

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Filogenética dos Genes que Codificam as Subunidades I e II da Citocromo  
Oxidase de *Trypanosoma cruzi***

por

**RAFAEL MIRANDA DE SOUZA**

Orientação: Dra Silvane Maria Fonseca Murta

Coorientação: Dra Laila Alves Nahum

Março de 2019

Belo Horizonte

**RAFAEL MIRANDA DE SOUZA**

**Filogenética dos Genes que Codificam as Subunidades I e II da Citocromo  
Oxidase de *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito de obtenção do título de Mestre em Ciências - Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Silvane Maria Fonseca Murta  
Coorientação: Dra. Laila Alves Nahum

Belo Horizonte  
2019

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

M672f      Miranda, Rafael de Souza.  
2019

Filogenética dos Genes que Codificam as Subunidades I e II da Citocromo Oxidase de *Trypanosoma cruzi*/ Rafael Miranda de Souza. – Belo Horizonte, 2019.

IX, 58 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 49-58

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. *Trypanosoma cruzi*/classificação 2. genes mitocondriais 3. citocromo oxidase I. Título. II. Murta, Silvane Maria Fonseca (Orientação). III. Nahum, Laila Alves (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à orientadora Dra. Silvane Murta e à coorientadora Dra. Laila Nahum, que auxiliaram na execução deste trabalho. Foram dois anos de aprendizado profissional.

Muito obrigado à Dra. Bianca Ziangales, Dr. Egler Chiari e Dra. Rita de Souza por gentilmente cederem algumas cepas do *T. cruzi* que foram analisadas nesse trabalho.

Agradeço também à Secretaria Acadêmica, à Biblioteca e demais integrantes do IRR que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço também ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS-FIOCRUZ) pelo trabalho prestado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço ao apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG, IRR, que foi fundamental para a execução desse trabalho.

## RESUMO

O gênero *Trypanosoma* contém espécies causadoras de doenças humanas importantes, tais como: *T. brucei* (doença do sono) e *T. cruzi* (doença de Chagas). Espécies de *Trypanosoma* pertencem à ordem Kinetoplastida que tem como característica a presença de uma mitocôndria única na qual está situado o cinetoplasto contendo o DNA mitocondrial ou DNA do cinetoplasto (kDNA). O kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares: os minicírculos e os maxicírculos, que estão organizados em rede. Os maxicírculos contêm genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo energético da mitocôndria, tais como: subunidades de NADH desidrogenase e de citocromo oxidase. Os alvos moleculares escolhidos para a realização do presente trabalho são os genes que codificam as subunidades I e II (COI e COII) da citocromo oxidase. Tais alvos são amplamente distribuídos entre diversos grupos taxonômicos, possuem região gênica diversificada, suas respectivas proteínas contêm domínios funcionais conservados e regiões variáveis e possuem baixo polimorfismo ancestral. O objetivo do presente trabalho foi investigar as relações evolutivas de genes mitocondriais da COI e COII de diferentes cepas de *T. cruzi* para obtenção de informações sobre os alvos de estudo. Em 2018, 98 e 479 sequências de nucleotídeos dos genes da COI e COII de *Trypanosoma* estavam disponíveis nos bancos de dados públicos, respectivamente. Os iniciadores específicos amplificaram com eficiência fragmentos de 936 pb e 629 pb dos genes da COI e COII, respectivamente, nas amostras de *T. cruzi* pertencentes a seis diferentes DTUs (*Discrete Typing Units*): TcI a TcVI. A partir dos dados de sequenciamento, foi calculada a composição de bases indicando uma maior porcentagem de AT, congruente com os dados de genes mitocondriais. Os alinhamentos foram usados na reconstrução de árvores de máxima verossimilhança com sequências dos genes da COI e COII de 55 e 57 cepas de *T. cruzi*, respectivamente. Reconstruções filogenéticas dos genes da COI e COII identificaram clados com valores de apoio estatístico significativo para as DTUs de *T. cruzi*. Tais clados correspondem a TcI, TcII e TcIII-TcIV-TcV-TcVI. Estes resultados são congruentes com os descritos por outros grupos de pesquisa e fornecem perspectivas de um novo método de caracterização dos parasitos.

**Palavras chave:** *Trypanosoma cruzi*, genes mitocondriais, citocromo oxidase, inferência filogenética, evolução molecular.

## ABSTRACT

The *Trypanosoma* genus contains species that cause important human diseases, such as: *T. brucei* (sleeping sickness) and *T. cruzi* (Chagas disease). *Trypanosoma* species belong to the Kinetoplastida order that has as characteristics the presence of a unique mitochondria in which is located the kinetoplast containing mitochondrial DNA or kinetoplast DNA (kDNA). The kDNA is composed of two types of circular molecules: minicircles and maxicircles, which are organized in a network. Maxicircles contain genes that encode proteins involved in the energetic metabolism of mitochondria, such as: subunits of NADH dehydrogenase and cytochrome oxidase. The molecular targets chosen to carry out the present work are the genes encoding the cytochrome oxidase subunits I and II (COI and COII). These targets are widely distributed among various taxonomic groups, have a diverse gene region, their respective proteins contain conserved functional domains and variable regions, and they have low ancestral polymorphism. The objective of the present work was to investigate the evolutionary relationships of COI and COII mitochondrial genes from different *T. cruzi* strains to obtain information about the study targets. In 2018, 98 and 479 nucleotide sequences of the COI and COII genes of *Trypanosoma* were available in the public databases, respectively. Specific primers efficiently amplified fragments of 936 bp and 629 bp of the COI and COII genes, respectively, in *T. cruzi* samples belonging to six different DTUs (*Discrete Typing Units*): TcI to TcVI. From the sequencing data, the base composition was calculated indicating a higher percentage of AT, which is congruent with the data of mitochondrial genes. Alignments were used in the reconstruction of maximum likelihood trees with sequences of the COI and COII genes from 55 and 57 *T. cruzi* strains, respectively. Phylogenetic reconstructions of COI and COII genes identified clades with significant statistical support values of *T. cruzi* DTUs. Such clades correspond to TcI, TcII e TcIII-TcIV-TcV-TcVI. These results are congruent with those described by other research groups and provide insights into a new method of parasite characterization.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, mitochondrial genes, cytochrome oxidase, phylogenetic inference, molecular evolution.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> .....	13
Figura 2: Principais métodos científicos empregados na classificação de <i>T. cruzi</i> .....	15
Figura 3: Posição do kDNA nas formas biológicas do parasito.....	17
Figura 4: Representação do maxicírculo de <i>T. cruzi</i> CL Brener e Esmeraldo.....	17
Figura 5: Estrutura de ligação das subunidades I e II da citocromo oxidase.....	19
Figura 6: Representação esquemática do fluxograma usado no presente estudo.....	22
Figura 7: Análise dos fragmentos do gene da COII e diferentes padrões de digestão com a enzima <i>AluI</i> em cepas de <i>T. cruzi</i> .....	29
Figura 8: Análise dos fragmentos da região intergênica do <i>spliced leader</i> (SL-IR) e do domínio D7 do gene 24S $\alpha$ rDNA de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> .....	30
Figura 9: Amplificação parcial do gene da COI e completa do gene COII das cepas de <i>T. cruzi</i> .....	34
Figura 10: Visão parcial dos alinhamentos de sequências de <i>T. cruzi</i> .....	40
Figura 11: Árvore de máxima verossimilhança de 55 sequências do gene da COI de <i>T. cruzi</i> .....	41
Figura 12: Árvore de máxima verossimilhança de 57 sequências do gene da COII de <i>T. cruzi</i> .....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências nucleotídicas de <i>Trypanosoma</i> recuperadas de bancos de dados.....	28
Tabela 2: Qualidade das sequências após sequenciamento.....	34
Tabela 3: Composição de bases das sequências parciais do gene da COI.....	36
Tabela 4: Composição de bases das sequências completas do gene da COII.....	38

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação das cepas de <i>T. cruzi</i> .....	16
Quadro 2: Marcadores moleculares e iniciadores utilizados no presente trabalho.....	24
Quadro 3: Informações sobre amostras de 64 cepas de <i>T. cruzi</i> analisadas.....	31



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- BIC** - *Bayesian Information Criterion*
- BZ** - Benzonidazol
- COI** - Subunidade I da citocromo oxidase (gene *cox1*)
- COII** - Subunidade II da citocromo oxidase (gene *cox2*)
- COLTRYP** - Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores
- DTUs** - *Discrete Typing Units*
- EuPathDB** - *Eukaryotic Pathogen Genomics Database Resource*
- GAPDH** - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- IRR** - Instituto René Rachou
- kDNA** - DNA de cinetoplasto
- LIT** - Triptose de infusão de fígado
- NADH** - nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*
- NFX** - Nifurtimox
- PBS** - Salina tamponada com fosfato
- PCR** - *Polymerase Chain Reaction*
- PDTIS** - Plataforma de sequenciamento do IRR
- RAPD** - *Random amplified polymorphic DNA*
- RFLP** - *Restriction fragment length polymorphism*
- SFB** - Soro fetal bovino
- SL-IR** - *Spliced-leader intergenic region*
- ITS** - *Internal transcribed spacer*
- TriTrypDB** - *Kinetoplastid Genome Resource*
- UFMG** - Universidade Federal de Minas Gerais
- USP** - Universidade de São Paulo
- UV** - Ultravioleta
- Z1** - Zimodema 1
- Z2** - Zimodema 2
- Z3** - Zimodema 3
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- µl** - Microlitro
- °C** - Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	10
1.1 Histórico da doença de Chagas.....	12
1.2 Diversidade genética de <i>T. cruzi</i> .....	15
1.3 O cinetoplasto.....	17
1.4 A citocromo oxidase.....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	21
3.1 Organismos e sequências moleculares.....	21
3.2 Obtenção de amostras laboratoriais.....	22
3.3 Cultivo de formas epimastigotas.....	23
3.4 Extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio.....	23
3.5 Genotipagem das cepas de <i>T. cruzi</i> .....	23
3.6 Desenho de iniciadores específicos para os alvos de estudo.....	25
3.7 Amplificação por PCR.....	26
3.8 Purificação e sequenciamento de DNA.....	26
3.9 Montagem de sequências nucleotídicas.....	26
3.10 Alinhamentos e árvores evolutivas.....	27
<b>4 RESULTADOS</b> .....	28
4.1 Busca em bancos de dados.....	28
4.2 Genotipagem das cepas de <i>T. cruzi</i> .....	29
4.3 Amplificação dos genes da COI e da COII.....	34
4.4 Análise das sequências nucleotídicas.....	35
4.5 Composição de bases das sequências de <i>T. cruzi</i> .....	37
4.6 Alinhamento de múltiplas sequências de <i>T. cruzi</i> .....	41
4.7 Relações filogenéticas.....	42
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	49

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O *Trypanosoma cruzi*, é um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Membros desta família são amplamente distribuídos em diferentes áreas geográficas e causam doenças ao homem como a doença de Chagas, causada pelo *T. cruzi*, a doença do sono cujo agente etiológico é o *T. brucei* e as Leishmanioses causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* (VICKERMAN, 1994). Em conjunto estas doenças tropicais negligenciadas atingem milhões de pessoas no mundo. Muitas questões sobre a biologia evolutiva dos tripanosomatídeos ainda são desconhecidas (ZINGALES *et al.*, 2012).

A doença de Chagas constitui um grande problema de saúde pública da América Latina e está inserida no quadro das doenças tropicais negligenciadas, sendo portanto alvo de estudo de vários grupos de pesquisa. O ciclo biológico do *T. cruzi* é muito complexo, apresentando três formas evolutivas distintas, entre o inseto vetor e o hospedeiro vertebrado. A doença de Chagas apresenta duas fases distintas: aguda que pode ocasionar febre, mal-estar e edemas e fase crônica onde alguns indivíduos podem não apresentar sintomas (forma indeterminada) ou apresentar manifestações clínicas graves, tais como, insuficiência cardíaca (forma cardíaca), megaesôfago e megacólon (forma digestiva) ou ambos (forma cardiodigestiva) (NEVES, 2011).

Atualmente, diversos marcadores moleculares vêm sendo utilizados para análises de polimorfismo genético e inferências filogenéticas, sendo que os mais utilizados são os genes ribossomais (SSU rRNA) e o gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Estes marcadores demonstraram que o clado de *T. cruzi* juntamente com *T. rangeli* evoluíram a partir de um ancestral comum de *Trypanosoma* de morcegos (LIMA *et al.*, 2013). Estudos da região intergênica de genes mitocondriais (por exemplo, gene que codifica a subunidade II da citocromo oxidase - COII) e região intergênica do *spliced leader* (SL-IR) ou miniexon (sequência de 39 nucleotídeos adicionada na região 5' dos RNAs codificantes durante a maturação do mRNA, sendo parte do processo de *transplicing*), permitiu a detecção e tipagem simultânea de *T. cruzi* e *T. rangeli*, sendo, portanto, uma ferramenta confiável para estudo onde estas duas espécies coexistem. Mais recentemente, genes codificadores de catepsina L-like também foram estudados (DE-SÁ *et al.*, 2013).

Um trabalho proposto por Hamilton e colaboradores (2007) através da reconstrução filogenética baseada em sequências de SSU rDNA identificaram um clado de *T. equiperdum* e *T. brucei*. Além disso, o estudo demonstrou que sequências de *T.*

*grayi*, parasito encontrado em crocodilos, forma um clado com *T. vespertilionis*. Uma provável explicação é a origem geográfica. *T. grayi* é encontrado em crocodilos especialmente na Nigéria, enquanto que *T. vespertilionis* é um parasito encontrado infectando morcegos na região da África, Europa e Ásia.

Os tripanosomatídeos apresentam como característica principal a presença de uma estrutura conhecida como cinetoplasto que contém o kDNA. O kDNA é composto por moléculas circulares de DNA (minicírculos e maxicírculos). Um dos fenômenos mais característicos destes organismos, do ponto de vista evolutivo, é a edição de RNA mitocondrial ou RNA *editing*. Ele consiste na inserção e eliminação de uracila em RNAs sem sentido genético com a finalidade de obter mensageiros com sentido (Stuart e Panigrahi, 2002). Um complexo de moléculas de RNA e proteínas, auxiliado pelos RNAs guia, está envolvido no mecanismo de transcrição. Os genes contidos nessas moléculas circulares sofrem modificação pós-transcricional por edição de RNA (ALVES, 2010).

O *T. cruzi* representa um conjunto de populações distintas, composta por cepas que apresentam origem e características diferentes. Atualmente as diferentes cepas de *T. cruzi* são identificadas por um método de genotipagem molecular capaz de realizar a separação em seis possíveis DTUs (*Discrete Typing Units*) TcI a TcVI (ZINGALES *et al.*, 2012). Porém, esse método de genotipagem pode gerar falhas na identificação das DTUs, uma vez que ele contém várias etapas consecutivas e dependentes, como amplificação de determinado alvo para corte com enzimas de restrição (FLORES-LÓPEZ, MACHADO, 2011).

Os alvos moleculares escolhidos para a realização do presente trabalho são os genes que codificam as subunidades I e II da citocromo oxidase (COI e COII). O gene da COI tem sido usado em estudos de código de barras de DNA (*DNA barcoding*) para a identificação de espécies conhecidas e o reconhecimento de novas. Este marcador tem se mostrado eficaz na identificação de pássaros, borboletas, peixes, moscas e outros grupos de animais (DAWNAY *et al.*, 2007; PAGÈS *et al.*, 2009).

Neste estudo foi investigada a biodiversidade molecular e as relações evolutivas de genes mitocondriais da COI e COII de diferentes cepas de *T. cruzi*, usando uma abordagem computacional e experimental para obtenção de informações sobre os alvos de estudo, contribuindo para o conhecimento das relações evolutivas desse parasito. A proposta deste trabalho é fornecer uma metodologia simples e que possa ser usada pela

comunidade científica em seus diferentes estudos, principalmente na epidemiologia da doença de Chagas, além de contribuir para o estudo da biodiversidade molecular.

