasil, aproximadamente 80% corresponde ao genótipo TcI, indicando que ele é o genótipo mais frequentemente isolado (Anexo 2). Porém, não está excluída a possibilidade de que uma fração não desprezível deste 80% esteja de fato constituída por infecções mistas não detectadas ou que outros genótipos estejam infectando os animais soro positivos. Vale lembrar, que esses achados de TcI na ColTryp do Brasil correspondem a parasitas isolados por xenodiagnóstico e hemocultivos que posteriormente são amplificados para caracterização genética, ou seja são submetidas a pressões seletivas.

Hemocultura e xenodiagnóstico são testes pouco sensíveis. Quando positivos, eles demonstram que o animal infetado apresenta parasitemia expressiva. Demonstram ainda que esse animal apresenta alta competência infectiva para o vetor, ou seja alta probabilidade de que o vetor ao se alimentar, adquira a infecção pelo parasita. A baixa sensibilidade destes métodos parasitológicos resulta numa menor chance de isolar as subpopulações parasitárias circulantes menos numerosas e conseqüentemente do favorecimento das populações parasitárias mais numerosas.

Os testes sorológicos são muito sensíveis mas não dão indicação da competência infectiva do animal. No universo de animais silvestres por nós avaliados, uma minoria apresenta parasitemias expressivas. Levando essa variável em conta, em paralelo com

os resultados aqui apresentados, nós decidimos tentar extrair DNA de *T. cruzi* de amostras de soro de *D. marsupialis* que possuíam comprovação sorológica da infecção por *T. cruzi*. Nós observamos que uma fração de animais cujos isolados haviam sido genotipados previamente como TcI, em realidade apresentavam infecções mistas TcI/TcII (dados preliminares), mostrando que a ecologia das DTUs de *T. cruzi* ainda representa uma questão longe de estar resolvida.

Marsupiais são considerados os mais antigos hospedeiros reservatórios de *T. cruzi*, capazes de manter parasitemias altas e estáveis por esse hemoflagelado. São espécies silvestres com alto grau de sinantropia, extremamente generalistas tanto em relação aos habitats (podendo procurar abrigo em ocos de árvore, ninhos de outros animais) quanto a dietas alimentárias, podendo-se infectar por via oral e por a via contaminativa. São nômades (principalmente o macho), solitários e frequentam todos os estratos florestais. Esse conjunto de características facilita que os marsupiais do gênero *Didelphis* estejam expostos a todos os ciclos de transmissão de *T. cruzi*, tanto silvestre, domiciliar como peridomiciliar, o que nos levou a hipotetizar que se existisse uma variabilidade genética nas populações de *T. cruzi* I, seria encontrada nas espécies do gênero *Didelphis*, ou seja que este taxon esteja atuando como um bioacumulador da diversidade de populações de *T. cruzi* I.

## 6.2. Diversidade de *T. cruzi* I

Até a época do primeiro consenso internacional sobre a nomenclatura de *T. cruzi*, TcI era considerado homogêneo com mais ampla distribuição geográfica em relação às demais DTUs (Annonymus, 1999). Considerada como a linhagem parental junto com a DTU II, a DTU TcI está associada à maioria dos casos de Doença de Chagas oral na Amazônia.

Os estudos sobre a diversidade genética do TcI foram iniciados na Colômbia onde a primeira proposta realizada por Herrera *et. al.*, (2007) que sugeriram a existência de 4 haplótipos no TcI (TcIa- TcId) associados a infecções humanas, vectores domésticos, vectores peridomesticos e ao ciclo silvestre. Em seguida, Falla *et al* (2009) reconheceram a existência de três desses haplótipos (TcIa, TcIb e TcId). Ambos

estudos foram realizados utilizando como alvo a região microsatélite do gene de Mini exon, marcador de evolução rápida. Cura *et al.*, (2010) confirmou os quatro genótipos sugeridos por Herrera no 2007 na Colômbia, e descrevem dois genótipos no Chile utilizando como alvo o gene citocromo b. Estudos de Ramirez *et al* 2012 baseados na análise do DNA mitocondrial sugeriram a existência de um genótipo domiciliar ao que denominaram TcI<sub>DOM</sub> (anteriormente TcIa/VEN<sub>DOM</sub>), que os autores associaram ao ciclo doméstico de transmissão do *T cruzi*. Ainda Ramirez *et al* no 2013, utilizando a técnica de MLST e mediante o sequenciamento de 13 fragmentos de genes constitutivos, estudaram 50 clones biológicos de isolados de humanos, triatomíneos e mamíferos e detectaram apenas dois genótipos em TcI. Um desses genótipos correspondeu ao TcI<sub>DOM</sub> e o outro, às populações de *T cruzi* peridomésticas e silvestres.

Em 2009, Llewellyn *et al*, analisaram 135 amostras ( de humanos, roedores marsupiais e vetores) por microsatélite, observaram que o genótipo TcI apresentava uma grande variabilidade genética. Eles propuseram a divisão da população de TcI em dois grupos associados ao ciclo doméstico e silvestre respectivamente. Em particular, eles observaram que a clonagem de um único isolado de amostra de *Didelphis spp.* revelava uma grande diversidade genética em TcI. Este achado de Llewellyn demonstrou que *Didelphis spp* é uma taxon capaz de manter uma ampla diversidade de haplótipos de TcI.

Ramirez *et al*, 2012, sugeriram o subgrupo TcI<sub>DOM</sub>, como associado ao ciclo doméstico na Colômbia e como consequente da ação antropica, já que de acordo com as suas análises de DNA mitocondrial, o genótipo TcI<sub>DOM</sub> emergiu há 23000 +/- 12000 anos atrás e correspondendo à entrada e as migrações iniciais do homem nas Américas.

Nossa análise da variabilidade genética em TcI baseou-se no trabalho de Yeo *et al* 2011, que utilizou a técnica de MLST e cujos alvos foram genes de evolução lenta como são os genes constitutivos. Nós escolhemos os marcadores que de acordo com Yeo *et al* (2011) mostravam maior variabilidade genética para o genótipo TcI, por ter este autor avaliado por este método, vários isolados de *T cruzi* de vários lugares de América, além de hospedeiros diferentes e por possibilitar uma comparação com nossos resultados.

### 6.3. Os Polimorfismos de TcI encontrados em isolados de *T cruzi* I de *Didelphis spp*

De um modo geral, observamos a existência de uma micro heterogeneidade presente nos isolados examinados, onde a maior diversidade foi observada no bioma Amazônia e a menor diversidade no bioma Caatinga, em concordância com a biodiversidade de mamíferos encontrada nas áreas.

Nossos resultados mostraram que não existe um padrão de distribuição dos haplótipos de TcI encontrados em relação aos biomas, excetuando o bioma Caatinga, como demonstrado pela árvore gerada com o gene *LYT1* e a árvore com os quatro genes concatenados (Figuras 5.8 e 5.9). A análise de MLST confirma esses resultados mostrando que os isolados do bioma Caatinga integram um mesmo Complexo Clonal (Figura 5.11) Adicionalmente, as amostras do bioma Caatinga foram obtidas de localidades diferentes e anos de coleta diferentes, como é o caso das amostras 11639 e 10171, correspondentes aos municípios de Russas (Ceara) e Raimundo Nonato(Piauí), que apresentaram o mesmo ST (ST J44 Tabela 5.6) indicando que estão relacionadas geneticamente. Observa-se também que STs, correspondentes aos biomas Mata Atlântica e Amazônia integraram um mesmo Complexo Clonal, como se mostra na figura 5.11.

A Tipagem por Sequências de Multilocus (MLST) foi originalmente proposto e padronizado para organismos haploides, leveduras e bactérias. A análise de MLST para avaliar a diversidade presente em *T cruzi* foi utilizado pela primeira vez por Machado e Ayala usando dois genes nucleares. O fato de termos escolhido a técnica de MLST foi por dois motivos: estávamos inseridos em um projeto da União Europeia que teve como objetivo estudar a ecologia das DTUs de *T cruzi* e o MLST foi um dos métodos propostos para a análise e pela possibilidade de agregar mais conhecimento sobre o assunto comparando nossos resultados com os de Yeo *et al* que incluiu isolados de *T cruzi* derivados de um amplo espectro de hospedeiros e áreas geográficas. A técnica tem como ponto favorável o fato que os dados são facilmente acessados já que foi construída uma base de dados internacional. Não é uma técnica particularmente custosa mas precisa de pessoal treinado para analisar os dados gerados (Yeo *et al*

2011). Um ponto negativo é que como o *T. cruzi* é uma espécie diploide, a análise por esse método, desenhado para organismos haploides, é mais complicada e picos duplos no cromatograma podem ser encontrados.

Picos duplos correspondem à leitura de dois nucleotídeos na mesma posição. A presença de picos duplos foi observada em algumas sequências por exemplo, nas posições 388 e 678 para o gene *LYT1* (Tabela 5.4). Os picos duplos podem ser resultado de dois fenômenos: podem sugerir a presença de heterozigose nas amostras ou a presença de populações policlonais, o que poderá ser confirmado apenas mediante a clonagem biológica das amostras de estudo (Cupolillo *et al* 2012). A suposição de que os picos no cromatograma são o resultado de heterozigose pode ser postulada com segurança se o alvo é um gene de cópia única (Lauthier *et al* 2012). Na nossa abordagem, todos os genes escolhidos para a análise correspondem a genes de cópia simples no genoma, de acordo com os dados proporcionados por Yeo *et al* no 2012. Mais mesmo sendo os genes escolhidos de cópia única, não podemos afirmar que as amostras são heterozigotas devido a que não são produto de clonagem biológica. Provavelmente ambos fenômenos estão presentes, pois eles foram descritos com frequência no *T. cruzi*

Nossos resultados mostraram que o fragmento de gene *LYT1* apresentou maior número de sítios polimórficos para TcI, concordando com o trabalho de Yeo *et al* do 2012 (Tabela 5.4) Mesmo com a dificuldade associada ao sequenciamento do gene *LYT1*, dito gene apresentou a árvore mais robusta em relação aos demais genes do estudo e mostrou concordância na topologia da árvore dos genes concatenados. As dificuldades de não obter sequências *forward* foi observada também por Yeo *et al* no 2011, o que pode ser devido à variabilidade na região do anelamento do *primer*.