### 1.1 Histórico da doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase americana é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado da Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae. Essa doença constitui um dos maiores problemas de saúde pública da América Latina e está inserida no quadro das doenças tropicais negligenciadas. Ela foi descrita pela primeira vez pelo médico sanitarista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas e seus estudos incluíram a descrição do ciclo de vida do parasito, seus vetores e diagnóstico (CHAGAS, 1909). Estima-se que cerca de oito milhões de pessoas na América Latina estão infectadas com o *T. cruzi* e anualmente 13 mil vão a óbito, especialmente em função da cardiomiopatia crônica (MONCAYO e Silveira, 2009, PAHO, 2018). A doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina, sendo que atualmente a Bolívia possui a maior prevalência da doença (CHATELAIN, 2015). Essa doença tem incidência de 28 mil casos por ano e estima-se que 65 milhões de pessoas vivem em áreas com risco de contrair a doença de Chagas (PAHO, 2018). A migração de pacientes infectados de regiões rurais para áreas urbanas e outras regiões do mundo está expandindo a distribuição geográfica e alterando a epidemiologia da doença de Chagas (CHATELAIN, 2015).

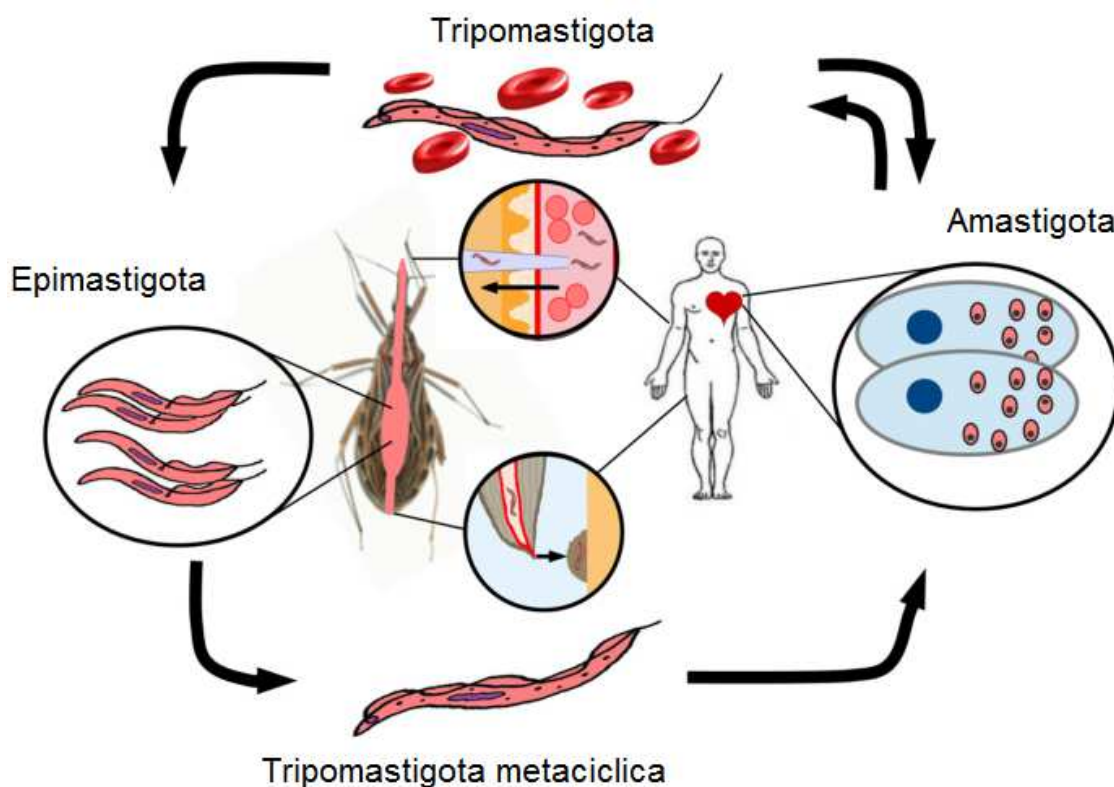
O *T. cruzi* é transmitido pelas fezes de triatomíneo insetos, da família Reduviidae, infectadas com o parasito. Sendo assim, afastar estes insetos infectados das moradias tende a ser o principal enfoque preventivo no controle da doença de Chagas (VILLELA *et al.*, 2009). Outras medidas preventivas incluem: a melhoria das moradias rurais e das condições de higiene, o afastamento dos animais das casas e a limpeza frequente das palhas e roupas, locais que podem alojar o inseto (FERREIRA, 2011). Outras formas de transmissão da doença de Chagas incluem transmissão congênita, transfusão sanguínea ou transplante de órgãos e pela ingestão de alimentos ou fluidos contaminados (BRENER, ANDRADE, BARRAL; 2000).

O ciclo de vida do *T. cruzi* apresenta três formas biológicas entre o vetor e o hospedeiro vertebrado (**Figura 1**). Uma das formas, as epimastigotas flageladas, são encontradas na porção média do trato digestivo do inseto vetor que se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante para o homem. Durante o repasto sanguíneo, essas formas são excretadas juntamente com as fezes do inseto

vetor, penetram na pele ou mucosa do hospedeiro mamífero e atingem a corrente sanguínea. Uma vez no sangue do hospedeiro, os parasitos invadem vários tipos celulares (macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, dentre outros) e se diferenciam em amastigotas que se multiplicam por sucessivas divisões binárias no citoplasma celular (CARREA, DIAMBRA, 2016).

Aproximadamente quatro dias após a infecção, as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas rompendo as células infectadas. Essas formas são liberadas no meio extracelular, podendo infectar as células vizinhas, cair na corrente sanguínea ou serem ingeridas por triatomíneos ainda não parasitados dando continuidade ao ciclo de transmissão da doença (**Figura 1**) (TANOWITZ *et al.*, 1992).

**Figura 1:** Ciclo biológico do *T. cruzi*



Fonte: Adaptado (CARREA, DIAMBRA, 2016)

O *T. cruzi* era transmitido na natureza entre animais silvestres e triatomíneos, conhecidos popularmente como barbeiros, porém com a intrusão do homem no ambiente natural no qual circulava o protozoário deu-se início a antroponose. Diante disso, algumas espécies de triatomíneos foram introduzidas, ativa ou passivamente, em suas habitações e estabeleceram novos ciclos de transmissão. Dessa maneira o homem

com sua ocupação predatória passou a fazer parte da cadeia epidemiológica da doença de Chagas (RASSI, MARIN-NETO, 2009).

Os indivíduos infectados com *T. cruzi* podem apresentar duas fases clínicas da doença: aguda e crônica. Na fase aguda ocorre uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*, com um alto parasitismo sanguíneo e tecidual nos primeiros meses de infecção (dois a quatro). Ela é frequentemente assintomática ou pode se manifestar como uma doença febril. A fase subsequente, conhecida como crônica indeterminada, não apresenta sintomatologia importante do ponto de vista clínico e pode durar vários anos. A maioria dos portadores da doença de Chagas persiste nessa fase pelo resto de suas vidas. Dentre os pacientes infectados, uma proporção pequena de indivíduos desenvolvem as formas crônicas cardíaca (20-30%) ou digestiva (10%) com comprometimento cardíaco ou digestivo (megaesôfago/megacolon), respectivamente (BRENER, GAZINELLI, 1997).

O tratamento da doença de Chagas se baseia na utilização dos fármacos Benzonidazol (BZ) ou Nifurtimox (NFX), pertencentes à família dos nitroherocíclicos. Ambos compostos causam uma série de efeitos colaterais graves, exigem longos períodos de tratamento e apresentam baixa eficácia de cura principalmente na fase crônica da doença de Chagas (apenas 8%) (SALES-JUNIOR *et al.*, 2017). O NFX e BZ são efetivos na cura da infecção na fase aguda, levando 76% dos pacientes tratados à cura parasitológica (CANÇADO, 2002).

Em crianças de baixa idade com infecção crônica recente foi demonstrado cerca de 55,8% de cura após o tratamento com BZ (ANDRADE *et al.*, 1996). Dentre as causas dessa baixa eficácia de cura, podem-se citar as variações na susceptibilidade das diferentes cepas de *T. cruzi* aos compostos BZ e NFX, as propriedades farmacocinéticas desfavoráveis desses fármacos, estágio da doença, imunidade do hospedeiro e os efeitos colaterais indesejáveis que muitas vezes levam à interrupção do tratamento (URBINA, 2010).

No mecanismo de ação de ambos compostos, o grupo nitro é reduzido por enzimas nitroredutases produzindo radicais livres intermediários e metabólicos eletrofílicos. O mecanismo de ação do BZ ainda não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que metabólitos reduzidos produzidos a partir desse composto se ligam covalentemente aos componentes do parasito como DNA, lipídeos e proteínas, inibindo o seu crescimento (DÍAS DE TORANZO *et al.*, 1988). Por outro lado, a ação do nifurtimox se deve a geração de radicais livres que se ligam ao DNA e proteínas do parasito, danificando-os.

## 1.2 Diversidade genética de *T. cruzi*

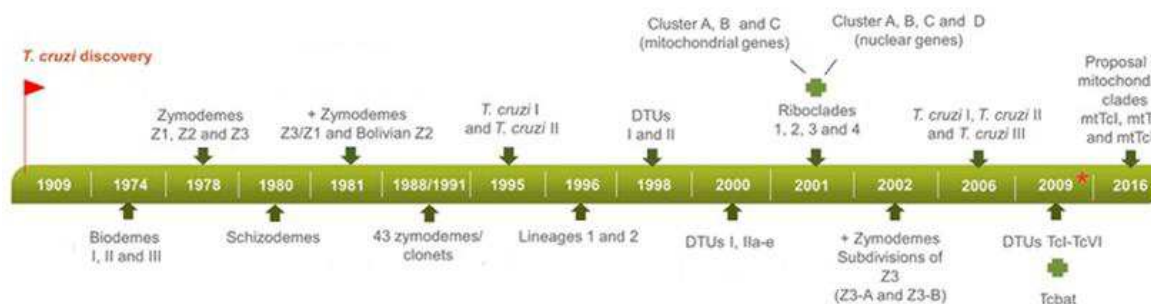
O *T. cruzi* representa um conjunto de populações distintas, composta por um grupo de cepas que apresentam diferentes origens e características biológicas. Esta grande variação intra-específica foi observada por caracterização biológica e molecular, que incluem morfologia de formas sanguíneas, curva de parasitemia, virulência, patogenicidade, sensibilidade a drogas, perfil antigênico, taxa de crescimento, metaciclogênese e tropismo por tecidos (MURTA, ROMANHA, 1999; MACEDO *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2006).

Diversos estudos que envolvem a caracterização de cepas de *T. cruzi* foram realizados para compreender o comportamento biológico e de perfil genético das cepas do parasito. A divisão das cepas de *T. cruzi* tem passado por revisões e mudanças ao longo do tempo (MURTA *et al.*, 1998; RODRIGUES, MORELLI, JANSEN, 2017; ZINGALES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2017).

A caracterização de populações do *T. cruzi*, inicialmente foi realizada utilizando análise eletroforética de variantes de enzimas celulares (isoenzimas). Baseado na variabilidade das isoenzimas, Miles e colaboradores (1977, 1978, 1980) propuseram a existência de três grupos isoenzimáticos do *T. cruzi*, chamados zimodemas Z1, Z2 e Z3. Estudos epidemiológicos demonstraram que os zimodemas 1 e 3 estavam associados com o ciclo silvestre, enquanto que o zimodema 2 estava associado com o ciclo doméstico de transmissão (MILES *et al.*, 1978, 1980). Posteriormente outras metodologias moleculares foram utilizadas para a caracterização do *T. cruzi* e demonstraram a grande diversidade genética desse parasita, como polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) do kDNA (esquizodemas) (MOREL *et al.*, 1980); DNA “fingerprinting” (MACEDO *et al.*, 1992); polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*random amplified polymorphic DNA*- RAPD) (STEINDEL *et al.*, 1993; TIBAYRENC *et al.*, 1993); microssatélites (OLIVEIRA *et al.*, 1998), entre outras tem sido utilizadas (**Figura 2**).



**Figura 2:** Principais métodos científicos empregados na classificação de *T. cruzi*



Fonte: Adaptado (RODRIGUES, MORELLI, JANSEN, 2017)

A ausência de uma classificação comum dificulta o estabelecimento de uma relação entre a diversidade do parasito e as complexas manifestações clínicas e epidemiológicas da doença. Estudos utilizando marcadores nucleares, como genes que codificam o RNA ribossomal 24S $\alpha$  e o miniexon, permitiram a divisão das cepas de *T. cruzi* em dois grupos distintos chamados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (SOUTO *et al.*, 1996, BUSCAGLIA e DI NOIA, 2003). Em abril de 1999, durante o Simpósio Internacional Comemorativo dos 90 anos da descoberta da doença de Chagas, no Rio de Janeiro, foi adotada a subdivisão da espécie de *T. cruzi* em duas linhagens principais. Foi oficializada a nomenclatura *T. cruzi* I referente ao parasita do ciclo silvestre e *T. cruzi* II associado a cepas do ciclo doméstico da doença (ANONYMOUS, 1999). Os dois grupos de *T. cruzi* (I e II) definidos por marcadores genotípicos apresentam grande correlação com os zimodemas Z1 e Z2, anteriormente descritos na literatura baseado no perfil de isoenzimas, critério fenotípico (MILES *et al.*, 1978). Entretanto, as cepas do zimodema Z3 constituía um *cluster* independente com uma diversidade genética baixa intra-grupo, de acordo com análises de variação do tamanho dos cromossomos (PEDROSO *et al.*, 2007). Muitas cepas do *T. cruzi* apresentavam diversidade polimórfica dentro do mesmo grupo. Assim, em 2009, houve um novo consenso entre os pesquisadores da área e os grupos do *T. cruzi* passaram a ter a seguinte nomenclatura TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (ZINGALES *et al.*, 2009). O **Quadro 1** mostra as DTUs de *T. cruzi* e sua equivalência com antigos esquemas de classificação.

**Quadro 1:** Classificação das cepas de *T. cruzi*

DTU	Abreviatura	Equivalência dos antigos esquemas de classificação de cepas de <i>T. cruzi</i>
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> I e DTU I
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II e DTU IIb
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT, Z3-A, DTU IIc e <i>T. cruzi</i> III
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3, Z3-B e DTU IIa
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Bolivian Z2, rDNA 1/2, clonet 39 and DTU II d
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Paraguayan Z2, Zimodema B and DTU II e

Fonte: Adaptado (ZINGALES *et al.*, 2009).

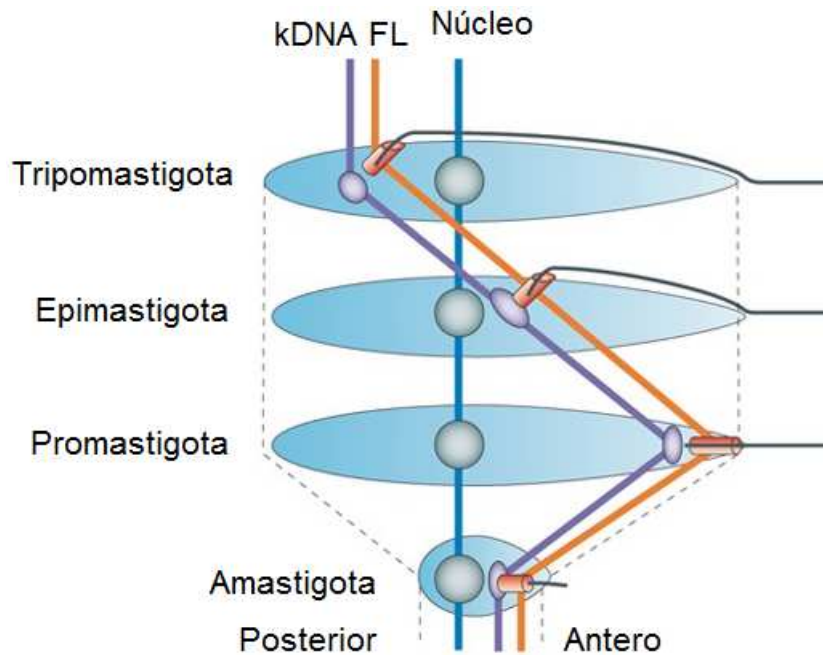
Resumo da revisão bibliográfica em relação à classificação das cepas de *T. cruzi*.