Em contraste com os nossos resultados, no trabalho de Ramirez *et al* do 2013, o qual foi publicado só posteriormente à conclusão de nossas análises, e que foi realizado utilizando um total de 13 genes constitutivos num total de 50 clones biológicos, foi observado que o gene *GTP* apresentou o maior número de sítios polimórficos, seguido dos genes *GPX* e *SODB*, com 35 e 28 sítios polimórficos, respectivamente. Segundo o mesmo autor, o gene *LYT1* ocupou o quarto lugar na lista de genes com mais sítios polimórficos. Essa discordância de resultados observados

pode ser devido a diferenças entre os isolados de *T cruzi*; o que sugere que o universo do parasita é muito mais amplo do que conhecemos e, na medida em que é aumentado o número de amostras, outras variáveis podem ser encontrada com os mesmos genes escolhidos. Mesmo assim, de acordo com nossos resultados e os de Yeo sobre a variabilidade genética encontrada, o gene *LYT1* pode ser considerado como um alvo viável para o estudo da variabilidade na DTU Tcl. Associações desse gene com o gene *GTP* podem ser realizadas com vista a obter mais informações sobre polimorfismo em Tcl.

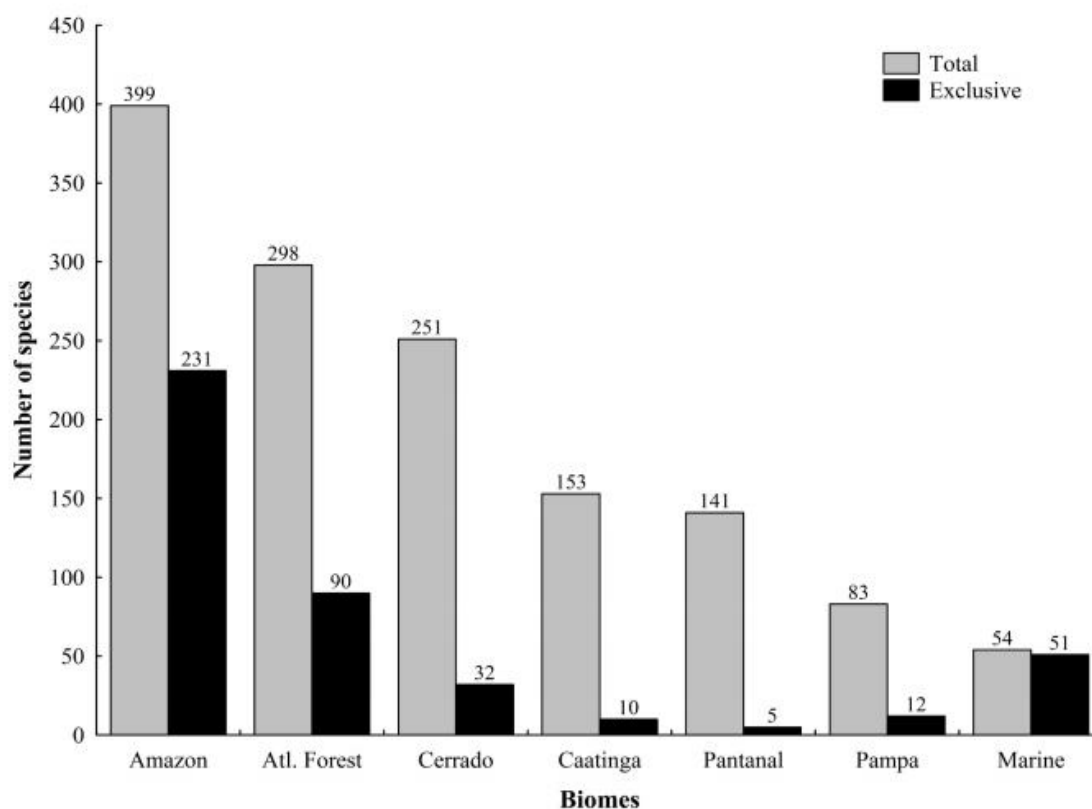
A topologia da árvore construída os fragmentos *DHFR-TS*, *MetIII* e *RB19* não foi congruente com a topologia da árvore concatenada. O fragmento de gene *DHFR-TS*, apresentou 3 sítios polimórficos. Esse número de polimorfismos observados na nossa análise se reflete na árvore da Figura 5.5, onde não se observou a formação de grupos devido à alta homogeneidade das amostras em relação a este gene. Esses resultados foram coincidentes com os resultados de Yeo *et al* no 2011, no qual para um total de 8 isolados de *T cruzi I* foram encontrados 2 sítios polimórficos.

O *MetIII* mostrou grupos com *bootstrap* robusto (Figura 5.7) sendo que esses grupos não estiveram relacionados com os biomas de origem das amostras do parasita. Em contraste com nossos resultados, Yeo *et al* no 2011, consideraram aos genes *RB19* e *METIII* como apropriados para estudos da diversidade genética em Tcl, uma vez que observaram um alto número de sítios polimórficos para esses genes.

#### **6.4. Padrão de distribuição dos grupos de Tcl a partir da análise das árvores filogenéticas e Tipagem por Sequências de Multilocus (MLST)**

O bioma Caatinga é a região do semiárido, ocupando a região Nordeste do território brasileiro e algumas áreas do estado de Minas Gerais. A Caatinga não apresenta a exuberância verde das florestas tropicais húmedas e o aspecto seco da fisionomia dominada por cactus e arbustos apresentam uma baixa diversificação de fauna e flora. (Figura 6.4). Em relação aos demais biomas deste estudo, o bioma Caatinga apresenta um ambiente bem diferente de acordo as características ecológicas observadas nesta área. Em relação a diversidade de espécies de mamíferos, a Caatinga ocupa o quarto lugar de acordo com as espécies presentes em cada bioma

do Brasil (Figura 6.1). Está localizado numa area de extensa depressão recoberta por uma vegetação xérica (que são vegetações que sobrevivem com pouca humedade), que cresce sobre solos rasos e está sujeita a longos periodos de seca. O bioma Caatinga, O Cerrado e o Chaco argentino e formam os chamados “Corredores de vegetações xéricas”, e esses corredores separam as duas maiores formações de florestas: Amazônia e Mata Atlântica (Camara e Galindo-Leal, 2003)



**Figura 6.1.** Número de espécies e número de espécies exclusivas a cada bioma no Brasil.



De acordo com os registros do LABTRIP sobre as viagens de coletas que forneceram as amostras utilizadas neste estudos, na Caatinga havia baixa diversidade de espécies de pequenos mamíferos. A riqueza de espécies de mamíferos da Caatinga para essas viagens foi de 8 espécies e a coleta esteve representada por 30% de *Didelphis albiventris* e 30% da espécie *Trychomys laurentius* (Tabela 4.3). O *Trychomys laurentius* é um roedor caviomorfo silvestre que pode frequentar o peridomicílio e que no ambiente silvestre está associado a afloramentos rochosos.

Lembrando que as diferentes espécies de mamíferos exercem distintas pressões seletivas sobre as populações de *T. cruzi*, é possível sugerir que a baixa diversidade de mamíferos numa área resulte em que o ciclo de *T. cruzi* inclua uma baixa diversidade de subpopulações. Como as amostras de DNA dos isolados analisados foram de lugares muito distantes e obtidos em épocas distintas, nossos resultados são suficientemente consistentes para sugerir que o bioma Caatinga possui a mais baixa diversidade genética de TcI.

Esse fenômeno já foi observado por Eichler em 1942, que propôs que a variedade de espécies hospederas esta relacionada à diversidade da fauna parasitária. Posteriormente, Van Zóltán no 2012, estudando famílias de aves e mamíferos observou uma grande correlação entre a riqueza de espécies de aves e mamíferos e sua riqueza parasitária, confirmando os resultados de Eichler.

Em contraste com o bioma Caatinga, o sequenciamento mostrou que isolados obtidos de mamíferos da Amazônia foram os mais polimórficos seguido de isolados de *T. cruzi* derivados de mamíferos de Mata Atlântica (Figura 5.9). Esse achados reforçam a relação da biodiversidade de espécies hospederas da área com a diversidade genética uma vez que Amazônia e Mata Atlântica são os biomas que apresentam a maior diversidade de mamíferos (Tabela 6.1)

A árvore construída com o gene *LYT1* e as árvores construídas com os genes concatenados, mostraram que os isolados de *T. cruzi* tanto da Mata Atlântica como da Amazônia, não foram discriminados em grupos distintos, observando-se que vários grupos formados nas árvores incluem isolados desses dois biomas. Além disso foi observado os isolados que integram os mesmos grupos correspondem a datas de

coleta muito distantes e de locais que se encontram a uma grande distância o que refletem as conexões geográficas existentes entre esses dois biomas.

O bioma Amazônia está formado por distintos habitats, como florestas densas de terra firme, florestas estacionais, florestas de igapó, campos alagados, várzeas, savanas, refúgios montanhosos e formações pioneiras. Esta diversidade resulta em um mosaico de fauna e habitats (Betts et al 2008). Na região da Amazonia brasileira, a transmissão enzootica de *T cruzi* tem sido reconhecida há várias décadas. (Deane, 1964; Lainson et al 1979, Miles et al 1982), mais o primeiro caso humano autóctono não foi descrito antes de 1969. (Shaw et al, 1969) A Mata Atlântica, é a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano e é considerado um dos *Hotspots* mundiais da biodiversidade. (Camara, 2003). De acordo aos estudos de Costa Leonora (2003) e Bigarella et al (1975) mostraram que o bioma Amazônia e o bioma Mata Atlântica no passado (Pleistoceno) formaram um contínuo, separadas depois pelas formações xéricas.

Os biomas Amazônia e a Mata Atlântica são regiões naturais que estão recobertas principalmente por extensas florestas tropicais. Essas duas regiões são separadas entre si por um corredor de formações abertas formado pelos biomas Caatinga, Cerrado e Pantanal.

A Mata Atlântica embora severamente reduzida (atualmente restam apenas 9.0% de remanescentes florestais) é considerada um *Hotspots* com diferentes espécies de *T cruzi*, com aproximadamente 300 espécies conhecidas de mamíferos. O bioma Mata Atlântica ainda apresenta rica biodiversidade, embora muitas espécies estejam seriamente ameaçadas de extinção.

Três das quatro amostras do Cerrado encontraram-se dispersos nos grupos sem posição definida nas árvores, o que poderia devese ao baixo número de amostras analisadas. Só a amostra 5574 se agrupou com as amostras do bioma Mata Atlântica tanto na árvore do gene *LYT1* quanto na árvore dos genes concatenados.

Cada espécie animal interage de modo peculiar com o *T cruzi* mantendo no sangue determinadas subpopulações de parasitas e controlando outras. Evidentemente as populações com várias chances de serem transmitidas, são as que permanecem mais tempo no sangue.

Em todos os biomas estudados, as espécies do gênero *Didelphis* apresentaram maior competência infetiva de TcI, esse fato é exposto por altas taxas de hemocultivos positivos.

Sendo o *Didelphis* spp uma espécie sinantrópica, generalista que circula por todos os estratos e habitats, pode ser considerado um bioacumulador e amplificador do parasita *T. cruzi* já que participa em todos os ciclos dos habitats.