### 1.3 O cinetoplasto

Os organismos da ordem Kinetoplastida apresentam como característica a presença de uma estrutura proeminente, conhecida como cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de DNA mitocondrial ou kDNA ((kinetoplast DNA) localizado no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo o protozoário. Este DNA mitocondrial é formado por maxicírculos e minicírculos que se unem para formar uma rede gigante de DNA. Esta rede de DNA circular constitui cerca de 20-25 % do DNA total do parasito (DE SOUZA, 2002; LIU, ENGLUND, 2007, NEVES, 2011).

A localização do kDNA varia conforme as formas biológicas do parasito *T. cruzi*, a saber: amastigota, epimastigota, tripomastigota. Estas formas são definidas em função da posição do kDNA em relação ao núcleo e da presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante (NEVES, 2011) (**Figura 3**).

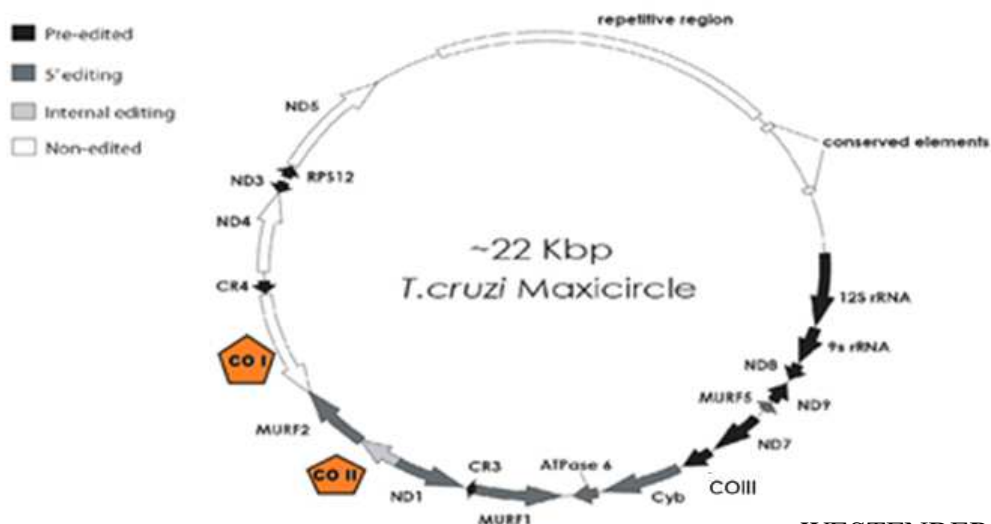
**Figura 3:** Posição do kDNA nas formas biológicas do parasito



Fonte: Adaptado (VARGAS-PARADA, 2010).

Os maxicírculos contêm genes que codificam RNAs ribossomais mitocondriais, além de diversas proteínas envolvidas no metabolismo energético da mitocôndria, como por exemplo: citocromo *b*, subunidades da citocromo oxidase, subunidades da *NAD* (nicotinamida adenina dinucleotídeo) desidrogenase (**Figura 4**). Tais regiões codificadoras apresentam sintenia com os maxicírculos de outros organismos, como: *T. brucei* e *Leishmania tarentolae* (WESTENBERGER *et al.*, 2006).

**Figura 4:** Representação do maxicírculo de *T. cruzi* CL Brener e Esmeraldo



Fonte: (WESTENBERGER *et al.*, 2006).

Os alvos moleculares utilizados no presente trabalho estão destacados em laranja. A legenda indica os genes que apresentam diferentes tipos de edição em RNA.

O processo de edição de RNA é controlado por pequenas sequências de RNA (RNAs guias) transcritas a partir dos minicírculos (ALVES, 2010). Os minicírculos apresentam uma região conservada, conhecida como sequência de minicírculo universal (*Universal Minicircle Sequence* - UMS). Essas regiões contêm genes importantes para as funções celulares e podem representar importantes alvos quimioterápicos (DALIRY, 2011).

#### 1.4 A citocromo oxidase

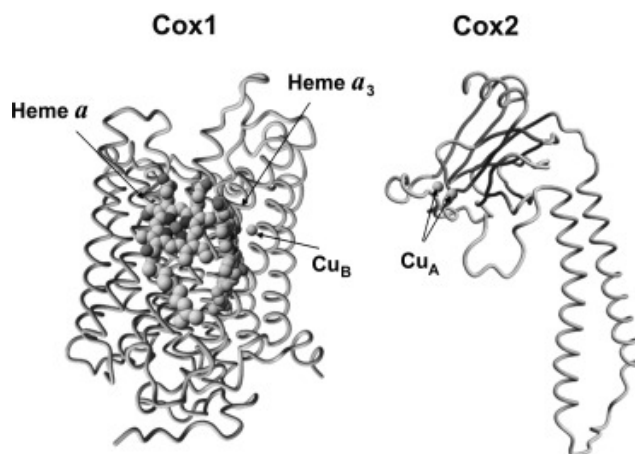
Os genes que codificam a citocromo oxidase subunidades *I* e *II* quando acoplados com a subunidade *III* formam um complexo de transportadores de elétrons na cadeia respiratória, denominada complexo IV que participam de reações junto com outros complexos da mitocôndria: complexo I (NADH: coenzima Q oxidoreductase); complexo II (succinato: coenzima Q-oxidoreductase); complexo III (Coenzima Q: citocromo c-oxidoreductase) e complexo IV (citocromo c-oxidase) (CARRANZA MARTINEZ, 2008).

A citocromo c oxidase ou complexo IV é um complexo proteico transmembranar que desempenha um papel central na cadeia transportadora de elétrons. Como oxidase terminal na cadeia respiratória mitocondrial, a citocromo *c* oxidase catalisa a etapa final no transporte de elétrons, fazendo a oxidação consecutiva de quatro moléculas de citocromo *c* e a redução de uma molécula de oxigênio para formar água (GREINER *et al.* 2008).

Os prótons consumidos durante esta reação são derivados exclusivamente do espaço da matriz, resultando em uma separação de carga que contribui para o gradiente eletroquímico transmembrana. Este processo é realizado por cada uma das subunidades do complexo IV. O sítio Cu A na subunidade II é o principal receptor de elétrons do ferrocitocromo *c* (LI, 1990).

Os elétrons são subsequentemente transferidos para a região binuclear Cu B - heme a 3 centro da subunidade I, onde o oxigênio se liga e é reduzido à água (**Figura 5**). A transferência de elétrons é acoplada ao bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, uma função que pode ser modulada pela subunidade III, contribuindo para estabelecer o gradiente de prótons necessário para sintetizar adenosina-5'-trifosfato (ATP).

**Figura 5:** Estrutura de ligação das subunidades I e II da citocromo oxidase



Fonte: Adaptado (BOURENS *et al.* 2013)

A reconstrução filogenética oferece uma hipótese acerca das relações evolutivas entre táxons ou macromoléculas. Para as filogenias moleculares, é necessário definir o alvo de estudo, isto é, sequência de nucleotídeos ou aminoácidos, genes ou genomas etc. Os alvos moleculares escolhidos para a realização do presente trabalho são os genes que codificam as subunidades I e II (COI e COII) da citocromo oxidase (**Figuras 4 e 5**).

Os motivos para escolha desses genes se baseiam nas seguintes características: tais genes são amplamente distribuídos entre os diversos grupos taxonômicos; uma região da sequência desses genes apresenta diversidade; suas respectivas proteínas contêm domínios funcionais conservados e regiões variáveis; os mesmos possuem baixo polimorfismo ancestral.

O gene da citocromo oxidase subunidade I, bastante utilizado como código de barras de DNA, tem sido amplamente usado para a identificação de espécies conhecidas e o descobrimento de novas. Ele está se mostrando altamente eficaz na identificação de pássaros, borboletas, peixes, moscas e outros grupos de animais (DAWNAY *et al.*, 2007; PAGÈS *et al.*, 2009). É importante ressaltar que estas subunidades também foram utilizadas para a caracterização de espécies do *T. cruzi* conforme foi demonstrado por Freitas e colaboradores (2006). Os autores identificaram mutações pontuais no gene que codificada a subunidade II da citocromo oxidase, que geram sítios de restrição para a enzima *AluI* e que permitem sua tipagem em haplogrupos mitocondriais. Entretanto, um

estudo mais robusto usando um maior número de cepas e sequências nucleotídicas é essencial para investigar melhor a biodiversidade molecular e as relações evolutivas de genes mitocondriais da COI e COII de diferentes cepas de *T. cruzi*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar as relações evolutivas de genes mitocondriais de *Trypanosoma* com ênfase às diferentes cepas de *T. cruzi*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- \* Realizar a genotipagem molecular das cepas de *T. cruzi*
- \* Identificar as sequências mitocondriais de algumas cepas de *T. cruzi*
- \* Amplificar e sequenciar os genes da COI e da COII de diferentes cepas de *T. cruzi*
- \* Identificar padrões de conservação e divergência entre os genes estudados
- \* Analisar as relações evolutivas entre sequências pela reconstrução filogenética
- \* Distinguir as diferentes DTUs de *T. cruzi* através da reconstrução filogenética

## 3 METODOLOGIA

O presente trabalho utilizou metodologias computacionais e experimentais, com etapas flexíveis que foram modificadas para chegar a um resultado confiável (**Figura 6**). Para a complexidade de cada método foi realizada uma revisão de protocolos experimentais e documentação de *softwares* já existentes na literatura para a execução dos mesmos. Detalhes dos protocolos experimentais foram visualizados nas instruções fornecidas dos *kits* dos fabricantes, sendo eles: extração de DNA, amplificação por PCR, purificação do amplicon e algumas documentações de *softwares*. Nas análises, foram utilizados recursos computacionais disponíveis na *Web* ou instalados localmente nos computadores do Instituto René Rachou (IRR/Fiocruz Minas).

### 3.1 Organismos e sequências moleculares

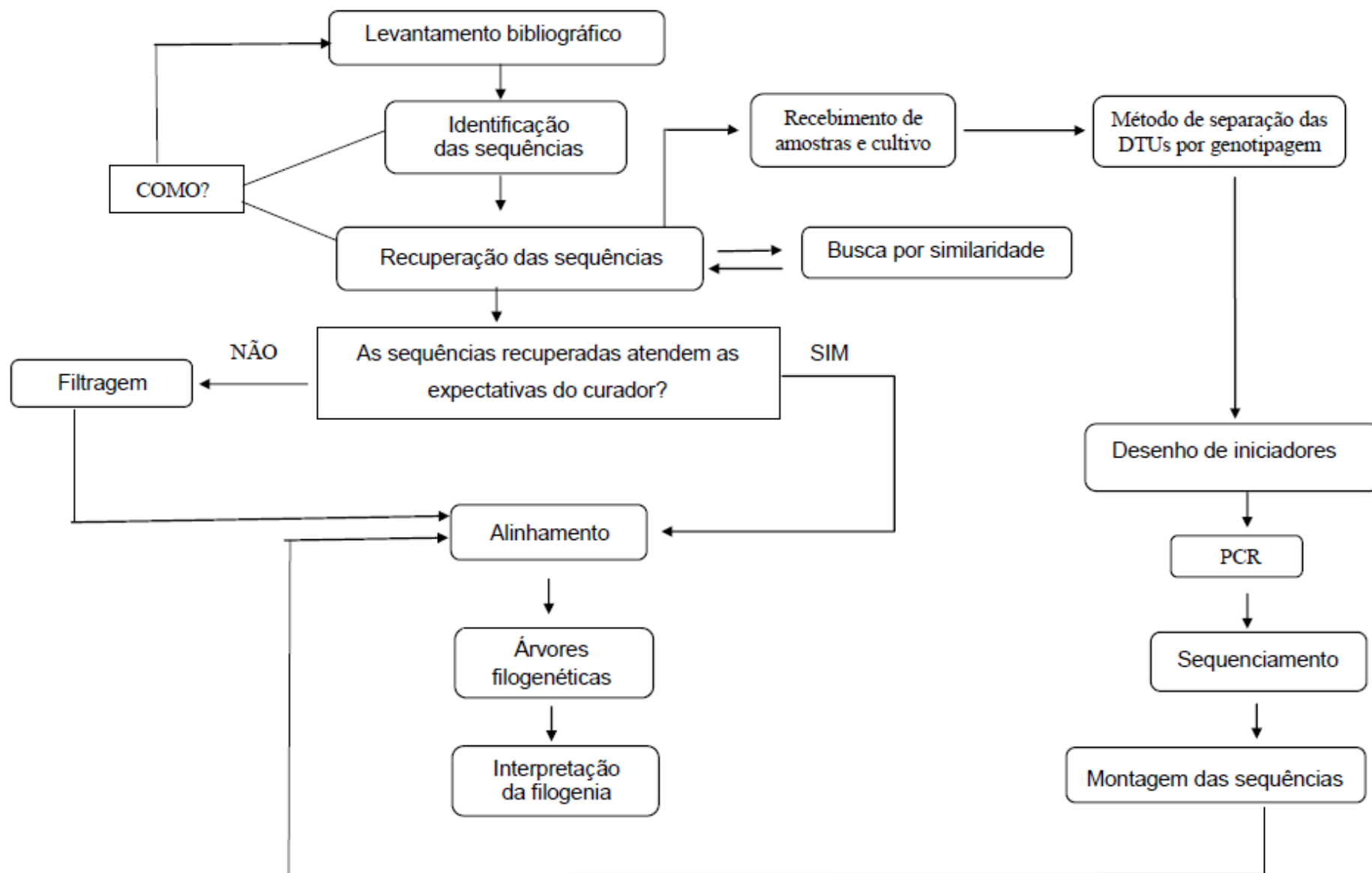
Foram realizadas buscas sequências mitocondriais dos genes da COI e COII de diferentes espécies de *Trypanosoma* (*T. brucei*, *T. congolense*, *T. evansi*, *T. vivax* e outros) e de diferentes cepas de *T. cruzi*. Inicialmente, realizou-se uma prospecção por sequências de nucleotídeos resultantes da busca por palavra-chave (por exemplo:

“cytochrome oxidase and mitochondria”) em bancos de dados disponíveis no National Center for Biotechnology Information (NCBI). Após a seleção das sequências de interesse (*T. cruzi*), foi realizada uma busca por similaridade nos bancos do NCBI e TriTrypDB (The Kinetoplastid Genome Resource) (<http://tritrypdb.org>), disponível no EuPathDB (The Eukaryotic Pathogen Genomics Database Resource) (<https://eupathdb.org>). A busca por similaridade de sequência foi realizada com a seleção do programa blastn do pacote BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) delimitada ao gênero *Trypanosoma*. Parâmetros dos algoritmos de busca nos bancos não foram alterados, sendo, portanto, a busca implementada no default. De modo a obter somente sequências completas dos genes da COI e COII, foram realizadas filtrações manuais. Nesta etapa, sequências com menos de 50 % de cobertura de ambos os alvos foram retiradas. O ponto de corte de cobertura foi baseado no tamanho dos alvos moleculares utilizados.