Finalmente, nossos dados confirmam que o gênero *Didelphis* pode ser um bioacumulador da diversidade da DTU TcI de *T. cruzi*.



Figura 6.2. Bioma Amazônia

Fotografia: Ana Maria Jansen



Figura 6.3 Fotografia do bioma Cerrado

Fotografia: Ana Maria Jansen



Figura 6.4 Bioma Caatinga

Fotografia: Diego Assumpção



Figura 6.5 Bioma Mata Atlântica

Fotografia: Associação de Preservação do Meio Ambiente e da Vida.

# 7. CONCLUSÕES

- As amostras de *T cruzi* I isolados de marsupiais do gênero *Didelphis* pertencentes a quatro biomas do Brasil, apresentaram apenas uma micro heterogeneidade quando analisados com a técnica de Tipagem por Sequências de Multilocus.
- Isolados de *T cruzi* I obtidos de amostras de *Didelphis* sp pertencentes ao bioma Caatinga se apresentaram como uma população coesa e relacionada quando analisadas com a árvore construída com os genes concatenados.
- Isolados de *T cruzi* obtidos de amostras de *Didelphis* sp pertencentes às localidades do biomas Cerrado não mostraram uma posição definida na árvore com os genes concatenados, provavelmente devido ao escasso número de amostras utilizadas.
- Foi observada uma correspondência entre a diversidade genética de *T cruzi* I e a diversidade faunística das áreas onde foram realizadas as coletas correspondentes a cada bioma.
- O gene *LYT1* apresentou o maior número de sítios polimórficos nos isolados de *T cruzi* I, corroborando que ele constitui um gene recomendável para estudar variabilidade em *T. cruzi*.
- O gene *DHFR-TS* apresentou o menor poder discriminatório para a análise dos isolados de *T cruzi* I, o que se reflete na árvore do gene individual.
- Os genes *MetIII* e *RB19* apresentaram sítios polimórficos mas os grupos formados nas árvores individuais comparados com a árvore concatenada não foram congruentes.
- Não se observou a formação de grupos dos isolados de *T cruzi* I associados a surtos por via oral no bioma Amazônia, de acordo com a árvore construída com os genes concatenados..

- O método de Tipificação por Sequências de Multilocus constitui uma ferramenta útil para a análise de diversidade entre amostras de *T. cruzi*, ainda o seu uso é facilitado pela acessibilidade internacional.



## **8. REFERÊNCIAS**

- Abdussalam M. Significance of ecological studies of wild animal reservoirs of zoonoses. *Bull World Health Organ.* 1959;21(2):179–86.
- Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanozoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop*, 1974; 3: 65-121.
- Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983; 77: 796-799.
- Araújo CAC, Waniek PJ, Xavier SCC, Jansen AM. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. *Exp Parasitol.* 2011 Jan;127(1):308–12.
- Ashford RW. What it takes to be a reservoir host. *Belg J Zool.* 1997; 127: 85-90
- Austad SN. The Adaptable Opossum. *Sci Am.* 1988 Feb;258(2):98–104.
- Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw D, Gow NAR, et al. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 2007 May;45(5):1469–77.
- Bigarella J. J., Andrade – Lima D. & Riehs, PJ. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 1975, 47, 411-464.
- Brener Z . Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1971;13: 171–78.
- Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 Nov 30;104(2):219–32

- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 2001 Sep;31 (11):1218–26.
- Brito, D., Astua de Moraes, D., Lew, D., Soriano, P., Emmons, L., Cuarón, A.D, Helgen, K., Reid, R. & Vazquez, E. *Didelphis marsupialis*, In: [IUCN](#) 2008. IUCN Red List of Threatened Species.
- Camara I, Galindo-Leal. Mata Atlântica, *Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas*. Fundação SOS Mata Atlântica Conservação Internacional. 2003. Belo Horizonte.
- Cavazzana M Jr, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira ACV, Veludo HH, et al. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int J Parasitol.* 2010 Mar 1;40(3):345–55.
- Cerqueira R. The distribution of *Didelphis* in South America (Polyprotodontia, Didelphidae) 1985. *J. Biogeogr.* 12:135-45
- Cerqueira R, Lemos B. Morphometric differentiation between Neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae) *Mammalia.* 2000;64:319–327.
- Costa L. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography,* 2003, 30, 71–86
- Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal MV, et al. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *Int J Parasitol.* 2010 Dec;40(14):1599–607.

- Deane, M. P., Lenzi H. L. & Jansen A. M., *Trypanosoma cruzi* vertebrate and invertebrates cycles in the same mammals host the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem. Inst Oswaldo Cruz*, 1984. 79: 513-515.
- Debourgogne A, Gueidan C, Hennequin C, Contet-Audonneau N, de Hoog S, Machouart M. Development of a new MLST scheme for differentiation of *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) isolates. *J Microbiol Methods*. 2010 Sep;82(3):319–23.
- De Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, et al. Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*. 2006;2(3):e24.
- Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*. 2001 Jan;39(1):14-23.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1008–15.
- Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop*. 2009 Apr;110(1):15–21.
- Fernandes O, Santos S, Junqueira A, Jansen A, Cupolillo E, Campbell D, et al. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Memórias Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:1957.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, et al., 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*. 1998 Jun;58(6):807–11.

Fernandes MC, Flannery AR, Andrews N and Mortara RA. (2012). Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. *Cell Microbiol.*

Guimarães, F. N. & Jansen, G. Um foco potencial de tripanosomíase americana na cidade do Rio de Janeiro (Distrito federal). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1943. 39: 405-407.

Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, et al. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2007 Jul;7(4):5359.

Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SCC, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park “Serra da Capivara” and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005 May 1;99(5):379–88.

Herrera C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Montilla M, Adolfo Vallejo G, et al. Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. *J Parasitol Res.* 2009.

Jansen AM, Santos de Pinho AP, Lisboa CV, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. *Memórias Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:203–4.

Jiménez-Coello M, Acosta-Viana KY, Guzman-Marin E, Ortega-Pacheco A. American Trypanosomiasis Infection in Fattening Pigs from the South-East of Mexico. *Zoonoses Public Heal.* 2012;59:166–9.

Lauthier JJ, Tomasini N, Barnabé C, Rumi MMM, D'Amato AMA, Ragone PG, et al. Candidate targets for Multilocus Sequence Typing of *Trypanosoma cruzi*: Validation using parasite stocks from the Chaco Region and a set of reference strains. *Infect Genet Evol.* 2012 Mar;12(2):350–8.

- Lemos B, Cerqueira R. Morphological differentiation in the white-eared opossum group (didelphidae: didelphis). *J Mammal*. 2002 May;83(2):354–69.
- Llewellyn MS, Lewis MD, Acosta N, Yeo M, Carrasco HJ, Segovia M, et al. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(9):e510.
- Lisboa CV, Mangia RH, Luz SLB, Kluczkovski A Jr, Ferreira LF, Ribeiro CT, et al. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology*. 2006 Nov;133(Pt 5):603–11.
- Lisboa CV, Pinho AP, Herrera HM, Gerhardt M, Cupolillo E, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Vet Parasitol*. 2008 Oct 1;156(3-4):314–8.
- Lisboa CV, Xavier SC das C, Herrera HM, Jansen AM. The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Vet Parasitol*. 2009 Oct;165(1-2):19–24.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95 (6):3140–5.
- Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 2009 May;136(6):641–55.
- Mas Coma S. (2008). *Importancia de la Evolución en la parasitología y el interés de utilizar una aproximación evolutiva en los estudios parásitológicos*. Documento en línea, disponible en [http://www.sesbe.org/documentos\\_sesbe](http://www.sesbe.org/documentos_sesbe)

Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M, Doto D, Pralong F, Zemanova E, et al. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int J Parasitol*. 2006 Jun;36(7):757–69.

Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ*. 2003 Jun 28;326(7404):1444–8.

Miles MA, Lanham SM, de Souza AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980;74(2):221–37.

Miles MA, Povoá M, Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS 1981b. Chagas' disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981; 75: 667-674.

Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Tøye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978 Apr 27;272(5656):819–21.

Miles MA, Tøye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. 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*. 1977;71(3):217–25.

Monteiro WM, Magalhães LK, Santana Filho FS, Borborema M, Silveira H, Barbosa M das GV. *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. *Trop Med Int Heal TM IH*. 2010 Sep;15(9):1049–51.

Monteiro WM, Magalhães LKC, de Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJ de O, Borges L, et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PloS One*. 2012;7(7):e41284.

Mortara RA, Andreoli WK., Fernandes MC, da Silva CV, Fernandes AB, L'Abbate C and da SS. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Subcell. Biochem.* 2008; 47: 101-109.

Nallapareddy SR, Duh R-W, Singh KV, Murray BE. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar;40(3):868–76.

Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009 Apr;15(4):653–5.

Noireau F. Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104. 2009 (Suppl. I): 60-64.

Nowark Ronald M., Walker's mammals of the World. 5th Ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University. 1991; Press vol I.

PAHO — Pan-American Health Organization. Doença de Chagas — guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. 92pp. (2009). Available in: [http://bvs.panalimentos.org/local/File/Guia\\_Doenca\\_Chagas\\_2009.pdf](http://bvs.panalimentos.org/local/File/Guia_Doenca_Chagas_2009.pdf).

Pinho AP, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000 Oct;94(5):509–14.

Pinto CM, Ocaña-Mayorga S, Lascano MS, Grijalva MJ. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. *J Parasitol.* 2006 Dec;92(6):1251–5.

Ramírez JD, Duque MC, Guhl F. Phylogenetic reconstruction based on Cytochrome b (Cytb) gene sequences reveals distinct genotypes within Colombian *Trypanosoma cruzi* I populations. *Acta Trop.* 2011 Jul;119(1):61–5.



- Ramírez JD, Duque MC, Montilla M, Cucunubá Z, Guhl F. Natural and emergent *Trypanosoma cruzi* I genotypes revealed by mitochondrial (Cytb) and nuclear (SSU rDNA) genetic markers. *Exp Parasitol.* 2012 Dec;132(4):487–94.
- Ramírez JD, Montilla M, Cucunubá ZM, Floréz AC, Zambrano P, Guhl F. Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(2):e2041.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JÁ. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (suppl 1): 152–158.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010 Apr 17;375(9723):1388–402.
- Recommendations from a satellite meeting. *Memórias Inst Oswaldo Cruz.* 1999 Sep;94:429–32.
- Robertson A. Note on trypanosome morphologically similar to *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, found in opossum, *Didelphis marsupialis* captured at Tela, Honduras, Central America. XVIII<sup>th</sup> Ann Rep Med Dept Co. 1929, 293 - 310.
- Robles JC, Koreen L, Park S, Perlin DS. Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 2004 Jun;42(6):2480–8.
- Rodrigues, B. A. & Melo, G. B. Contribuição ao estudo da tripanossomíase americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* **37**:77-90, 1942.
- Rocha FL, Roque ALR, Arrais RC, Santos JP, Lima V dos S, Xavier SC das C, et al. *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. *Parasitology.* 2013 Feb;140(2):160–70.