### **3.2 Obtenção de amostras laboratoriais**

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de diferentes cepas de *T. cruzi* cultivadas no laboratório da Dra. Silvane Murta (Fiocruz Minas). As amostras vieram do acervo da Dra. Silvane Murta, enquanto outras foram gentilmente cedidas pela Dra. Bianca Zingales (USP), Dr. Egler Chiari (UFMG) e Dra. Rita de Cássia Moreira de Souza (Fiocruz Minas). Além destas, também foram cedidas amostras de parasitos para cultivo e análises pela Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores (COLTRYP) do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, filiada a *World Federation for Culture Collections* (WFCC), sob o registro WDCM 949. As informações de todas as cepas de *T. cruzi* analisadas no presente trabalho estão no **Quadro 3**.

**Figura 6:** Representação esquemática do fluxograma usado no presente estudo. O esquema mostra de forma simplificada os passos que foram realizados no presente trabalho. Para uma melhor compreensão do que foi realizado recomenda-se ler as descrições nas seções da Metodologia.



Fonte: Autor



### 3.3 Cultivo de formas epimastigotas

A cultura de *T. cruzi* foi mantida em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) contendo: extrato de levedura 15 g/L; fosfato dibásico de sódio 11,56 g/L; glicose 2,2 g/L; hemina 0,02 g/L; infuso de fígado 5 g/L; KCl 0,4 g/L; NaCl 4,4 g/L; soro fetal bovino 10 % (v/v) e triptose 5 g/L. pH 7,2 (ajustado com HCl) suplementado com 10 % de SFB (soro fetal bovino) a 28°C e, a cada três dias é feito um repique de  $1 \times 10^6$  células/mL. As formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento são obtidas após 72 e 96 horas de cultivo. Estas condições foram estabelecidas de acordo com a curva de crescimento do parasito em meio LIT a 28°C (CAMARGO, 1964; JORGE, CASTRO, 2000).

### 3.4 Extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio

O sedimento de formas epimastigotas (aproximadamente  $10^8$  parasitos) foram lavados em solução PBS 1 %. Após serem lavados foi ressuscitado em tampão de extração contendo 100 mM de Tris-HCl, 5 mM EDTA, 20 mM de NaCl e 10 % de SDS, pH 8,0 e incubado com 5 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 1 µL de RNase (20 mg/mL) por 2h a 37 °C.

Posteriormente, o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e precipitado pela adição de etanol 100 % (v/v). O DNA precipitado foi então lavado duas vezes com etanol 70 % (v/v) e ressuscitado em água *DNase Free* aquecida a 37°C. A concentração do DNA obtido foi determinada por espectrofotometria usando o aparelho *Nanodrop* (SAMBROOK, RUSSEL, 2006; LIARTE, 2006).

### 3.5 Genotipagem das cepas de *T. cruzi*

O protocolo para caracterização das cepas de *T. cruzi* utilizado neste trabalho foi descrito por D'Avila e colaboradores em 2009. O mesmo consiste na análise da amplificação por PCR de três regiões de três genes diferentes, sendo que cada análise permite a diferenciação parcial das DTUs.

O gene mitocondrial da subunidade II (COII) da citocromo oxidase foi amplificado com os iniciadores Tcmit-10 e Tcmit-21 (**Quadro 2**), dirigidos para amplificar um fragmento de 375 pb a partir do DNA do maxicículo de *T. cruzi* (FREITAS *et al.*, 2006). A amplificação por PCR durante a termociclagem aconteceu com o seguinte protocolo: desnaturação a 95°C por 5 min, 40 ciclos de desnaturação a

95°C por 45 segundos, anelamento a 48°C por 45 segundos, extensão a 72° C por 1 min e uma extensão final a 72° C por 10 min.

**Quadro 2:** Marcadores moleculares e iniciadores utilizados no presente trabalho

PCR	DNA alvo	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Fragmento amplificado	DTUs
24Sα rDNA	Domínio D7	D71	AAGGTGCGTCGACAGTGTGG	110 pb	TcIII, TcV
		D72	TTTCAGAATGGCCGAACAGT	~119, 125 pb	TcIV, TcVI
COII (RFLP)	Mitocondrial	TcMit-21	TTGTAATAGGAGTCATGTT *	30, 81 e 264 pb **	TcI
		TcMit-10	CCATATATTGTTGCATTATT *	81 e 294 pb **	TcIII, TcIV, TcV, TcVI
				81 e 212 pb **	TcII
SL-IR	Miniexon	UTCC	CGTACCAATATAGTACAGAAACTG	~150-157 pb	TcV, TcVI
		TcIII	CTCCCCAGTGTGGCCTGGG	200 pb	TcIII, TcIV
COI	Mitocondrial	TcCOI	GTGAAAGAAACCGCCAAAGAA GCACCTGTTATGGTTGGATTTC	936 pb	TcI e TcII
COII	Mitocondrial	TcCOII	ATGAGTTTTATTTTGTCATTTT TTATATAAAACATATAACAATTG	629 pb	TcI e TcII

Legenda: \* Amplifica um fragmento de 375 pb com três sítios de restrição para a enzima *AluI*. \*\* Fragmentos obtidos após a digestão com a enzima *AluI*.  
Fonte: Adaptado (MARTINS, 2014).

A enzima de restrição utilizada para genotipagem por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi a endonuclease *AluI*. Após a amplificação por PCR, o produto amplificado de 375 pb foi submetido à digestão com *AluI* por 16 horas a 37°C conforme instruções do fabricante (Promega). A região intergênica do *spliced leader* (SL-IR) foi amplificada com os iniciadores TcIII e UTCC (**Quadro 2**). A amplificação ocorreu com o protocolo descrito por D'Avilla e colaboradores (2009).

Finalmente, a sequência do domínio D7 do gene 24S do rDNA foi amplificado com os iniciadores D71 e D72 (**Quadro 2**). A amplificação foi realizada com o seguinte protocolo de termociclagem: desnaturação a 94°C por 4 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min uma extensão final a 72°C por 10 min.. Cada reação de PCR foi realizada com 10 µL do mastermix Platinum® *PCR Kit* (Invitrogen), 1 µL de cada iniciador (10 ng/µL) e 1 µL de amostra de DNA (10 ng/µL), com volume final de 13 µL.

Todos os produtos amplificados por PCR (amplicons) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6 % (p/v) para separação das bandas e posteriormente corado pela prata para a visualização dos fragmentos de DNA.

### 3.6 Desenho de iniciadores específicos para os alvos de estudo

Iniciadores para amplificação dos genes de interesse foram obtidos baseado nas sequências dos genes que codificam as subunidades *I* e *II* da citocromo oxidase para a cepa de *T. cruzi* CL Brener, cujo número de acesso no *GenBank* é DQ343645.1. A escolha desta cepa foi baseada por ter o seu genoma completamente sequenciado e disponível na literatura. Esperou-se obter fragmentos correspondentes à sequência codificante dos genes da COI e COII em diferentes cepas de *T. cruzi*. A seleção dos iniciadores do gene da COI foi obtida no portal *PrimerQuest* desenvolvido pela IDT (*Integrated DNA Technologies*) (<https://www.idtdna.com>). O desenho dos iniciadores do gene da COII foi realizado manualmente. Foram selecionados os pares de iniciadores que cobriam a maior porcentagem de cada gene. Os iniciadores para a amplificação das sequências parcial e completa dos genes da COI e COII, respectivamente, estão descritos no **Quadro 2**.

### 3.7 Amplificação por PCR

A amplificação dos alvos foi realizada através da padronização do laboratório, sendo necessários: 10 µL de mastermix *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity Kit* (Invitrogen), 1 µL de iniciador senso e 1 µL de anti-senso e 1 µL de amostra de DNA em concentração de 10 ng/µL, totalizando 13 µL de volume final.

As condições de termociclagem para amplificação de cada alvo foram: desnaturação a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 45° e 50°C por 30 seg (gene parcial da COI e gene completo da COII, respectivamente) e extensão a 72°C por 1 min, finalizando com uma extensão final de 10 min a 72 °C.

Todos os produtos amplificados por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1 % (p/v) para separação das bandas e posteriormente visualizados no aparelho transiluminador de luz UV ImageQuant LAS 4000 (GE *Life Sciences*) para a confirmação dos fragmentos de DNA.

### 3.8 Purificação e sequenciamento de DNA

Os fragmentos gerados por PCR foram purificados utilizando o *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante. Tal protocolo utiliza um tampão detergente e um tampão contendo etanol. A purificação ocorre em colunas com tubos coletores que são utilizados para eluição do DNA em água aquecida deionizada (LIARTE, 2006).

Os produtos da purificação de DNA foram preparados com o uso dos iniciadores senso e anti-senso específicos para sequenciamento dos alvos. A preparação da placa de sequenciamento de DNA foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pelo Laboratório da Dra. Silvane Murta e pelos responsáveis técnicos da Plataforma de Sequenciamento do IRR/Fiocruz Minas (PDTIS). O protocolo estabelece o uso de 1 µL de DNA purificado na concentração de 5 a 20 ng/µl, 8 µL de água e 1 µL de cada iniciador (senso e anti-senso). O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de Sanger (SANGER *et al.*, 1977).

### 3.9 Montagem de sequências nucleotídicas

O pacote de programas usado para montagem de sequências foi o *CodonCode Aligner* ([www.codoncode.com](http://www.codoncode.com)). Os algoritmos no *CodonCode* foram especialmente selecionados para a análise de dados de sequenciamento obtidos pelo método de

Sanger e colaboradores (1997). Os dados gerados pelos sequenciadores automáticos podem conter ruídos indesejados nas sequências para montagem. Por isto, o parâmetro selecionado para lidar com estes dados indesejados foi o *End Clipping*. O programa possui a opção de trabalhar com os dados sem uma edição prévia para a montagem de sequências. Entretanto, esta opção não foi selecionada, pois os dados poderiam interferir nas análises filogenéticas. Para isso, sequências menores que 25 bases e com valores de pontuação inferiores a 50, foram removidas pelo programa Phred 20 ([www.phrap.com](http://www.phrap.com)) já implementado no *CodonCode*.

Na montagem das sequências, a proporção de bases idênticas selecionada foi de no mínimo 85 % com uma proporção de sobreposição (*overlap*) de 20 %. As proporções de identidade e sobreposição não foram restritivas, pois poderia haver o risco de excluir algumas bases. A opção de montagem selecionada foi *Aligner to reference sequence*, que alinha a sequência de interesse a uma sequência para referência e posteriormente realiza a montagem com exclusão da sequência de referência. No presente trabalho, foi selecionada a sequência de referência de *T. cruzi* CL Brener.

### **3.10 Alinhamentos e árvores evolutivas**

Após a montagem das sequências nucleotídicas, as mesmas foram submetidas ao alinhamento par-a-par no programa CLUSTALX (LARKIN *et al.*, 2007). Posteriormente, estas foram submetidas ao pacote MEGAX (KUMAR *et al.*, 2018) para a realização de análises do alinhamento, como: composição de bases, sítios conservados e sítios informativos.

Após algumas análises no MEGAX, os alinhamentos foram submetidos a um filtro a fim de eliminar as colunas muito divergentes para uma melhor reconstrução filogenética. O programa utilizado para a curadoria do alinhamento foi o Gblocks, que elimina as regiões ricas em *gap* do alinhamento (CASTRESANA, 2000). O parâmetro do programa para curadoria foi o *default*, sendo alterado somente quando o resultado de saída gerado após curadoria não tivesse o mínimo de 50 % de bases quando comparado ao alinhamento original.

O método utilizado para a reconstrução das árvores filogenéticas foi o método de máxima verossimilhança implementado no programa MEGAX. Este método busca a árvore que melhor representa as sequências alinhadas fornecidas, baseada na análise de diferentes caracteres do alinhamento pelas distâncias evolutivas destas sequências

(VERLI *et al.*, 2014; RUSSO, MIYAKI, PEREIRA, 2012). Colunas do alinhamento contendo *gaps* foram excluídas da reconstrução das árvores.

Modelos evolutivos (matemáticos) foram testados para compreensão dos padrões nos alinhamentos das sequências. Diversos modelos foram propostos após as análises destes no MEGAX. A seleção do melhor modelo evolutivo (*best fit model*) foi baseada nas pontuações mais baixas de BIC (*Bayesian Information Criterion*). O modelo sugerido para ambos os alvos foi o de *Tamura 3 parameter*. Foi empregado o teste de *bootstrap*, que faz reamostragem dos dados com reposição pseudo-aleatória. Foram construídas diversas árvores (1000 pseudo-réplicas de *bootstrap*) para avaliar o valor de apoio estatístico dos nós das árvores filogenéticas (KUMAR *et al.*, 2018; RUSSO, MIYAKI, PEREIRA, 2012).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Busca em bancos de dados

Para a sequência completa do gene da COI, dentre um total de 121 sequências no banco do NCBI, somente 96 sequências cobriam mais do que 50 % do gene de referência utilizado na busca. As 96 sequências foram selecionadas para análises subsequentes. No banco TriTrypDB (ASLETT *et al.*, 2010), foram obtidas um total de 37 sequências, sendo que oito foram selecionadas por terem uma região de cobertura superior a 50 % do gene de referência. Sequências moleculares que estavam duplicadas nos bancos de dados foram removidas por inspeção visual, assim como sequências sem identificação da espécie de *Trypanosoma*. Quando analisadas, as sequências de interesse foram selecionadas para posteriores análises filogenéticas. O total de sequências nucleotídicas selecionadas e sua distribuição entre espécies de *Trypanosoma* podem ser visualizadas na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Sequências nucleotídicas de *Trypanosoma* recuperadas de bancos de dados

Organismo	COI	COII	COIII
<i>Trypanosoma cruzi</i>	75	459	9
<i>Trypanosoma rangeli</i>	3	5	1
<i>Trypanosoma dionisii</i>	5	0	0
<i>Trypanosoma brucei</i>	1	3	4
<i>Trypanosoma equiperdum</i>	7	3	2
<i>Trypanosoma theileri</i>	1	1	0
<i>Trypanosoma grayi</i>	1	1	1
<i>Trypanosoma congolense</i>	1	1	1
<i>Trypanosoma vivax</i>	2	4	0
<i>Trypanosoma copemani</i>	1	0	0
<i>Trypanosoma lewisi</i>	1	1	0
<i>Trypanosoma avium</i>	0	0	0
<i>Trypanosoma vespertilionis</i>	0	1	0
<i>Trypanosoma sp.</i>	0	0	1
Total	98	479	19

Fonte: Autor

Para a sequência completa do gene da COII, foram obtidas um total de 487 sequências no banco do NCBI, que cobriam mais do que 50 % do gene de referência utilizado na busca, as quais foram selecionadas para análises subsequentes (**Tabela 1**). No banco TriTrypDB, foram obtidos um total de 840 sequências, sendo que nove foram selecionadas por cobrirem uma boa região do gene de referência.