Roque ALR, Xavier SCC, da Rocha MG, Duarte ACM, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Nov;79(5):742–9.

Schofield C. *Trypanosoma cruzi* - the vector-parasite paradox. *Memórias Inst Oswaldo Cruz.* 2000 Aug;95(4):535–44.

Shaw J, Lainson R, Fraiha H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev Saude Publica.* 1969 3: 153-157.

Silveira AC. Epidemiological and social determinants of Chagas disease and its control in the Amazon countries--group discussion. *Memórias Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Oct 30;102 Suppl 1:71–4.

Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 2006 Apr;22(4):168–74.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 Dec 20;83(2):141–52.

Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(8): e1749.

Thomas S, Westenberger SJ, Campbell DA, Sturm NR. Intragenomic spliced leader RNA array analysis of kinetoplastids reveals unexpected transcribed region diversity in *Trypanosoma cruzi*. *Gene.* 2005 Jun 6;352:100–8.

Tibayrenc M. Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases. *Parasitol Today Pers Ed.* 1998 Aug;14(8):323–9.

- Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Apr;87(7):2414–8.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jan;83(1):115–9.
- Tomasini N, Lauthier JJ, Llewellyn MS, Diosque P. MLSTest: novel software for multi-locus sequence data analysis in eukaryotic organisms. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2013 Dec;20:188–96.
- Tomasini N, Lauthier JJ, Monje Rumi MM, Ragone PG, Alberti D'Amato AA, Pérez Brandan C, et al. Interest and limitations of Spliced Leader Intergenic Region sequences for analyzing *Trypanosoma cruzi* I phylogenetic diversity in the Argentinean Chaco. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2011 Mar;11(2):300–7.
- Toso M A, Vial U F, Galanti N. [Oral transmission of Chagas' disease]. *Rev Médica Chile*. 2011 Feb;139(2):258–66.
- Toyé PJ. Isoenzymic differences between culture forms of *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi*, and *T. lewisi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1974;68(4):266.
- Tyler KM, Engman DM. The life-cycle of *Trypanosoma cruzi*. In: Tyler KM, Miles MA, eds. *American trypanosomiasis. World class parasites: vol 7*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 2003; 1–11.
- Zoltán Vas & Gábor Csorba & Lajos Rózsa. Evolutionary co-variation of host and parasite diversity—the first test of Eichler's rule using parasitic lice (Insecta: Phthiraptera)

---

Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*. 2005 Oct;171(2):527–43.

WHO 2002; López-Céspedes et al. 2012

Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GAJ, et al. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol*. 2005 Feb;35(2):225–33.

Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Acosta N, et al. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Jun;5(6):e1049.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Nov;104(7):1051–4.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2012 Mar;12(2):240–53.

# **9. ANEXOS**

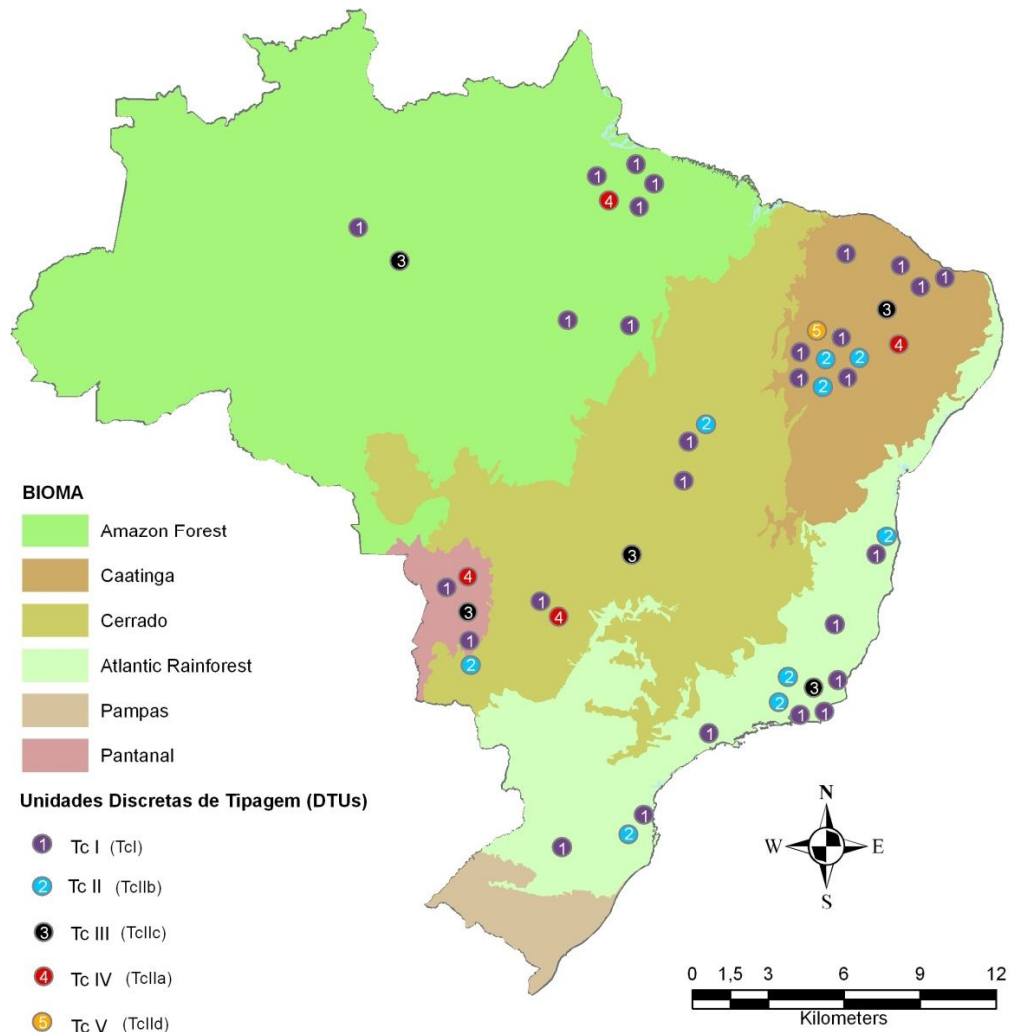
**Anexo 1:** Lista de isolados utilizados no estudo da variabilidade genética de TcI. Se mostram as localidades de origem dos isolados, a data de coleta e o hospedeiro reservatório