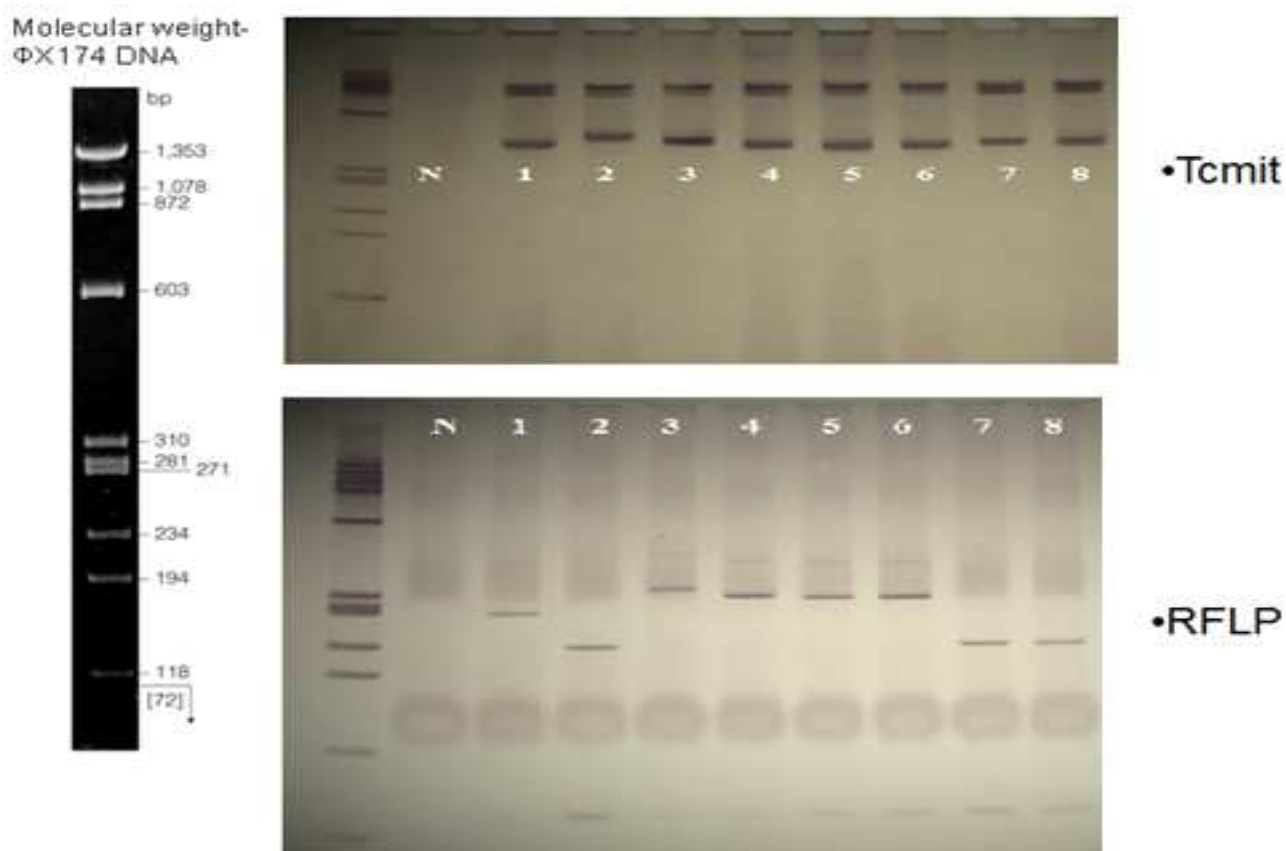
#### 4.2 Genotipagem das cepas de *T. cruzi*

As amostras de *T. cruzi* cedidas e cultivadas no laboratório tiveram uma concentração de DNA satisfatória (superior a 100 ng/ $\mu$ L) após a extração. Posteriormente, as amostras de DNA foram submetidas ao método de genotipagem para classificação das cepas de *T. cruzi* nas respectivas DTUs (**Quadro 3**). Parte das amostras utilizadas já havia sido caracterizada em trabalhos anteriores. Porém algumas ainda permaneciam em incógnita sobre suas respectivas DTUs. Portanto, os resultados de genotipagem refletem uma parcela das amostras analisadas (**Figuras 7 e 8**).

O método de genotipagem foi eficiente quanto à separação das DTUs, conforme mostrado nas **Figuras 7 e 8**. É possível verificar que os fragmentos obtidos estão de acordo com o descrito por D'Avila e colaboradores em 2009 e **Quadro 2**.



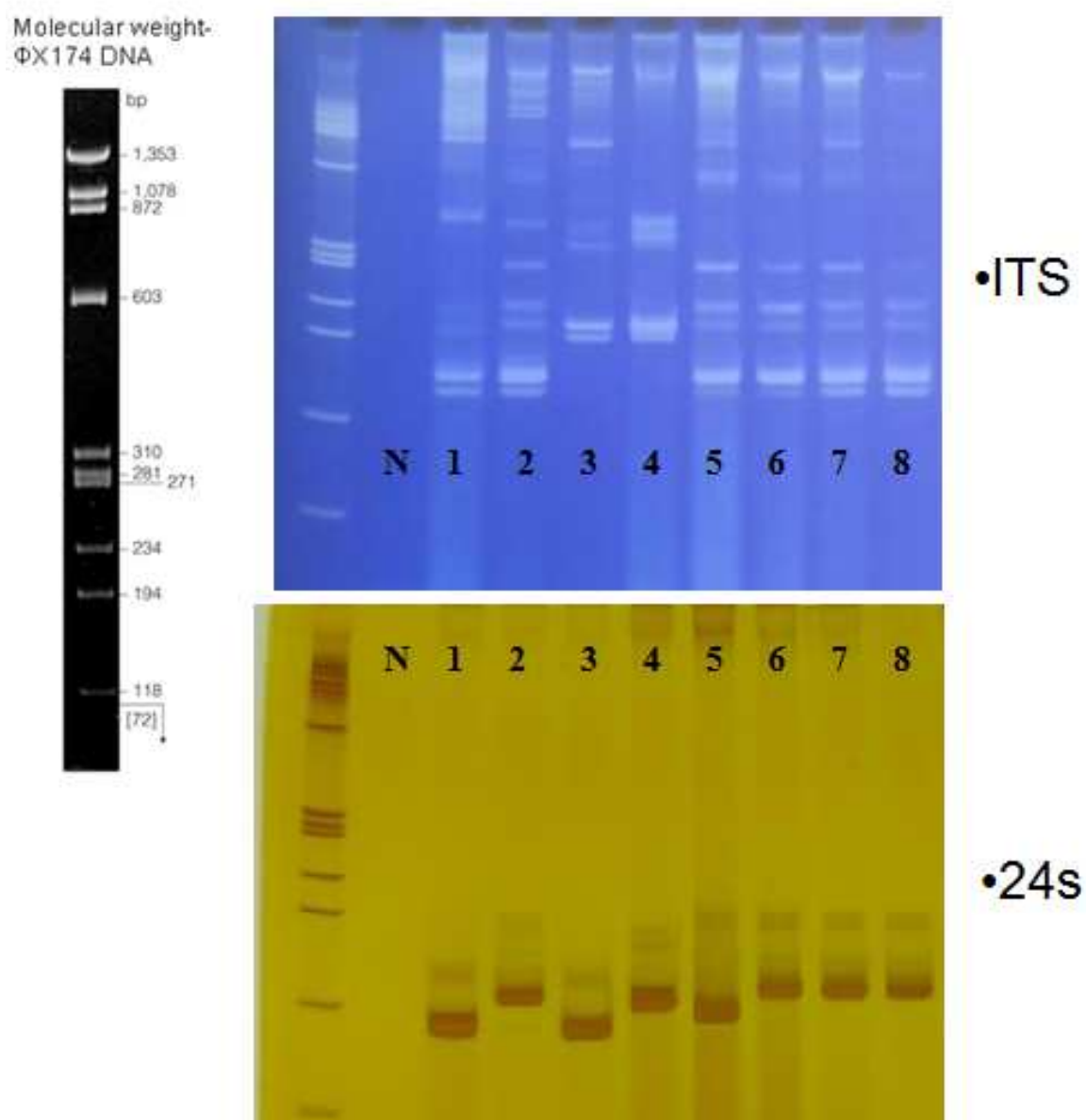
**Figura 7:** Análise dos fragmentos do gene da COII e diferentes padrões de digestão com a enzima *AluI* em cepas de *T. cruzi*



Fonte: Autor

Os produtos de amplificação por PCR dos fragmentos do gene da COII das cepas de *T. cruzi* (1. Colombiana (TcI); 2. Y (TcII); 3. SM76 (TcIII); 4. AM64 (TcIV); 5. 3253 (TcV); 6. CL Brener (TcVI); 7. Ernane; 8. EXR 424) com os iniciadores Tcmit-10 e Tcmit-21 (A) e os produtos de digestão desses fragmentos com a enzima *AluI* (B) foram submetidos à separação em gel de poliacrilamida 6% corado pelo nitrato de prata. Peso molecular; N. Controle Negativo.

**Figura 8:** Análise dos fragmentos da região intergênica do *spliced leader* (SL-IR) e do domínio D7 do gene 24S $\alpha$  rDNA de diferentes cepas de *T. cruzi*



Fonte: Autor

Os produtos de amplificação por PCR dos fragmentos da região intergênica do *spliced leader* (SL-IR) e do domínio D7 do gene 24S $\alpha$  rDNA de diferentes cepas de *T. cruzi* (1. Colombiana (TcI); 2. Y (TcII); 3. SM76 (TcIII); 4. AM64 (TcIV); 5. 3253 (TcV); 6. CL Brener (TcVI); 7. Luna; 8. Ibarra) foram submetidos à separação em gel de poliacrilamida 6 % corado pelo nitrato de prata. Peso molecular; N. Controle Negativo.

**Quadro 3:** Informações sobre amostras de 64 cepas *T. cruzi* testadas.

(Continua)

<b>Cepas de <i>T. cruzi</i></b>	<b>Origem</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>DTU</b>
2549	Apodi, Rio Grande do Norte	<i>Homo sapiens</i>	TcI
3188	Açu, Rio Grande do Norte	<i>Homo sapiens</i>	TcI
2137	Severiano Melo, Rio Grande do Norte	<i>Homo sapiens</i>	TcI
17	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcI
Colombiana	Colômbia	<i>Homo sapiens</i>	TcI
Silvio	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcI
Barra seca	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	TcI
Quaraizinho	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	TcI
SC28	Santa Catarina	<i>Didelphis marsupialis</i>	TcI
RS-21	Rio Grande do Sul	<i>Panstrongylus megistus</i>	TcI
JG	Araxá, Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcII
ASA	Araxá, Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcII
RN25	Serra Negra do Norte, Rio Grande do Norte	<i>Homo sapiens</i>	TcII
Y	São Paulo	<i>Homo sapiens</i>	TcII
VL-10	Virgem da Lapa, Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcII
Noel	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcII
Gilmar	Montes Claros, Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcII
PNM	Patos de Minas, Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcII
Ernane	Goiás	<i>Homo sapiens</i>	TcII
SMJ	Buriti Alegre, Goiânia	<i>Homo sapiens</i>	TcII
EXR-424	Pariquera-Açu	<i>Philander opossum</i>	TcII
EXR-426	Pedro Toledo, São Paulo	<i>Didelphis marsupialis</i>	TcII
Berenice	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcII
São Felipe	São Felipe, Bahia	<i>Triatoma infestans</i>	TcII

ND: não determinada

Fonte: Autor

(Continua)

<b>Cepas de <i>T. cruzi</i></b>	<b>Origem</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>DTU</b>
Romano	Argentina	<i>Homo sapiens</i>	TcII
RN19	Caraúbas, Rio Grande do Norte	<i>Panstrongylus lutzi</i>	TcIII
SM76	Severiano Melo, Rio Grande do Norte	<i>Homo sapiens</i>	TcIII
PEBA18	Caraúbas, Rio Grande do Norte	<i>Euphractus sexcinctus</i>	TcIII
PI0213	Serra Negra do Norte, Rio Grande do Norte	<i>Panstrongylus lutzi</i>	TcIII
C00113 (113)	Luziania, Goiás	<i>Monodelphis domestica</i>	TcIII
C00370 (370)	Abaetetuba, Pará	<i>Rhodnius pictipes</i>	TcIII
C00029 (29)	Sumidoro, Rio de Janeiro	<i>Galictis vittata</i>	TcIII
C00566 (566)	Aquidauana, Mato Grosso do Sul	<i>Dasyypus novemcinctus</i>	TcIII
226	BambuÍ, Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcIII
231	BambuÍ, Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcIII
222	BambuÍ, Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcIII
182	BambuÍ, Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcIII
143	BambuÍ, Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcIII
241	BambuÍ, Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcIII
AM64	Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas	<i>Homo sapiens</i>	TcIV
C00041 (41)	Aquidauana, Mato Grosso do Sul	<i>Thrichomys pachyurus</i>	TcIV
C00471 (471)	Aquidauana, Mato Grosso do Sul	<i>Oecomys mamorae</i>	TcIV
C00524 (524)	Nhumirim, Mato Grosso do Sul	<i>Triatoma</i> sp.	TcIV
C00526 (526)	Nhumirim, Mato Grosso do Sul	<i>Triatoma</i> sp.	TcIV
C00527 (527)	Nhumirim, Mato Grosso do Sul	<i>Triatoma</i> sp.	TcIV
C00528 (528)	Nhumirim, Mato Grosso do Sul	<i>Triatoma</i> sp.	TcIV
C00529 (529)	Nhumirim, Mato Grosso do Sul	<i>Triatoma</i> sp.	TcIV
C00531 (531)	Nhumirim, Mato Grosso do Sul	<i>Triatoma</i> sp.	TcIV

ND: não determinada

Fonte: Autor

<b>Cepas de <i>T. cruzi</i></b>	<b>Origem</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>DTU</b>
C00532 (532)	Nhumirim, Mato Grosso do Sul	<i>Triatoma</i> sp.	TcIV
C00601 (601)	Guarapari, Espírito Santo	<i>Triatoma vitticeps</i>	TcIV
MR	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	ND
3253	Cangussu, Rio Grande do Sul	<i>Homo sapiens</i>	TcV
JM	Janaúba, Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcV
Bug 2149 c110	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	TcV
JA	Itumbiara, Goiás	<i>Homo sapiens</i>	TcVI
Buriti	Encruzilhada, Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	TcVI
J	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	TcVI
Luna	Argentina	<i>Homo sapiens</i>	TcVI
Ibarra	Argentina	<i>Homo sapiens</i>	TcVI
CL Brener	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	TcVI
YUYU	Carinhanha, Bahia	<i>Triatoma infestans</i>	TcVI
RS-12	Encruzilhada, Rio Grande do Sul	<i>Homo sapiens</i>	TcVI
CL	Encruzilhada, Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	TcVI
FL	São Diogo, Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	TcVI

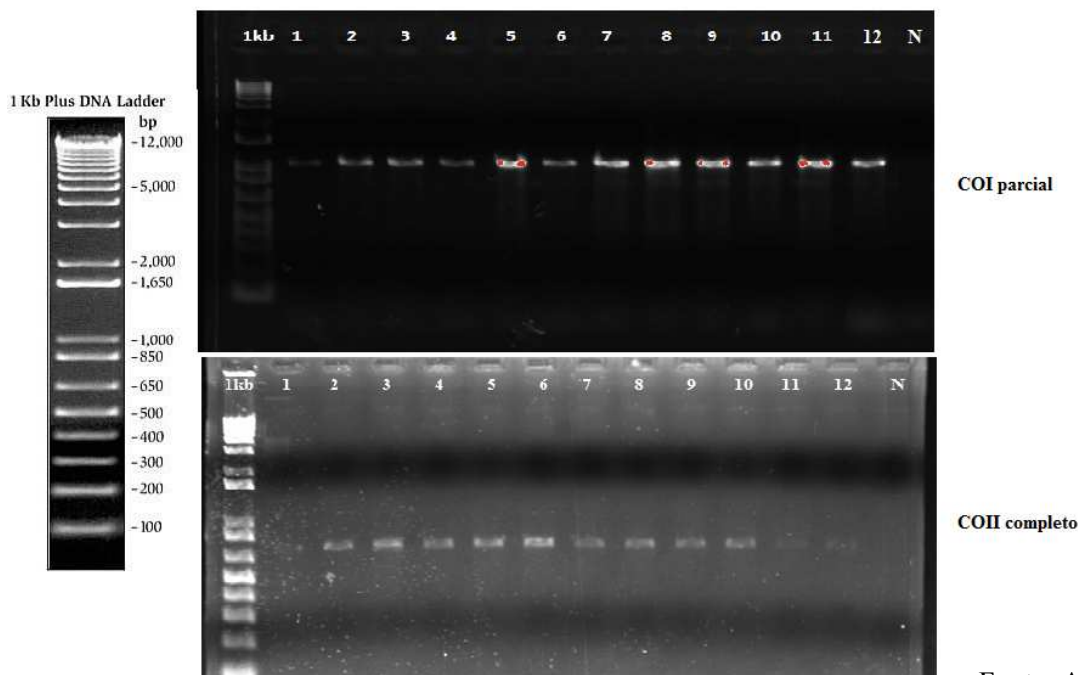
ND: não determinada

Fonte: Autor

### 4.3 Amplificação dos genes da COI e da COII

Os iniciadores utilizados atenderam às expectativas de amplificação dos alvos moleculares de interesse. Estes foram desenhados a partir da sequência da cepa de referência *T. cruzi* CL Brener. Para os iniciadores do gene da COI, a amplificação esperada era de 936 pares de bases, enquanto que para o gene da COII era de 629 pares de bases (**Figura 9**). Algumas cepas necessitaram de maior concentração de DNA ou alterações na temperatura de anelamento para amplificação por PCR. Portanto, diversas amplificações foram realizadas na tentativa de se obter fragmentos de DNA.

**Figura 9:** Amplificação parcial do gene da COI e completa do gene COII das cepas de *T. cruzi*



Fonte: Autor

Produtos de amplificação por PCR dos gene da COI sequência parcial e completa do gene COII das cepas de *T. cruzi*. 1- 113, 2- 370, 3- 29, 4- 1, 5- 471, 6- 524, 7- 526, 8- 527, 9- 528, 10- 529, 11- 531 e 12- 532. N= Controle Negativo. Os produtos de PCR foram submetidos à separação em gel de agarose 1% corado com gel red. A figura mostra a amplificação de DNA de 12 cepas de *T. cruzi* (10 ng).

#### 4.4 Análise das sequências nucleotídicas

As sequências de DNA, obtidas com os iniciadores senso e anti-senso, foram analisadas apresentando um resultado satisfatório no que se refere à leitura de cada fita. Algumas cepas de *T. cruzi* não apresentaram um resultado adequado para as análises posteriores. Do total de 64 amostras do acervo do laboratório, 55 destas foram sequenciadas para o gene da COI e 57 para o gene da COII. A **Tabela 2** reflete a qualidade das sequências dos genes da COI e da COII em relação ao *contig* montado em relação à cepa de referência após o sequenciamento.

**Tabela 2:** Qualidade das sequências após sequenciamento

(continua)

<i>Cepas de T. cruzi</i>	COI (pb)	COII (pb)	COI ( % <i>contig</i> )	COII ( % <i>contig</i> )
RN19	787	548	70,2	81,1
2549	762	ND	78,7	ND
JG	844	ND	71,8	ND
3188	863	520	83,5	80,3
ASA	ND	ND	ND	ND
SM76	858	506	81,1	76,5
2137	862	566	81,8	83,6

ND: não determinada

Fonte: Autor

(continua)

<i>Cepas de T. cruzi</i>	COI (pb)	COII (pb)	COI ( % <i>contig</i> )	COII ( % <i>contig</i> )
PEBA18	813	557	76,7	82
RN25	ND	557	ND	79,3
PI0213	853	624	70,2	98,4
AM64	847	563	79,3	83,6
3253	868	531	89	76,3
113	738	522	51	75,5
370	605	490	51,1	70
29	732	488	75	68,7
41	781	487	75,9	75,7
471	800	443	83,5	67,6
524	ND	455	ND	55,2
526	798	489	81,6	73,3
527	746	543	70,5	77,6
528	759	505	72,1	74,4
529	627	544	66	80,8
531	ND	513	ND	75,8
532	769	543	71,3	79,3
601	800	ND	80,9	ND
566	736	491	76,1	70,7
JM	869	543	87,5	83,5
226	ND	ND	ND	ND
231	855	624	87,2	92,2
222	696	562	62,8	83,1
182	ND	624	ND	98,7
143	ND	450	ND	70,1
241	863	549	87,9	81,1
17	816	642	69,9	98,3

Y	760	633	70,8	98,1
VL-10	817	643	77,7	95,6
Buriti	788	636	77,1	96
Colombiana	787	631	81,2	98,9
Noel	845	613	82,6	84,7
Gilmar	782	591	81,9	59,4
PNM	764	637	79,3	98,3
Ernane	903	634	81,7	94,8
SMJ	ND	632	ND	96,7

Fonte: Autor

(conclusão)

<b>Cepas de <i>T. cruzi</i></b>	<b>COI (pb)</b>	<b>COII (pb)</b>	<b>COI ( % <i>contig</i>)</b>	<b>COII ( % <i>contig</i>)</b>
JA	906	615	93,3	84,3
J	915	636	93,2	96,8
Luna	919	631	89,8	97,9
Ibarra	906	634	92	95,9
Silvio	871	638	81,6	95,1
CL Brener	809	630	76,7	99,2
Barra seca	864	631	82,1	97,9
Quaraizinho	835	629	84,4	99
SC28	810	630	79,3	98,4
EXR-424	782	629	77,1	96,3
EXR-426	806	630	81,8	98,9
MR	ND	ND	ND	ND
YUYU	831	624	98,6	98,6
Berenice	855	550	96,6	83,9
São Felipe	850	ND	79,6	ND
RS-21	818	631	96,3	99,4
RS-12	826	630	96,7	97,9
CL	840	515	97,5	76,7
Romano	835	549	97,7	81,6
FL	855	576	96,4	87
Bug 2149 c110	849	629	94,9	96,4

ND: não determinada

Fonte: Autor

#### 4.5 Composição de bases das sequências de *T. cruzi*

Observou-se uma composição de bases predominante em AT para ambos os alvos, sendo um indicativo de genoma mitocondrial (**Tabelas 3 e 4**). Para as sequências



parciais do gene da COI, a média de composição de bases foi de 68,4 % AT e de 31,6 % GC. Enquanto que para as sequências completas do gene da COII, a média de composição de bases foi de 71,6 % AT e de 28,4 % GC.

**Tabela 3:** Composição de bases das sequências parciais do gene da COI

<b>gene da COI (sequência parcial)</b>				
<b>Cepas de <i>T. cruzi</i></b>	<b>T(U)</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>
17	23.8	20.1	43.7	12.5
29	24.0	19.5	44.7	11.7
41	23.2	20.7	43.9	12.2

Fonte: Autor  
(continua)

<b>gene da COI (sequência parcial)</b>				
<b>Cepas de <i>T. cruzi</i></b>	<b>T(U)</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>
113	24.8	19.0	45.0	11.2
231	23.9	19.9	44.7	11.6
241	23.6	19.2	45.1	12.1
370	23.8	18.2	44.1	13.9
471	23.4	20.3	44.4	12.0
222	24.3	19.1	43.5	13.1
526	23.2	20.4	44.5	11.9
527	23.7	19.0	45.0	12.2
528	23.7	19.4	44.0	13.0
529	23.5	20.7	42.4	13.4
113	23.6	19.0	44.5	12.9
532	23.4	18.4	45.7	12.5
566	23.4	19.9	44.5	12.2
RN19	23.5	18.6	45.8	12.1
2137	27.0	19.0	39.0	14.9
São Felipe	24.3	18.8	45.0	11.9
3188	24.7	18.8	43.3	13.2
3253	22.9	20.0	45.4	11.6
AM64	23.4	20.1	44.7	11.7
Barra seca	24.2	19.6	45.6	10.6
Berenice	25.0	18.8	44.8	11.3
Buriti	23.0	20.2	44.5	12.3
CL	23.2	20.0	44.9	11.9
CLBrener	23.5	20.1	44.6	11.9
Colombiana	24.0	19.8	45.5	10.7
Ernane	23.1	19.8	45.7	11.4
EXR424	23.9	19.1	46.2	10.8

EXR426	25.1	18.8	44.7	11.3
FL	23.0	20.1	44.9	11.9
Gilmar	24.6	18.9	45.4	11.1
Ibarra	22.1	20.4	44.9	12.5
J	22.1	20.8	44.8	12.4
JA	21.9	20.4	45.5	12.2
JG	25.1	18.6	42.9	13.3
JM	22.9	19.7	45.1	12.3
Luna	22.0	20.6	44.7	12.7
601	23.1	20.3	44.6	12.0
Noel	24.1	19.2	45.9	10.8
PEBM	23.2	19.4	42.6	14.8
PLO123	24.4	19.8	42.1	13.6

Fonte: Autor  
(conclusão)

<b>gene da COI (sequência parcial)</b>				
<b>Cepas de <i>T. cruzi</i></b>	<b>T(U)</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>
PNM	24.7	18.8	45.2	11.3
Quaraizinho	24.1	19.6	45.5	10.8
ROMANO	24.2	19.4	45.5	10.9
RS12	22.9	20.3	45.3	11.5
RS21	23.8	19.6	45.8	10.8
SC28	24.4	19.8	45.2	10.6
Silvio	25.4	18.4	43.2	13.1
SM76	23.4	19.5	43.4	13.8
TcBug2145c110	23.0	20.1	44.5	12.4
VL10	24.0	19.2	46.0	10.8
Y	24.6	18.4	45.3	11.7
YuYu	22.9	20.3	45.0	11.8

Fonte: Autor

**Tabela 4:** Composição de bases das sequências completas do gene da COII (continua)

<b>gene da COII (sequência completa)</b>				
<b>Cepas de <i>T. cruzi</i></b>	<b>T(U)</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>
17	44.2	8.4	28.8	18.5
29	45.7	7.4	26.7	20.2
41	45.0	8.4	26.9	19.7
3188	43.8	8.5	29.0	18.7
143	42.9	8.2	27.8	21.1
182	44.6	8.5	27.2	19.7
222	43.6	8.7	27.0	20.6
231	44.6	8.5	27.2	19.7
241	43.0	8.7	27.3	20.9

370	44.1	8.2	27.1	20.6
471	42.7	8.6	29.1	19.6
524	44.0	9.2	28.1	18.7
526	42.3	9.4	28.0	20.2
527	42.8	8.9	27.3	21.0
528	42.6	9.3	26.9	21.2
529	44.5	8.5	27.8	19.3
531	44.6	8.4	27.1	19.9
532	42.5	9.0	27.4	21.0
566	45.2	8.4	26.7	19.8
RN19	43.4	8.2	27.6	20.8
3253	45.4	7.9	26.9	19.8
AM64	44.4	8.4	27.5	19.7
Barra seca	43.7	8.9	28.8	18.5

Fonte: Autor

---

**gene da COII (sequência completa)**

---

<b>Cepas de <i>T. cruzi</i></b>	<b>T(U)</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>
Berenice	42.9	9.3	29.1	18.7
Buriti	44.3	8.3	27.7	19.7
CL	42.9	8.9	26.8	21.4
CL Brener	44.4	8.4	27.3	19.8
Colombiana	43.9	8.6	28.8	18.7
Ernane	43.7	8.7	29.2	18.5
EXR-424	43.9	8.6	29.0	18.5
EXR-426	43.8	8.6	29.0	18.6
FL	44.6	8.5	26.4	20.5
Gilmar	43.5	8.8	30.1	17.6
Ibarra	44.2	8.8	27.1	19.9
J	44.5	8.3	27.5	19.7
JA	44.4	8.9	26.8	19.8
113	44.3	7.9	27.6	20.3
JM	43.3	8.8	26.9	21.0
Luna	44.2	8.4	27.6	19.8
TcBug2145c110	44.4	8.6	27.3	19.7
Noel	43.6	8.5	29.2	18.8
PEMB	44.0	8.4	27.1	20.5
PLO123	44.2	8.8	27.1	19.9
PNM	44.1	8.5	29.0	18.4
Quaraizinho	43.7	8.9	28.9	18.6
RN25	41.7	9.5	29.3	19.6
ROMANO	42.6	9.3	29.3	18.8
RS-12	44.1	8.6	27.5	19.8
RS-21	43.6	8.9	28.8	18.7
SC	42.5	9.3	29.2	19.0
Silvio	43.9	9.1	28.5	18.5

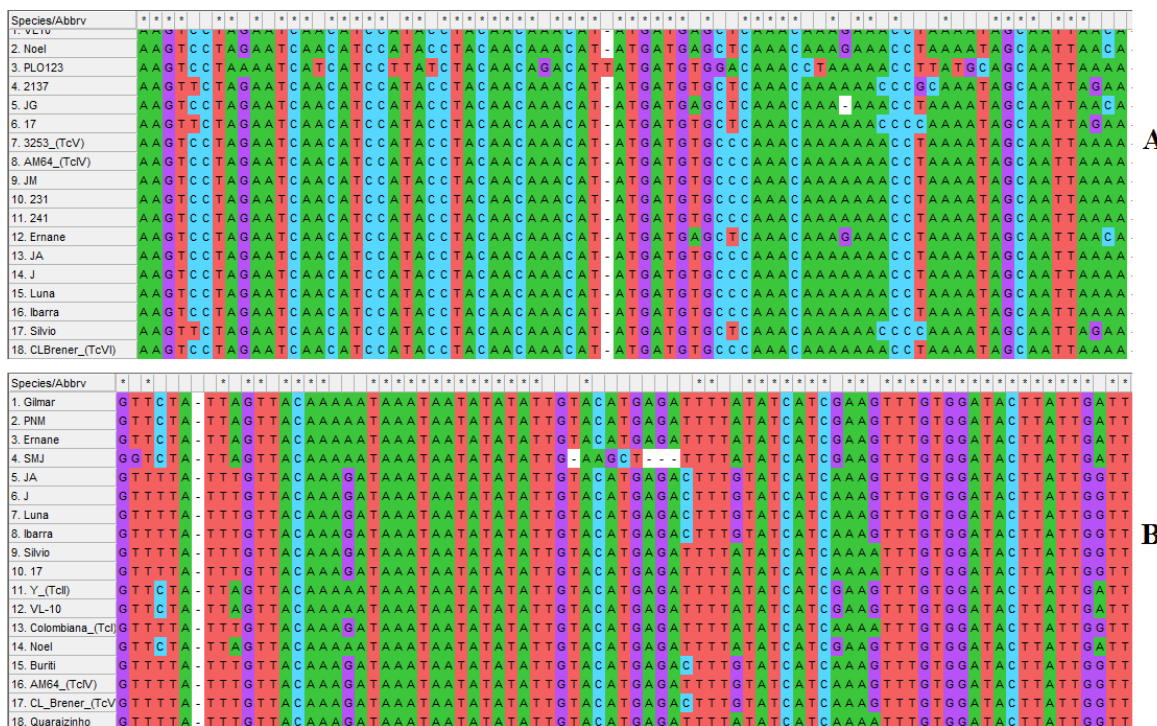
SM76 (TcIII)	44.7	8.1	27	(conclusão)
SMJ	42.0	8.8	29.4	19.8
2137	43.1	9.0	28.6	19.3
VL-10	43.7	8.7	29.2	18.4
Y (TcII)	43.8	8.5	29.2	18.5
YuYu	44.6	8.5	27.2	19.7

Fonte: (autor)

### 4.6 Alinhamento de múltiplas sequências de *T. cruzi*

O alinhamento proposto somente com sequências do acervo do laboratório para os alvos de interesse demonstrou uma elevada similaridade entre elas. As sequências dos genes da COI e da COII de diferentes cepas de laboratório, dispostas no alinhamento original, foram analisadas em relação à quantidade de sítios informativos e conservados (Figura 10). O alinhamento de sequências do gene da COI apresentou um total de 307 sítios informativos e 463 sítios conservados. Para o alinhamento das sequências do gene da COII, observaram-se um total de 191 sítios informativos e 366 sítios conservados.

Figura 10: Visão parcial dos alinhamentos de sequências de *T. cruzi* do acervo do laboratório.