AMAZONIA							
LBCE	Gênero	Espécie	Sexo	Data	Estado	Município	Localidade
12625	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	F	05/11/2008	PA	Abaetetuba	Ajuai
12628	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	F	06/11/2008	PA	Abaetetuba	Ajuai
12640	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	M	09/11/2008	PA	Abaetetuba	Genipauba, Comunidade Quilombola
10272	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	F	29/11/2006	PA	Cachoeira do Arari	Furinho
10285	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	S/D	01/12/2006	PA	Cachoeira do Arari	Mata Fome
10290	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	F	02/12/2006	PA	Cachoeira do Arari	Aranaí
12667	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	F	21/09/2009	Pará	Currálinho	João José da Povoação - area de surto
12668	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	nd	21/09/2009	Pará	Currálinho	João José da Povoação
12964	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	M	22/09/2009	Pará	Currálinho	João José da Povoação
6716	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	F	30/09/2004	PA	Itupiranga	Asentamento Benfica I
6723	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	F	30/09/2004	PA	Itupiranga	Asentamento Benfica I
6737	<i>Didelphis</i>	<i>marsupialis</i>	F	30/09/2004	PA	Itupiranga	Asentamento Benfica I
CAATINGA							
LBCE	Gênero	Espécie	Sexo	Data	Estado	Município	Localidade
6824	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	F	09/12/2004	CE	Jaguaruana	Dio
M3	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	nd	08/10/1998	PI	Coronel Jose Dias	Moco
8648	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	F	08/09/2005	CE	Jaguaruana	Caatinginha
8622	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	M	06/09/2005	CE	Jaguaruana	Caatinginha
11639	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	F	13/06/2008	CE	Russas	Miguel Pereira
3510	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	F	02/05/2001	CE	Jaguaruana	Figueiredo do Bruno
6812	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	F	08/12/2004	CE	Jaguaruana	Caatinginha
6813	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	M	08/12/2004	CE		Caatinginha
M1	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	ND	08/10/1998	PI	Coronel Jose Dias	Moco
10171	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	F	24/10/2006	PI	Raimundo Nonato	Jurubeba

CERRADO							
LBCE	Gênero	Espécie	Sexo	Data	Estado	Município	Localidade
9149	Didelphis	albiventris	F	08 06 2006	GO	APORE	USINA ESPORA - OHE
9425	Didelphis	albiventris	F	01 08 2006	GO	APORE	USINA ESPORA - OHE
8552	Didelphis	albiventris	F	07 09 2005	GO	APORE	USINA ESPORA - OHE
5574	Didelphis	aurita	M	20 07 2003	MG	Capitao Andrade	Rocha
MATA ATLANTICA							
LBCE	Gênero	Espécie	Sexo	Data	Estado	Município	Localidade
D7	Didelphis	marsupialis	F	21 03 1996	RJ	Silva Jardim	Fazenda bom retiro
G05	Didelphis	marsupialis	nd	28 07 2003	RJ	Silva Jardim	Reserva Biologica de Poco das Antas
G15	Didelphis	marsupialis	nd	31 07 2003	RJ	Silva Jardim	Fazenda Santa Helena
G45	Didelphis	marsupialis	nd	01 01 2001	Rj	Guapimirim	Centro de Primatologia d Rio de Janeiro
G41	Didelphis	marsupialis	M	1 01 2001	RJ	Guapimirim	Centro de Primatologia d Rio de Janeiro
7313	Didelphis	aurita	M	30/03/2005	SC	Navegantes- surto	Rio Pequeno (Reinaldo Rosa)
7301	Didelphis	aurita	M	07/04/2005	SC	Camboriu	Rio Pequeno (Reinaldo Rosa)

**Obs:** *Didelphis marsupialis* pertencentes ao Bioma Mata Atlântica, estado do RJ foram reclassificadas como *Didelphis aurita* mediante análises posteriores.

## Anexo 2



Distribuição geográfica das DTUs de *Trypanosoma cruzi* no Brasil de acordo com os isolados pertencentes à ColTryp. (Coleção de Trypanosomas de mamíferos silvestres, domésticos e vetores)