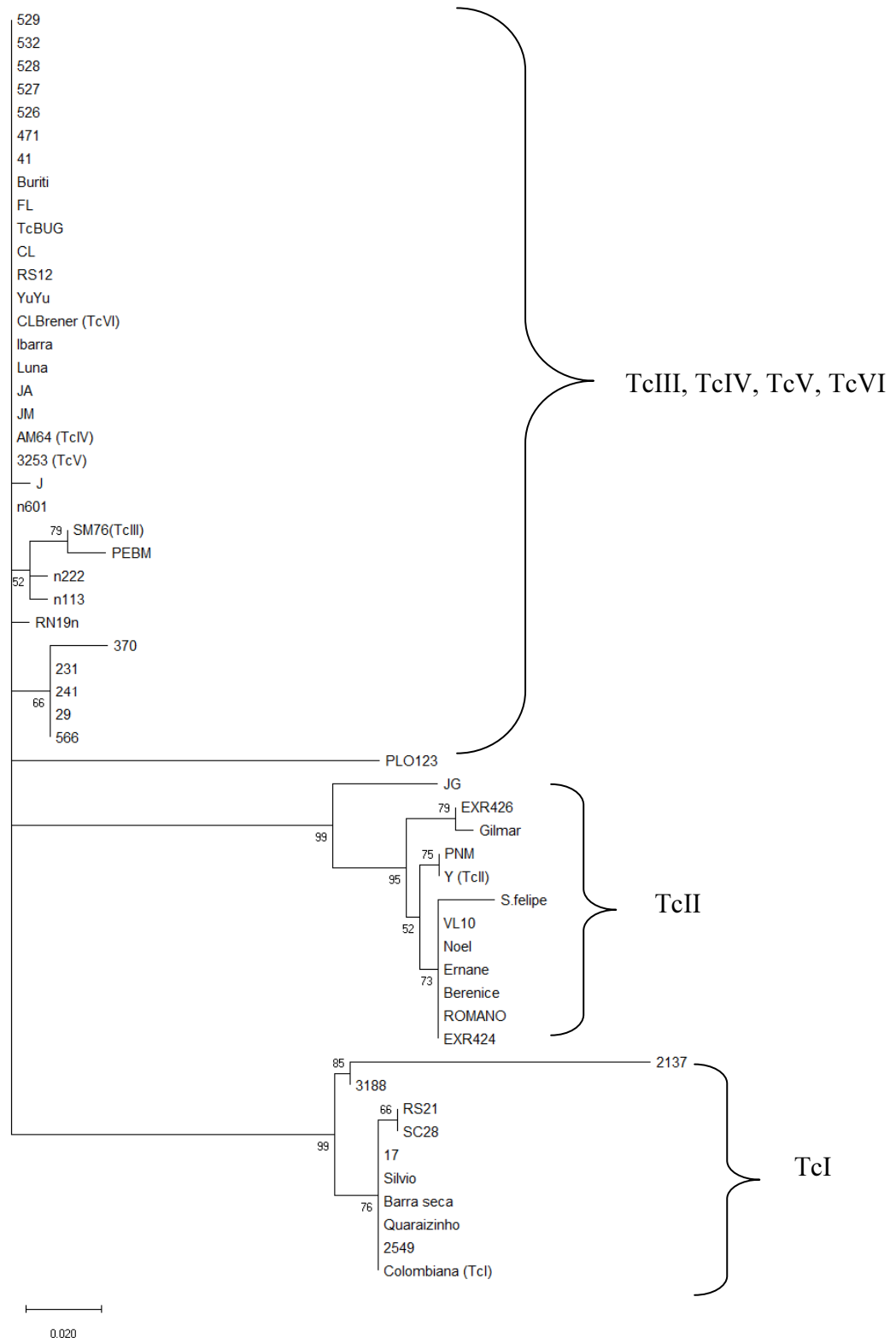
Legenda: A= gene da COI (sequência parcial). B= gene da COII (sequência completa). \* = Posição de nucleotídeos idênticos em toda a coluna do alinhamento.

#### 4.7 Relações filogenéticas

Árvores filogenéticas foram construídas separadamente utilizando os alinhamentos das 55 sequências nucleotídicas do gene da COI e das 57 sequências do gene da COII referentes às 64 cepas de *T. cruzi* do laboratório (**Figuras 11 e 12**, respectivamente). O total de sítios para a construção de cada árvore não reflete aqueles nos respectivos alinhamentos originais, uma vez que os mesmos passaram por um filtro (processamento) para retirada de regiões muito divergentes. Foi observado a formação de clados com ramos bem delimitados ao qual contem cepas referentes as DTUs designadas do **Quadro 3**, além de valores de apoio estatístico robustos para estes clados.

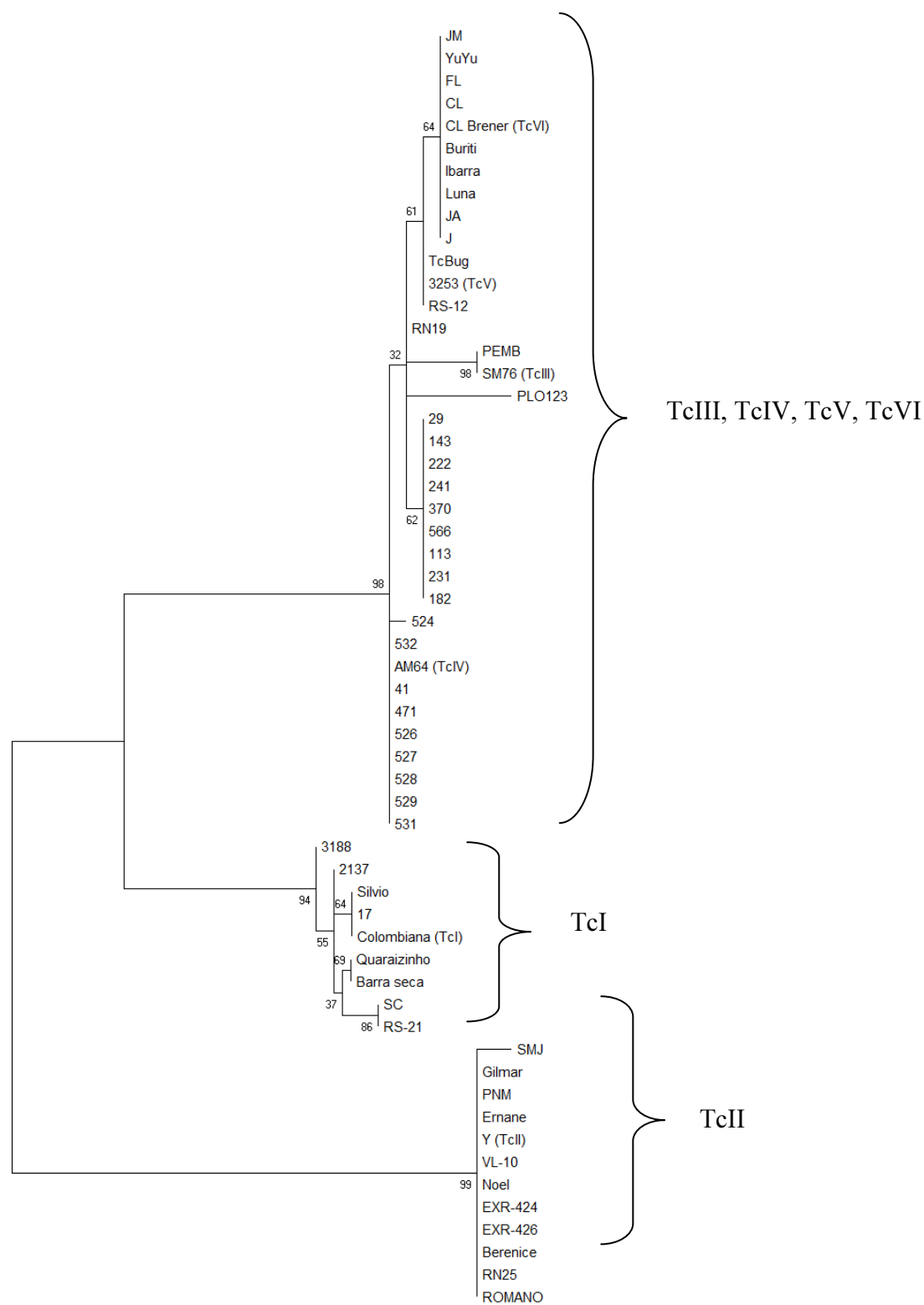
Porém, a separação das DTUs dos parasitos pode ser melhor visualizada na árvore construída com as sequências do gene da COII, baseado nos valores de apoio nos nós ancestrais. Na análise da disposição das sequências nas reconstruções de ambos os alvos é possível observar uma heterogeneidade das amostras quanto às suas classificações pelo método de genotipagem, apesar de boa parte das sequências formarem o clado incluindo as DTUs TcIII-TcIV-TcV-TcVI.

**Figura 11:** Árvore de máxima verossimilhança de 55 sequências do gene da COI de *T. cruzi*.



Legenda: Alinhamento com 205 sítios. *Tamura 3-parameter model*. Valores estatísticos de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas). TcBUG: leia-se Bug 2149 cl10.

**Figura 12:** Árvore de máxima verossimilhança de 57 sequências do gene da COII de *T. cruzi*.



Legenda: Alinhamento com 308 sítios. *Tamura 3-parameter model*. Valores estatísticos de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas). TcBug: leia-se Bug 2149 c110.

## 5 DISCUSSÃO

O entendimento da estrutura populacional e da filogenia de *T. cruzi* é de extrema importância, pois está diretamente relacionado aos tipos de transmissão, ciclo selvagem e doméstico e a aspectos clínicos da doença. Os subgrupos de *T. cruzi* foram divididos de diversas formas: biodemas, zimodemas, esquizodemas, cepas, clones, *clonets*, linhagens, clados, haplótipos e haplogrupos ao longo do tempo. Em função da diversidade de classificações que ocorriam na literatura, uma convenção para a subdivisão da espécie de *T. cruzi* em seis DTUs (*Discrete Typing Units*): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI padronizou os métodos de genotipagem da época (ZINGALES *et al.*, 2009).

Restam diversas questões em relação ao surgimento de cada um dos DTUs, qual delas teria originado primeiro, bem como a possibilidade de ocorrência de eventos de hibridização entre DTUs, e a classificação das mesmas como híbridos e não híbridos (MACHADO, AYALA, 2001; RODRIGUES, MORELLI, JANSEN, 2017).

Estas questões a respeito da evolução do parasito e suas respectivas DTUs podem ser resolvidas através da escolha de um gene que tenham como critério: uma evolução rápida o bastante para que as espécies em estudo mostrem diferenças umas das outras e evolução de forma lenta para que não haja muita divergência (VERLI *et al.*, 2014). A significância destes critérios tem como base que árvores construídas para um mesmo grupo de organismos com base em conjunto de dados diferentes podem resultar em filogenias diferentes (RUSSO, MIYAKI, PEREIRA, 2012).

Corroborando Russo e colaboradores (2012) é possível analisar a diferença de disposição topológica da árvore quando se compara as relações entre as DTUs TcI e TcII com as demais TcIII, TcIV, TcV e TcVI (**Figuras 11 e 12**). Esta diferença de disposição das relações filogenéticas dos grupos por diferentes alvos pode ser explicada através da origem destas DTUs. A atual hipótese cita que as DTU TcI e TcII consistem em linhagens filogenéticas ancestrais e relativamente homogêneas que passaram por eventos de hibridização para a origem das demais DTUs (WESTENBERGER *et al.*, 2005; RAMIREZ *et al.*, 2011).

Os dois principais grupos de *T. cruzi* parecem diferir em características biológicas importantes, por exemplo, patogenicidade, tempo de duplicação e suscetibilidade a drogas. Portanto, são considerados relevantes para estudos epidemiológicos e desenvolvimento de profilaxia. Na região da América do Sul,



observou-se que as cepas de *T. cruzi* II (TcII-VI) são geralmente responsáveis por infecções humanas, enquanto as cepas de *T. cruzi* I (TcI) são geralmente associadas ao ciclo silvestre (FLORES-LÓPEZ, MACHADO, 2011).

Análises propostas por Freitas e colaboradores (2006) com genes de microssatélite e análise de polimorfismos do gene COII indicaram que as DTUs TcI e TcII não são somente as únicas linhagens ancestrais em questão, mas que haveria um terceiro DTU ancestral (TcIII), porém estes achados contradizem aos achados Westenberger e colaboradores (2005). Porém, a análise realizada por Freitas (2006) não explica os dados obtidos em nossas análises (**Figuras 11 e 12**) sobre as relações filogenéticas de TcI e TcII com as DTUs: TcIII, TcIV, TcV e TcVI.

As relações entre TcI e TcII com as DTUs III e IV foram propostas inicialmente por Westenberger e colaboradores em 2005 (Figura 7 do seu artigo) através da análise de genes do maxicírculo, como citocromo *b*, COII/ND1 que verificaram que uma afinidade destes grupos devido a eventos de hibridização (ZINGALES *et al.*, 2012). Nas análises obtidas das **Figuras 11 e 12** não foi possível ter uma divisão clara em relação a separação das DTUs TcV e TcVI.

A separação das linhagens TcV e TcVI até o momento não foi possível alcançá-las, tanto nas análises deste trabalho como de outros grupos de pesquisas. Conforme Freitas e colaboradores (2006) e Lewis (2011) não é possível determinar se estas linhagens surgiram de maneira independente, o motivo de tal afirmação consiste na comparação de sequências de nucleotídeos foi realizada por Westerberg e colaboradores (2005 e 2006). Na comparação foi observado que estas linhagens, TcV e TcVI surgiram através da hibridização entre ancestrais geneticamente distintos e elas possuem alelos totalmente intactos de duas outras DTUs (TcII e TcIII).

As explicações acima se referem às diferentes as relações de modo de expansão e origem das diferentes populações de *T. cruzi*. Porém é possível constatar que estas hibridações tiveram um impacto importante na estrutura populacional atual deste parasito, incluindo a existência de linhagens híbridas e conseqüentemente em algumas relações filogenéticas não bem estabelecidas em alguns grupos (TcIII, TcIV, TcV e TcVI) (RAMÍREZ *et al.*, 2017).

A crítica realizada por Flores-López e Machado (2011) que consiste na dúvida de que se essa classificação realmente reflete a evolução histórica deste parasito é pertinente. O embasamento para tal crítica é avaliado pelo método tradicional de genotipagem basear-se em várias etapas com marcadores moleculares codominantes

(por exemplo, isoenzimas, microssatélites, RAPDs), que não são tão filogeneticamente informativos como as sequências nucleotídicas.

Entretanto, as análises filogenéticas demonstradas (**Figuras 11 e 12**) apresentam topologias e valores de apoio estatístico que condizem com os argumentos dos autores Flores-López e Machado (2011). Para os autores em questão, a não utilização de grupos externos (*outgroups*) não permite o enraizamento adequado da árvore e pode levar a agrupamentos evolutivos artificiais. Porém a nossa topologia foi capaz de demonstrar as duas principais linhagens monofiléticas esperadas correspondentes ao *T. cruzi* I (TcI) e (TcII).

## 6 CONCLUSÃO

A ausência de critérios taxonômicos confiáveis tem levado a inúmeros erros de classificação dos tripanossomatídeos em geral. Embora exista hoje um consenso que os critérios devam ter como base a filogenia molecular, essa conduta tem sido pouco adotada ou utilizada de forma incorreta. Compreender as diferenças fenotípicas entre diferentes cepas de *T. cruzi* e a potencial conexão entre essa variabilidade e diferentes manifestações da doença de Chagas, é essencial para uma correta reconstrução da história evolutiva de *T. cruzi*.

Foi possível identificar neste estudo uma escassez de sequências, para o alvo de COI, nos bancos de dados públicos. Em contrapartida o número de sequências para COII foi consideravelmente superior, provavelmente devido a este alvo ser utilizado na caracterização do parasito. Foi observado também um desbalanço da distribuição dos alvos entre as diferentes espécies do gênero *Trypanosoma*, com uma prevalência de sequências para a espécie de *T. cruzi*.

Através do desenho de iniciadores juntamente com a técnica de sequenciamento de Sanger, é possível contribuir para o acréscimo de sequências nucleotídicas de COI e COII nos bancos de dados públicos. A maior contribuição será devido ao fato que algumas sequências do acervo do laboratório não foram depositadas nos bancos ou foram depositadas com um tamanho do gene inferior aos obtidos neste estudo.

Uma classificação que represente as relações evolutivas é altamente desejável, pois pode desempenhar um papel importante nas decisões estratégicas sobre controle e profilaxia da doença de Chagas. Aqui apresentamos os resultados do estudo filogenético baseado em sequências de diversas cepas de *T. cruzi* presentes no acervo da Instituição até o momento e foi observado que a metodologia traçada com este estudo pode ser

capaz de caracterizar as cepas de *T. cruzi*, ao invés do método tradicional, embora esta caracterização foi somente para dois grupos (TcI e TcII).

Esta comparação entre as metodologias só o foi possível devido ao uso do método tradicional, que corroborou algumas posições das sequências nas árvores filogenéticas. Portanto o método tradicional continua sendo uma ferramenta útil na caracterização das cepas e auxiliou na designação das DTUs de algumas cepas do laboratório que não haviam sido caracterizadas pelo método tradicional até o momento.

Nesse estudo iniciadores específicos amplificaram com eficiência fragmentos de 936 pb e 629 pb dos genes alvo COI e COII, respectivamente nas amostras de *T. cruzi* pertencentes a seis diferentes DTUs (*Discrete Typing Units*) de *T. cruzi* (TcI a TcVI). A partir dos dados do sequenciamento e alinhamento foram construídas árvores de máxima verossimilhança usando sequências nucleotídicas dos genes COI e COII de 55 e 57 cepas de *T. cruzi*, respectivamente. Reconstruções filogenéticas das sequências de ambos os genes da COI e COII identificaram clados com valores de apoio estatístico significativo para as DTUs (*Discrete Typing Units*) de *T. cruzi*. Tais clados correspondem a TcI, TcII e TcIII-TcIV-TcV-TcVI.

Mostramos que há uma evidência de que o *T. cruzi* II (TcII-VI) não é um grupo evolutivo natural, mas uma linhagem parafilética, e nós fornecemos uma hipótese clara de relações entre as seis principais DTUs desse parasito. Além disso, avaliamos se os dados das sequências são consistentes com os dois eventos de hibridização que foram propostos para esta espécie e não foi possível chegar a um consenso devido à complexidade da estruturação das populações desse organismo demonstrada por outros estudos.

Sendo assim, é crucial a utilização do genoma mitocondrial de *T. cruzi* como ferramenta para elucidar as relações evolutivas entre as DTUs do parasito, uma vez que possui alto conteúdo informativo da origem das populações desse parasito conforme demonstrado com o uso neste trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHAFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res** 1997. 25:3389-3402.

ALVES, Lysangela Ronalte. Caracterização funcional de complexos mRNA-proteínas (mRNPs) em *Trypanosoma cruzi*. 2010. 186 f. Tese (Mestrado) - Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz. Curitiba, 2010.

ANDRADE A.L., ZICKER F., de OLIVEIRA R.M., ALMEIDA Silva S., LUQUETTI A., TRAVASSOS L.R. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**. 1996;348:1407–1413.

ANONYMOUS, 1999. Recommendations from a Satellite Meeting. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 94 (Suppl. II): 429-432

ASLETT *et al.*, TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Research* 2010 38. Database issue:D457-D462.

BOURENS M, FONTANESI F, SOTO IC, LIU J, BARRIENTOS A. Redox and reactive oxygen species regulation of mitochondrial cytochrome C oxidase biogenesis. **Antioxid Redox Signal**. 2013;19(16):1940-52.

BRENER Z, GAZZINELLI R, T. Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas' Disease. **Int Arch Allergy Immunol** 1997;114:103-110.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. & BARRAL-NETTO, M. - *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. 431p

BUSCAGLIA CA, DI NOIA JM. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes Infect** 2003; 5:419-27.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo. 1964, 6, 93 - 100.

CANCADO, J. Romeu. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Rev. Inst. Med. trop.** S. Paulo, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 29-37, Feb. 2002.

CARRANZA MARTINEZ, J.C. NADH desidrogenase mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*: subunidade 7 para diagnóstico diferencial de isolados humanos e análise funcional. 2008. 174 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CARREA A, DIAMBRA L. Systems Biology Approach to Model the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**. 2016;11(1):e0146947. Published 2016 Jan 11.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**. 2000. 17, 540-552.

CHAGAS, Carlos. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.1, n.2, p.159-218. 1909d.

CHATELAIN, E. (2015). Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **Journal of Biomolecular Screening**, 20(1), 22–35.

D'ÁVILLA, D. A., MACEDO, A. M., VALADARES, H. M. S., GONTIJO, E. D., DE CASTRO, A. M., MACHADO, C. R., GALVÃO, L. M. C. Probing Population Dynamics of *Trypanosoma cruzi* during Progression of the Chronic Phase in Chagasic Patients. **Journal of Clinical Microbiology**. 2009, 47(6), 1718–1725.

DALIRY, A. Atividade, seletividade e mecanismos de ação de diamidinas aromáticas e análogos sobre *Trypanosoma cruzi*: um enfoque sobre o kDNA / Anissa Daliry. – Rio

de Janeiro: 2011, XX p.; il. Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2011.

DAWNAY N, OGDEN R, MCEWING R, CARVALHO GR, THORPE RS. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. **Forensic Sci. Int.** 2007; 173: 1-6.

DE SÁ ARN, STEINDEL M, DEMEU LMK, *et al.* Cytochrome oxidase subunit 2 gene allows simultaneous detection and typing of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. **Parasites & Vectors.** 2013;6:363.

DE SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Des.** 2002, 8, 269 - 285.

DIAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M. & CAZZULO, J. J. Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, 44:880-881, 1988.

FERREIRA, Ticiana Xavier. Avaliação do potencial terapêutico do transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo na cardiopatia chagásica crônica experimental. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador, 2011.

FLORES-LÓPEZ CA, MACHADO CA. Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among *Trypanosoma cruzi* lineages and support a single hybridization prior to human contact. **PLoS Negl Trop Dis.** 2011;5(8):e1272.

FREITAS, J. M., PINTO, A.L., PIMENTA, J. R., RODRIGUES, B.L., GONÇALVES, V.F., TEIXEIRA, S.M.R., PENA, S.D.J. Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, 2(3), e 24. 2006.

GREINER, Peter; HANNAPPEL, Achim; WERNER, Carolin; LUDWIG, Bernd. Biogenesis of cytochrome c oxidase - *in vitro* approaches to study cofactor insertion into a bacterial subunit I. **Biochim Biophys Acta**. 2008 Jul-Aug;1777(7-8):904-11.

HAMILTON PB, GIBSON WC, STEVENS JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Mol Phylogenet Evol**. 2007; 44(91): 15-25.

JORGE, TCA., e CASTRO, SL., orgs. *Doença de Chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. **Antropologia e Saúde collection**. ISBN 85-85676-75-2.

KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, and TAMURA K (2018) MEGAX: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution** 35:1547-1549.

LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON JD, GIBSON TJ, HIGGINS DG. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23, 2947-2948.

LEWIS MD, LLEWELLYN MS, YEO M, ACOSTA N, GAUNT MW, MILES MA. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. **PLoS Negl Trop Dis**. 2011;5(10):e1363.

LI, Peter Mark (1990) The role of CuA in the cytochrome c oxidase proton pump. Dissertation (Ph.D.), California Institute of Technology.

LIARTE, Daniel Barbosa. Desenvolvimento de uma PCR multiplex capaz de detectar e classificar cepas de *Trypanosoma cruzi* em amostras clínicas e de campo. Dissertação (Mestrado) 2006, 107p. Fundação Oswaldo Cruz - Instituto René Rachou. Belo Horizonte, 2006.

LIMA L, ESPINOSA-ÁLVAREZ O, HAMILTON PB, *et al.* *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. **Parasites & Vectors**. 2013;6:221.

LIU Y.; ENGLUND P.T. The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication. **Mol. Microbiol.** 2007, 64(3): 676-690.

MACEDO AM, MARTINS MS, CHIARI E, PENA SDJ 1992. DNA finger-printing of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Mol Biochem Parasitol** 55: 147-154.

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

MACEDO, Andréa M; MACHADO, Carlos R; OLIVEIRA, Riva P and PENA, Sérgio DJ. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 1-12, Feb. 2004.

MACHADO CA, AYALA FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2001;98(13):7396-7401. doi:10.1073/pnas.121187198.

MARTINS, Kiev. Caracterização molecular do *Trypanosoma cruzi* isolado de pacientes chagásicos, triatomíneos e reservatórios silvestres procedentes do semiárido do Estado do Rio Grande do Norte. Dissertação (Mestrado) 2014, 55 p - Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. Natal, 2014.

MILES MA, LANHAN SM, DE SOUZA AA, POVOA DG 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 74: 221-242.



MILES MA, SOUZA AA, POVOA M, SHAW JJ, LAINSON R, TOYE PJ 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian Brazil. **Nature**. 272: 819-821.

MILES MA, Toye PJ, OSWALD SC, GODFREY DG 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 71: 217-225.

MONCAYO, Álvaro; SILVEIRA, Antonio Carlos. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 17-30, July 2009.

MURTA SMF, Gazzineli RT, Brener Z, Romanha AJ 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazol and nifurtimox. **Mol Biol Parasitol**. 93: 203-214.

MURTA, Silvane Maria Fonseca; ROMANHA, Alvaro José. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, supl. 1, p. 177-180, Sept. 1999.

NEVES, David Pereira *et al.* **Parasitologia Humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. 546 p.

OCHSENREITER, T., CIPRIANO, M., & HAJDUK, S.L. Alternative mRNA editing in trypanosomes is extensive and may contribute to mitochondrial protein diversity. **PLoS ONE** 2008, 3, e1566.

OLIVEIRA RP, BROUDE NE, MACEDO AM, CANTOR CR, SMITH CL, PENA SDJ 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proc Natl Acad Sci USA** 95: 3776- 3780.

PAGÈS N, MUÑOZ-MUÑOZ F, TALAVERA S, SARTO V, LORCA C, NÚÑEZ JI. Identification of cryptic species of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in the

subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. **Veterinary Parasitology**. 2009; 165(3-4): 298-310.

PAHO-PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Chagas Disease in the Americas: A Review of the Current Public Health Situation and a Vision for the Future. **REPORT: CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS**, Washington, D.C., 3-4 May 2018.

PEDROSO, Aurélio;CUPOLILLO, Elisa; ZINGALES, Bianca. *Trypanosoma cruzi*: Exploring the nuclear genome of zymodeme 3 stocks by chromosome size polymorphism, **Experimental Parasitology**, Volume 116, Issue 1, 2007,Pages 71-76.

RAMÍREZ J.D., GUHL F., RENDÓN L.M., ROSAS F., MARIN-NETO J.A., MORILLO C.A. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. **PLoS Negl Trop Dis**, 2010; 4(11):e899.

RAMÍREZ JC, TORRES C, CURTO MdlA, SCHIJMAN AG. New insights into *Trypanosoma cruzi* evolution, genotyping and molecular diagnostics from satellite DNA sequence analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2017; 11(12): e0006139.

RASSI, ANIS JR; MARIN-NETO, José Antônio. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 152-158, mai. 2009.

RUSSO, C. A. de M., MIYAKI, C. Y. & PEREIRA, S. L. in *Biologia Molecular e Evoluçao* 123–131 (Holos Editora, 2012).

SALES JUNIOR PA, Molina I, FONSECA MURTA SM, *et al.* Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **Am J Trop Med Hyg**. 2017;97(5):1289-1303.

SAMBROOK J., & RUSSELL D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2006(1).

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1977. 74(12):5463-5467.

SGUASSERO, Y., CUESTA, C. B., ROBERTS, K. N., HICKS, E., COMANDÉ, D., CIAPPONI, A., SOSA-ESTANI, S. Course of Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection after Treatment Based on Parasitological and Serological Tests: A Systematic Review of Follow-Up Studies. **PLoS ONE**. 2015. 10(10).

SOUTO R, FERNANDES O, MACEDO AM, CAMPBELL D, ZINGALES B 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol** 83: 141-152.

SOUTO RP, FERNANDES O, MACEDO AM, CAMPBELL DA, ZINGALES B 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**. 83(2): 141-152.

STEINDEL M, Dias Neto E, MENEZES CLP, ROMANHA AJ, SIMPSON AJG 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mol Biochem Parasitol** 60: 71-80.

STUART K, PANIGRAHI AK. RNA editing: complexity and complications. **Mol Microbiol**. 2002; 45:591-596.

STUART KD, SCHNAUFER A, ERNST NL, PANIGRAHI AK. Complex management: RNA editing in trypanosomes. **Trends Biochem Sci**. 2005;30:97–105.

TANOWITZ HB, KIRCHHOFF LV, SIMON D, MORRIS SA, WEISS LM, WITTNER M. Chagas' disease. **Clin Microbiol Rev**. 1992;4:400–419

TIBAYRENC M 1995. Populations genetics and strain typing of microorganisms: how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci. **C R Acad Sci III**. 318 (1): 135-139.

TIBAYRENC M, NEUBAUER K, BARNABÉ C, GUERRINI F, Skarecky D, Ayala F 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random primer

DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Proc Natl Acad Sci USA** 90: 1335-1339.

URBINA, JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Trop.** 2010 Jul-Aug;115(1-2):55-68.

VARGAS-PARADA, L. Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA. **Nature Education. Massachusetts**, v. 3, n.9, 2010.

VERLI, Hugo *et al.* Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular. Organização de Hugo Verli. -- Porto Alegre, 2014. 282 p. : il.

VILLELA, Marcos Marreiro; PIMENTA, Denise Nacif; LAMOUNIER, Paulo Acácio; DIAS, João Carlos Pinto. Avaliação de conhecimentos e práticas que adultos e crianças têm acerca da doença de Chagas e seus vetores em região endêmica de Minas Gerais, **Brasil. Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 8, p. 1701-1710, Aug. 2009.

WESTENBERGER SJ, CERQUEIRA GC, EL-SAYED NM, ZINGALES B, CAMPBELL DA, STURM NR. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. **BMC Genomics**. 2006; 7:60. 1471-2164-7-60.

WESTENBERGER, S. J.; BARNABE, C.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**, v. 171, p. 527- 43, 2005.

WHO - World Health Organization. Research Priorities for Chagas Diseases, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **Who technical report series**, n. 975, 2012.

ZINGALES B, MILES MA, CAMPBELL DA, TIBAYRENC M, MACEDO AM, TEIXEIRA MM, SCHIJMAN AG, LLEWELLYN MS, LAGES-SILVA E, MACHADO CR, ANDRADE SG, STURM NR. The revised *Trypanosoma cruzi*

subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect Genet Evol.** 2012 Mar;12(2):240-53.

ZINGALES, B; ANDRADE, SG; BRIONES, MRS; CAMPBELL, DA; CHIARI, E; FERNANDES, O; Guhl, F; LAGES-SILVA, E; MACEDO, AM; Machado, CR; MILES,MA; ROMANHA,AJ; STURM, NR; TIBAYRENC, M; SCHIJMAN, AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** [online]. 2009, vol.104, n.7, pp. 1051-1054.

ZINGALES, Bianca. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity, **Acta Tropica**, Volume 184, 2018, Pages 38-52.